

# **PRÄVALENZ, DIVERSITÄT UND STRESSANTWORT VON *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS***

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades des  
Doktors der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie  
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von Sara Urmersbach  
aus Köln

Berlin, Oktober 2014

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

ISBN: 978-3-86387-643-2

**Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2014**

Dissertation, Freie Universität Berlin

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written authorization of the publisher.

Alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© Mensch und Buch Verlag 2015

Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

[verlag@menschundbuch.de](mailto:verlag@menschundbuch.de) – [www.menschundbuch.de](http://www.menschundbuch.de)

Die praktischen Arbeiten wurden von Dezember 2011 bis Februar 2014 am Institut für Lebensmittelhygiene der Freien Universität Berlin unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Thomas Alter und Herrn Dr. Stephan Hühn durchgeführt.

**1. Gutachter: Prof. Dr. Thomas Alter**

Freie Universität Berlin  
Institut für Lebensmittelhygiene  
Königsweg 69  
14163 Berlin

**2. Gutachter: Prof. Dr. Rupert Mutzel**

Freie Universität Berlin  
Institut für Biologie, Mikrobiologie  
Königin-Luise-Str. 12-16  
14195 Berlin

Disputation am 13.05.2015



# Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	IV
Tabellenverzeichnis.....	V
Abkürzungsverzeichnis.....	VII
<b>1 EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Historie .....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Taxonomie.....</b>	<b>2</b>
<b>1.3 Eigenschaften von <i>V. parahaemolyticus</i> .....</b>	<b>2</b>
<b>1.4 Vorkommen und Bedeutung von <i>V. parahaemolyticus</i>.....</b>	<b>3</b>
1.4.1 Vorkommen .....	3
1.4.2 Habitate .....	5
1.4.3 Vektoren zur Verbreitung von <i>V. parahaemolyticus</i> .....	5
1.4.4 <i>V. parahaemolyticus</i> in Lebensmitteln.....	6
<b>1.5 Stressantwort.....</b>	<b>7</b>
1.5.1 Stresssensoren und Regulatoren.....	8
1.5.2 Stress in der Umwelt .....	10
1.5.2.1 Osmotischer Stress .....	10
1.5.2.2 Kältestress .....	14
1.5.2.3 VBNC-Zustand .....	18
1.5.2.4 Hitzestress .....	18
1.5.2.5 Oxidativer Stress .....	20
1.5.3 Stress im Menschen.....	21
1.5.3.1 Hitzestress .....	21
1.5.3.2 Säurestress .....	21
1.5.3.3 Stress durch Gallensäuren, antimikrobielle Peptide und Detergenzien.....	24
1.5.3.4 Eisen-Mangel.....	25
1.5.3.5 Osmotischer Stress .....	26
1.5.4 Kreuzprotektion und Adaptation .....	27
<b>1.6 Klinik von <i>V. parahaemolyticus</i>-Infektionen.....</b>	<b>28</b>
<b>1.7 Pathogenitätsfaktoren von <i>V. parahaemolyticus</i>.....</b>	<b>29</b>
1.7.1 Surface-Sensing .....	29
1.7.2 Biofilm-Bildung.....	30
1.7.3 Adhäsine.....	31
1.7.4 Invasionsfaktoren .....	31
1.7.5 Quorum-Sensing .....	32
1.7.6 Phasen-Variationen und Kapsel.....	32
1.7.7 Eisen-Akquirierung .....	33
1.7.8 Endotoxine.....	34
1.7.9 Exotoxine.....	34
1.7.10 Typ III Sekretionssysteme .....	36
1.7.11 Typ VI Sekretionssysteme.....	37
1.7.12 Entstehung neuer pathogener Stämme durch Transfer genetischer Elemente.....	38
1.7.13 Detektion von Pathogenitätsfaktoren .....	39
<b>1.8 Molekulare Typisierung von <i>V. parahaemolyticus</i>.....</b>	<b>40</b>
1.8.1 Multi-Locus-Sequenz-Typisierung.....	41
1.8.1.1 Multi-Locus-Sequenz-Typisierung bei <i>V. parahaemolyticus</i> .....	42
1.8.2 Aminosäure-MLST.....	44

<b>1.9</b>	<b>Ziel der Arbeit</b> .....	<b>44</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>46</b>
<b>2.1</b>	<b>Material</b> .....	<b>46</b>
2.1.1	Geräte .....	46
2.1.2	Verbrauchsgüter .....	46
2.1.3	Chemikalien, Reagenzien und Puffer .....	47
2.1.4	Kits .....	48
2.1.5	Software, Datenbanken und Webservices .....	48
2.1.6	Verwendete Stämme .....	49
<b>2.2</b>	<b>Methoden</b> .....	<b>49</b>
2.2.1	Bakterienkultur und Stammhaltung .....	49
2.2.2	Bestimmung der Zellzahl und optischen Dichte .....	50
2.2.3	Isolation und Detektion von <i>V. parahaemolyticus</i> aus Lebensmittel- und Umweltproben ..	50
2.2.3.1	PCR zur Detektion von <i>Vibrio</i> spp. ....	51
2.2.3.3	PCR zur Detektion der Virulenzgene von <i>V. parahaemolyticus</i> .....	52
2.2.3.4	Kontrolle der PCR-Produkte .....	52
2.2.4	MLST-Analyse .....	52
2.2.4.1	MLST-PCR .....	53
2.2.4.2	Zuweisung der Allele und Sequenztypen .....	54
2.2.4.3	Aminosäure-MLST .....	55
2.2.4.4	Analyse der Daten .....	55
2.2.5	Genexpressionsanalyse .....	56
2.2.5.1	Vorkultur.....	56
2.2.5.2	Stressbedingungen.....	56
2.2.5.3	Isolierung der RNA .....	56
2.2.5.4	Qualitätskontrolle der RNA .....	57
2.2.5.5	Microarray.....	57
2.2.5.6	Reverse Transkriptase quantitative PCR (RT-qPCR) .....	60
2.2.5.7	Korrelation Genexpression Microarray und RT-qPCR .....	60
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>62</b>
<b>3.1</b>	<b><i>Vibrio</i> spp. und <i>V. parahaemolyticus</i> in Lebensmitteln</b> .....	<b>62</b>
<b>3.2</b>	<b>MLST-Analyse</b> .....	<b>63</b>
3.2.1	Diversität der Stammsammlung .....	63
3.2.2	Genotypische Stammdiversität und Populationsanalyse .....	63
3.2.2.1	Diversität der Sequenztypen .....	64
3.2.2.2	Diversität der Peptid-Sequenztypen .....	65
3.2.2.3	Peptid-Sequenztypen der pubMLST-Stämme.....	67
3.2.2.4	Vergleich des MLST- und AA-MLST-Schemas .....	67
3.2.3	Klonale Beziehungen zwischen den IFH-Stämmen und innerhalb der geographischen Stamm-Gruppen .....	68
3.2.3.1	Analyse der IFH-Stämme .....	69
3.2.3.2	Stämme der geographischen Gruppen .....	73
3.2.4	Phylogenetische Analyse .....	75
<b>3.3</b>	<b>Genexpression</b> .....	<b>77</b>
3.3.1	Ausbeute und Qualität der RNA .....	77
3.3.2	Qualität der Microarrays und Ähnlichkeit der Replikate .....	78
3.3.3	Korrelation RT-qPCR und Microarray .....	79
3.3.4	Auswahl der Referenztemperatur.....	79
3.3.5	Daten der normalisierten Expressionsunterschiede.....	81

---

3.3.6	Temperaturinduzierte Expressionsunterschiede.....	81
3.3.7	Vergleich der Genexpression bei 4 °C, 15 °C, 20 °C und 42 °C.....	83
3.3.8	Genexpression bei den verschiedenen Temperaturen.....	84
3.3.8.1	Genexpression bei 4 °C und 15 °C.....	84
3.3.8.2	Genexpression bei 20 °C.....	86
3.3.8.3	Genexpression bei 42 °C.....	87
3.3.9	Gegensätzliche Expression von Genen bei Hitze und Kälte.....	89
3.3.10	Identifikation von differentiell regulierten Prozessen.....	89
3.3.10.1	DAVID-Analyse.....	90
3.3.11	Temperaturinduzierte Kreuzprotektion.....	91
3.3.12	Temperaturabhängige Expression von Virulenz-Genen.....	92
<b>4</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>94</b>
4.1	<i>Vibrio</i> spp. und <i>V. parahaemolyticus</i> in Lebensmitteln.....	94
4.2	MLST-Analyse.....	95
4.2.1	Diversität der Stammsammlung.....	95
4.2.2	Sequenzierung der <i>gyrB</i> - und <i>recA</i> -Fragmente.....	95
4.2.3	Diversität der Sequenztypen und Peptid-Sequenztypen.....	96
4.2.3.1	Reinigende Selektion führt zu einer verringerten Peptid-Sequenztyp-Diversität.....	96
4.2.3.2	Verbreitung von Sequenztypen und Peptid-Sequenztypen.....	97
4.2.4	Populationsstruktur von <i>V. parahaemolyticus</i> .....	99
4.2.4.1	Klonale Beziehungen der Isolate.....	100
4.2.5	Geographische Cluster im UPGMA.....	101
4.2.6	Übereinstimmung der allel- und sequenzbasierten Analysen.....	101
4.3	Genexpression.....	102
4.3.1	Auswahl der Referenztemperatur.....	102
4.3.2	Übereinstimmung von Microarray und RT-qPCR.....	103
4.3.3	Genexpression bei Kältestress.....	103
4.3.3.1	Kälteschock-Proteine.....	104
4.3.3.2	Unterschiede der Genexpression bei 4 °C und 15 °C.....	105
4.3.4	Genexpression bei Hitzestress.....	105
4.3.4.1	Hitzeschock-Proteine.....	106
4.3.5	Antagonistische Genexpression von Hitze- und Kälteschock-Proteinen.....	106
4.3.6	Unterschiede zwischen den Chromosomen.....	107
4.3.7	Induzierte Kreuzprotektion.....	107
4.3.8	Einfluss der Temperatur auf Expression von Pathogenitätsfaktoren.....	110
4.3.9	Gene mit unbekannter Funktion.....	113
4.4	Fazit.....	113
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>115</b>
<b>6</b>	<b>SUMMARY.....</b>	<b>117</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>118</b>
<b>8</b>	<b>DANKSAGUNG.....</b>	<b>141</b>
<b>9</b>	<b>VERZEICHNIS DER PUBLIKATIONEN.....</b>	<b>142</b>
<b>10</b>	<b>LEBENS LAUF.....</b>	<b>143</b>
<b>11</b>	<b>ANHANG.....</b>	<b>144</b>

---

**Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1: Übergänge in und aus dem VBNC-Zustand.....	4
Abbildung 2: Transport und Synthese kompatibler Solute in <i>V. parahaemolyticus</i> .....	13
Abbildung 3: Modell zur Kältestress-Antwort in <i>E. coli</i> .....	15
Abbildung 4: Mechanismen der Zellschädigung durch oxidativen Stress .....	20
Abbildung 5: Das Lysin-Decarboxylase-System in <i>V. parahaemolyticus</i> und <i>V. cholerae</i> .....	23
Abbildung 6: Die Rolle von <i>toxRS</i> bei der Antwort auf Stress der äußeren Membran.....	24
Abbildung 7: Pathogenitätsfaktoren von <i>V. parahaemolyticus</i> .....	30
Abbildung 8: Vibrioferrin und die Photolyse von Vibrioferrin-Fe <sup>3+</sup> .....	33
Abbildung 9: Fließschema zum Nachweis von <i>V. parahaemolyticus</i> nach ISO/TS21872-1.....	50
Abbildung 10: MLST-PCR von <i>V. parahaemolyticus</i> .....	63
Abbildung 11: Rarefaction-Kurven der verschiedenen Stamm-Gruppen.....	64
Abbildung 12: MSTs basierend auf den Allel-Profilen von <i>V. parahaemolyticus</i> .....	69
Abbildung 13: Population Snapshot basierend auf den MLST-Profilen der pubMLST-Stämme von <i>V. parahaemolyticus</i> .....	71
Abbildung 14: FullMST basierend auf den MLST-Profilen der pubMLST-Stämme von <i>V. parahaemolyticus</i> .....	72
Abbildung 15: FullMST basierend auf den AA-MLST-Profilen der pubMLST-Stämme von <i>V. parahaemolyticus</i> .....	73
Abbildung 16: FullMSTs der geographischen Gruppen von <i>V. parahaemolyticus</i> .....	74
Abbildung 17: UPGMAs basierend auf den zusammengeführten Nukleotid- (A) bzw. Peptidsequenzen (B) der <i>V. parahaemolyticus</i> - Stämme .....	76
Abbildung 18: Kontrolle der RNA-Qualität im nativen Agarose-Gel (A) und denaturierendem Agarose- Gel (B) .....	77
Abbildung 19: Gel-like Image (A) und Peak-Report (B) des Bioanalyzers.....	77
Abbildung 20: Scan eines Microarrays .....	78
Abbildung 21: Hierarchische Clusteranalyse der Replikate .....	78
Abbildung 22: Korrelation der log <sub>2</sub> FC-Werte von Microarray- und RT-qPCR-Analysen .....	80
Abbildung 23: Differenzielle (A) und signifikant differentielle (B) Expression jedes Gens bei 4 °C, 15 °C, 20 °C und 42 °C .....	81
Abbildung 24: Volcano Plots der normalisierten Genexpression .....	82
Abbildung 25: Gruppen ähnlich exprimierter Gene .....	83
Abbildung 26: Analyse der Genexpression nach funktionaler Annotation .....	84
Abbildung 27: Circos Plots der signifikant differentiell exprimierten Gene bei 4 °C (A) und 15 °C (B) von <i>V. parahaemolyticus</i> .....	85
Abbildung 28: Circos Plot der signifikant differentiell exprimierten Gene bei 20 °C von <i>V. parahaemolyticus</i> .....	87
Abbildung 29: Circos Plot der signifikant differentiell exprimierten Gene bei 42 °C von <i>V. parahaemolyticus</i> .....	88
Abbildung 30: Anteil der differentiell regulierten Gene pro funktionaler Kategorie. ....	89



## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Taxonomische Einteilung der Familie <i>Vibrionaceae</i> [nach ALTER (2012c)] .....	2
Tabelle 2: Auswahl von Studien zur Prävalenz von <i>Vibrio</i> spp. und <i>V. parahaemolyticus</i> in Lebensmittelproben .....	7
Tabelle 3: Auswahl von Studien zur Reduktion von <i>Vibrio</i> spp. in Lebensmitteln durch technische Prozessierung.....	8
Tabelle 4: Toxine und Effektoren von <i>V. parahaemolyticus</i> [nach BROBERG <i>et al.</i> (2011), ZHANG und ORTH (2013) und SALOMON <i>et al.</i> (2013b)] .....	35
Tabelle 5: Genfragmente zur Detektion der <i>Vibrio</i> spp. ....	51
Tabelle 6: Genfragmente zur Detektion der Toxingene von <i>V. parahaemolyticus</i> .....	52
Tabelle 7: Genfragmente, die für die MLST-Analyse verwendet wurden .....	54
Tabelle 8: Genfragmente, die für die RT-qPCR verwendet wurden .....	61
Tabelle 9: Belastung der <i>Vibrio</i> spp.-positiven Proben mit einer oder mehreren <i>Vibrio</i> spp .....	62
Tabelle 10: Prävalenz der verschiedenen <i>Vibrio</i> spp. und Anteil an den positiv getesteten und allen untersuchten Proben .....	62
Tabelle 11: Eigenschaften der analysierten <i>V. parahaemolyticus</i> Populationen .....	65
Tabelle 12: Eigenschaften und Diversität der MLST- und AA-MLST-Loki .....	66
Tabelle 13: Anteil der wobble-Base am beobachteten Diversitätsverlust .....	68
Tabelle 14: Rekombination innerhalb verschiedener <i>V. parahaemolyticus</i> -Gruppen.....	68
Tabelle 15: Anzahl der differenziell exprimierten Gene je nach Kombination der Test- und Kontrolltemperatur .....	79
Tabelle 16: Anzahl und Anteil der differentiell exprimierten Gene insgesamt und der davon reprimierten bzw. induzierten Gene .....	82
Tabelle 17: Anzahl und Anteil der differentiell exprimierten Gene je Chromosom .....	83
Tabelle 18: Anzahl der Gene pro Kategorie mit signifikant differentieller Expression .....	84
Tabelle 19: Fünf Gene mit der stärksten Repression und Induktion bei 4 °C und 15 °C.....	86
Tabelle 20: Fünf Gene mit der stärksten Repression und Induktion bei 20 °C.....	87
Tabelle 21: Fünf Gene mit der stärksten Repression und Induktion bei 42 °C.....	89
Tabelle 22: Anteil (%) der signifikant differentiell exprimierten Gene pro Kategorie.....	90
Tabelle 23: An der Stressantwort beteiligte differentiell exprimierte Gene .....	91
Tabelle 24: An der Virulenz beteiligte differentiell exprimierte Gene .....	92

Tabellen mit vorangestelltem „A“ befinden sich im Anhang dieser Arbeit.

Tabelle A1: Auswahl von Studien zur molekularen Typisierung von <i>V. parahaemolyticus</i> .....	145
Tabelle A2: Im Rahmen dieser Arbeit verwendete <i>V. parahaemolyticus</i> -Stämme .....	150
Tabelle A3: Zusammenstellung der untersuchten Garnelen- und Krabbenproben .....	154
Tabelle A4: Anzahl (#) und Häufigkeiten (%) der Sequenztypen und Allele .....	159
Tabelle A5: Anzahl (#) und Häufigkeiten (%) der Peptid-Sequenztyp und Allele .....	160
Tabelle A6: Peptid-Sequenztypen aller Sequenztypen der pubMLST-Datenbank .....	161
Tabelle A7: Allele der AA-MLST-Loki.....	163

Tabelle A8: Konzentration und Ausbeute der isolierten Nukleinsäuren, RNAs, cDNAs und cRNAs sowie Einbaurate von Cyanin-3. ....	174
Tabelle A9: DAVID-Kategorien.....	175

Tabellen mit vorangestelltem „S“ wurden frei zugänglich auf dem Server des Instituts für Lebensmittelhygiene hinterlegt. Sie können über folgenden Link geöffnet werden:

<http://www.vetmed.fu-berlin.de/einrichtungen/institute/we08/diss/index.html>

Tabelle S1: Position der Sonden auf dem Array und Sequenzen der Sonden

Tabelle S2: Zuordnung zu funktionalen Kategorien und differentielle Genexpression bei 4 °C, 15 °C, 20 °C und 42 °C

## Abkürzungsverzeichnis

AA	Aminosäure (engl. amino acid)
ABC	ATP-bindende Kasette (eng. ATP-binding cassette)
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
AP-PCR	Arbitrarily primed-PCR
APW	Alkalisches Peptonwasser
ATP	Adenosintriphosphat
BCCT	Betain/Carnitin/Cholin-Transporter
bp	Basenpaar
CC	klonaler Komplex (engl. clonal complex)
CFU	Kolonie bildende Einheiten (eng. colony forming units)
cDNA	komplementäre DNA (engl. complementary DNA)
CPS	kapsuläre Polysaccharide
cRNA	komplementäre RNA (engl. complementary RNA)
CSP	Kälteschock-Protein (engl. cold-shock protein)
ct	Zyklus, bei dem die Fluoreszenz signifikant über der Hintergrundfluoreszenz liegt (engl. cycle threshold)
CTP	Cytidintriphosphat
Cy	Cyanin
<i>D</i>	Diversitätsindex nach Simpson
DB	Downstream box
dH <sub>2</sub> O	destilliertes Wasser
DLV	Doppel-Lokus-Variante (engl. Double Locus Variant)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
$d_N/d_S$	Verhältnis von nicht-synonymen zu synonymen Mutation
dsDNA	doppelsträngige DNA (engl. double stranded DNA)
<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>et al.</i>	und andere (lateinisch et alii)
EtBr	Ethidiumbromid
FA	Fettsäure (engl. fatty acid)
FC	-fache Änderung (engl. fold change) der Genexpression
GS-PCR	gruppenspezifische PCR (engl. group-specific PCR)
GTP	Guanosintriphosphat
HeLa	Humane Epithelzelllinie eines Zervix-Karzinoms
HSP	Hitzeschock-Protein (engl. heat-shock protein)
IFH	Institut für Lebensmittelhygiene (engl. Institute of Food Hygiene)
IP6	Inositol-Hexakisphosphat
$I_A^S$	standardisierter Index der Assoziation (engl. standardized index of association)
ISO	Internationale Organisation für Normung (engl. International Organization for Standardization)
K	kapsuläres Antigen von <i>V. parahaemolyticus</i>
KA	Katalase
Konz.	Konzentration
<i>L.</i>	<i>Listeria</i>
log	Logarithmus zur Basis 10 (log <sub>10</sub> )
log <sub>2</sub> FC	zur Basis 2 logarithmierte -fache Änderung der Genexpression
LPS	Lipopolysaccharide
MALDI-TOF	Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight
MAM	multivalentes Adhäsions-Molekül
MAP	Mitogen-aktiviertes Protein
MAPK	MAP-Kinase
Mb	Megabasen
MLST	Multi-Locus-Sequenz-Typisierung (engl. Multi Locus Sequence Typing)
MLVA	Multiple-Locus VNTR Analysis
mRNA	Boten-RNA (engl. messenger RNA)
MS	Massenspektrometer (engl. mass spectrometry)
MSC	mechanosensitiver Kanal (engl. mechanosensitive channel)
MST	Minimum Spanning Tree
NB-Seas	Nordsee, Ostsee, Kattegat und Skagerrak

nt	Nukleotid
(d)NTP	(Desoxyribo) Nukleosidtriphosphat
O	somatische Antigen von <i>V. parahaemolyticus</i>
OD <sub>600</sub>	Optische Dichte bei 600 nm Wellenlänge
OMP	Protein der äußeren Membran (engl. outer membrane protein)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl. polymerase chain reaction)
PFGE	Pulsfeldgelelektrophorese (engl. pulsed field gel electrophoresis)
(p)ppGpp	pppGpp und ppGpp
ppGpp	Guanosin-5'-diphosphat-3'-diphosphat
pppGpp	Guanosin-5'-triphosphat-3'-diphosphat
PI4P	Phosphatidylinositol-4-phosphat
QS	Quorum Sensing
pST	Peptid-Sequenztyp
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies (engl. reactive oxygen species)
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl. rounds per minute)
rRNA	ribosomale RNA
RT-qPCR	Reverse Transkriptase quantitative PCR (engl. reverse transcription quantitative PCR)
S.	<i>Salmonella enterica</i> Subspezies <i>enterica</i> Serovar
SLV	Einzel-Lokus-Variante (engl. Single Locus Variant)
SOD	Superoxid-Dismutase
sp.	Spezies (Singular)
spp.	Spezies (Plural)
ST	Sequenztyp
T3SS	Typ III Sekretionssystem (engl. type III secretion system)
T6SS	Typ VI Sekretionssystem (engl. type VI secretion system)
TBE	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
TCBS	Thiosulfat-Citrat-Gallensalz-Saccharose (engl. thiosulfate citrate bile (salts) sucrose)
TDH	Thermostabiles direktes Hämolyisin
tif	tagged image file
TLH	Thermolabiles Hämolyisin
TLV	Tripel-Lokus-Variante (engl. Triple Locus Variant)
TRH	TDH-verwandtes Hämolyisin (engl. TDH related haemolysin)
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	Transfer-RNA
UPGMA	Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean
ut	nicht typisierbar (engl. untypable)
UV	Ultraviolette Strahlung
V	Version
V.	<i>Vibrio</i>
Va	<i>Vibrio alginolyticus</i>
V-ATPase	ATPase der Vakuolen
VBNC	lebend aber nicht kultivierbar (engl. viable but nonculturable)
Vc	<i>Vibrio cholerae</i>
Vm	<i>Vibrio metschnikovii</i>
VNTR	Tandemwiederholungen repetitiver Abschnitte (engl. variable number tandem repeat)
Vp	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
VP	Gene, die auf Chromosom 1 von <i>V. parahaemolyticus</i> RIMD 2210633 codiert sind
VPA	Gene, die auf Chromosom 2 von <i>V. parahaemolyticus</i> RIMD 2210633 codiert sind
Vv	<i>Vibrio vulnificus</i>
Y.	<i>Yersinia</i>

# 1 Einleitung

## 1.1 Historie

Vibrionen, deren Name sich vom lateinischen „vibrare“ für „sich schnell hin- und herbewegend“ und „vibrierend“ ableitet, wurden erstmals von PACINI (1854) als Verursacher der Cholera erwähnt. *Vibrio (V.) parahaemolyticus* wurde nach einem Ausbruch lebensmittelassoziierter Erkrankungen im Jahre 1950 in Japan zum ersten Mal beschrieben (FUJINO, 1974). Obwohl nicht alle Stämme in der Lage sind, Krankheiten hervorzurufen, zählt *V. parahaemolyticus* zu den Hauptverursachern lebensmittelassoziierter Krankheiten in Ländern wie Japan und Taiwan, in denen traditionell rohe Fische und Meeresfrüchte verzehrt werden (PAN *et al.*, 1997; SU und LIU, 2007; WONG *et al.*, 2000a). Auch in den USA kommt es regelmäßig zu Ausbrüchen von lebensmittelassozierten Infektionen. Der erste Ausbruch wurde 1971 durch den Verzehr von Krebs- und Krabbenfleisch hervorgerufen (MOLENDEN *et al.*, 1972). Seitdem wurden weitere 42 Ausbrüche und eine Vielzahl sporadischer Fälle in den USA dokumentiert: Von 1988 bis 2010 wurden 8455 *Vibrio*-Infektionen, von denen 36 % durch Lebensmittel hervorgerufen wurden, gemeldet (DANIELS *et al.*, 2000a; FDA, 2005; SLAYTON *et al.*, 2013). Bis zur Mitte der 90er Jahre waren die meisten Infektionen weltweit Einzelfälle, die mit vielen verschiedenen Serotypen von *V. parahaemolyticus* assoziiert waren (OKUDA *et al.*, 1997). Als Ausnahme galt das vermehrte Auftreten von Gastroenteritiden an der Westküste der USA, die vor allem auf Infektionen mit Stämmen des Serotyps O4 zurückgeführt werden konnten (ABBOTT *et al.*, 1989; DEPAOLA *et al.*, 2000; NOLAN *et al.*, 1984). Im Februar 1996 wurde in Kalkutta plötzlich ein vermehrtes Auftreten von Infektionen durch *V. parahaemolyticus* verzeichnet. Diese konnten zu 50 % bis 80 % dem Serotyp O3:K6 zugeordnet werden (OKUDA *et al.*, 1997). Dieser Serotyp wurde erstmals von Patienten isoliert, die aus dem südostasiatischen Raum nach Japan reisten. Stämme des Serotyps codieren das Thermostabile Direkte Hämolysin (TDH), besitzen aber weder die Gene des TDH-verwandten Hämolysins (TRH) noch die einer Urease – eines Enzyms zur Harnstoff-Hydrolyse. Alle nach 1995 isolierten O3:K6-Stämme zeigten hinsichtlich ihres Virulenz-Gen-Profiles (*tdh*<sup>+</sup>, *trh*<sup>-</sup>, *ure*<sup>-</sup>) und Typisierungsmusters identische Ergebnisse, wohingegen sie zu O3:K6-Stämmen, die vor 1993 isoliert wurden, unterschiedlich waren. Es wird vermutet, dass dieser Serotyp seit 1995 in Kalkutta und südostasiatischen Ländern prävalenter wurde. Da nach 1998 auch in den USA Ausbrüche auf diesen Serotyp zurückgeführt wurden, gilt dieser *V. parahaemolyticus*-Serotyp seitdem als pandemisch (DANIELS *et al.*, 2000b; MATSUMOTO *et al.*, 2000). In den folgenden Jahren wurde der Serotyp O3:K6 auch in Südamerika, Europa und Afrika nachgewiesen (ANSARUZZAMAN *et al.*, 2005; GONZALEZ-ESCALONA *et al.*, 2005; MARTINEZ-URTAZA *et al.*, 2005; QUILICI *et al.*, 2005). Die Serotypen O4:K68, O1:K25, O1:K nicht typisierbar (ut), O1:K41, O1:K42 und O6:K18, die in südostasiatischen Ländern vermehrt zu Gastroenteritiden führten, zeigen eine hohe genetische Ähnlichkeit zum O3:K6 Serotyp und scheinen von diesem abzustammen (CHOWDHURY *et al.*, 2000; HARA-KUDO *et al.*, 2003; MATSUMOTO *et al.*, 2000; YEUNG *et al.*, 2002). Stämme dieser Serotypen sind genetisch konserviert und bilden den sogenannten pandemischen klonalen Komplex (IZUTSU *et al.*, 2008; NAIR *et al.*, 2007; OKURA *et al.*, 2003). In den letzten Jahren wurden in Indien zum ersten Mal Stämme beschrieben, die zu den pandemischen Serotypen zählen (O1:Kut und O3:Kut, positive gruppenspezifische Polymerase-Kettenreaktion (GS-PCR)) und das Gen *trh* besitzen (PAZHANI *et al.*, 2014).

## 1.2 Taxonomie

Vibrionen gehören zum Stamm der *Proteobacteria* und der Klasse der *Gammaproteobacteria*. Sie zählen zur Ordnung der *Vibrionales* und dabei zur Familie der *Vibrionaceae* (THOMPSON *et al.*, 2004; THOMPSON und SWINGS, 2006). Zu dieser Familie zählen u. a. die Gattungen *Vibrio*, *Aeromonas*, *Plesiomonas* und *Photobacterium* (ATLAS, 1997). Zurzeit werden 117 verschiedene Spezies (inkl. 2 Subspezies) in die Gattung *Vibrio* eingeordnet (EUZEBY, 1997; www.bacterio.net). Davon gelten zwölf als potentiell humanpathogene Spezies (Tabelle 1). Die bedeutendsten Spezies mit humanpathogener Relevanz sind *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae* und *V. vulnificus*. Die meisten Spezies treten als Symbionten oder Kommensalen auf. Zu den fischpathogenen Spezies mit ökonomischer Relevanz zählen *V. vulnificus*, *V. harveyi* und *Aliivibrio salmonicida* aus der verwandten Gattung *Aliivibrio*.

**Tabelle 1:** Taxonomische Einteilung der Familie *Vibrionaceae* [nach ALTER (2012c)]

Familie	Gattung	humanpathogene <i>Vibrio</i> -Spezies
<i>Vibrionaceae</i>	<i>Aliivibrio</i>	
	<i>Allomonas</i>	
	<i>Catenococcus</i>	
	<i>Enterovibrio</i>	
	<i>Grimontia</i>	
	<i>Listonella</i>	
	<i>Photobacterium</i>	
	<i>Photococcus</i>	
	<i>Salinivibrio</i>	
	<i>Vibrio</i>	<i>V. alginolyticus</i>
		<i>V. cholerae</i>
		<i>V. cincinnatiensis</i>
		<i>V. (Photobacterium) damsela</i>
	<i>V. furnissii</i>	
	<i>V. fluvialis</i>	
	<i>V. harveyi</i>	
	<i>V. (Grimontia) hollisae</i>	
	<i>V. metschnikovii</i>	
	<i>V. mimicus</i>	
	<b><i>V. parahaemolyticus</i></b>	
	<i>V. vulnificus</i>	

## 1.3 Eigenschaften von *V. parahaemolyticus*

Alle Vibrionen sind gramnegative, aerobe oder fakultativ anaerobe, nicht-sporenbildende Stäbchen (ALTER, 2012c). Dabei ist die Form der Zellen gerade bis leicht gebogen, kann aber auch kokkoid sein. Die Bakterien erreichen eine Breite von 0,58 µm bis 0,8 µm und eine Länge von 1,48 µm bis 2,6 µm (DRAKE *et al.*, 2007; McLAUGHLIN, 1995). Die polare Begeißelung erlaubt Vibrionen die Bewegung in flüssigem Medium. Alle *Vibrio* spp. sind mesophil, chemoorganotroph und besitzen einen fakultativen fermentativen Stoffwechsel. Sie können auf einfachen Medien wachsen und besitzen eine hohe Alkali- und Salztoleranz (ALTER, 2012c).

*V. parahaemolyticus* ist ein halophiles Bakterium, das an die Bedingungen im Meerwasser angepasst ist (YEUNG und BOOR, 2004). Unter optimalen Bedingungen beträgt die Verdopplungszeit von *Vibrio* spp. weniger als 9 min (AIYAR *et al.*, 2002). Diese kurze Verdopplungszeit wird durch die im Vergleich zu anderen aquatischen Bakterien hohe Anzahl ribosomaler Ribonukleinsäure (rRNA)- und

Transfer-RNA-(tRNA)-Gene ermöglicht (REEN *et al.*, 2006). So besitzt *V. parahaemolyticus* RIMD 2210633 z. B. 126 Gene, die für tRNAs codieren, und elf verschiedene 16S rRNA-Gene.

Optimales Wachstum ist bei einer NaCl-Konzentration von 2 % bis 4 % möglich, bei Konzentrationen unter 0,5 % ist das Wachstum gestört und in destilliertem Wasser oder bei NaCl-Konzentrationen über 10,5 % inhibiert (NAUGHTON *et al.*, 2009; ONGAGNA-YHOMBI und BOYD, 2013). In einem Temperaturbereich von 5 °C bis 43 °C wird Wachstum beobachtet, wobei das Temperaturoptimum vor allem für pathogene Stämme bei 37 °C liegt. Bei Temperaturen von  $\geq 25$  °C zeigt *V. parahaemolyticus* innerhalb von 24 h eine Vermehrung um 6 log-Stufen. Bei 12 °C ist das Wachstum stark verlangsamt, innerhalb von 7 Tagen wurde ein Wachstum um 5 log-Stufen beobachtet. Auch bei Temperaturen unter 0 °C überlebt *V. parahaemolyticus*. Das Bakterium ist säureempfindlich, weist aber eine hohe Alkalitoleranz auf (ALTER, 2012b). In einem Bereich von pH 4,8 bis pH 11 ist Wachstum möglich, der optimale Bereich liegt aufgrund des marinen Ursprungs von *V. parahaemolyticus* im leicht alkalischen Bereich bei pH 7,8 bis pH 8,6.

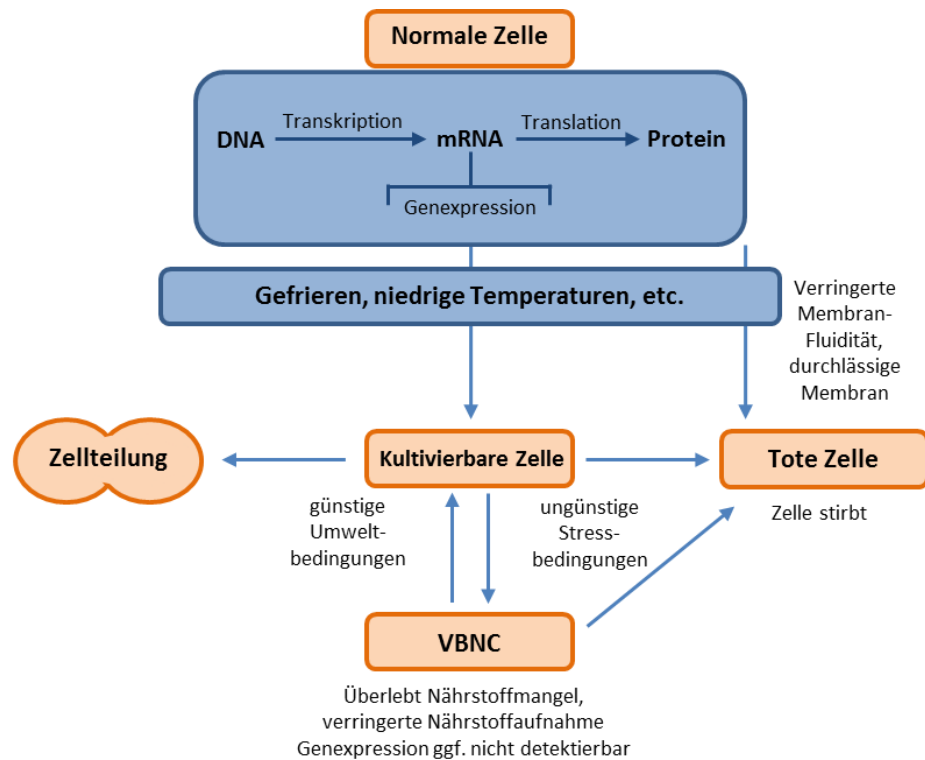
*V. parahaemolyticus* besitzt, wie z. B. *V. cholerae*, *V. vulnificus* und *V. fluvialis*, zwei Chromosomen (DRYSELIUS *et al.*, 2007; OKADA *et al.*, 2005). Das große Chromosom 1 (ca. 3,3 Megabasen (Mb)) und das kleine Chromosom 2 (ca. 1,9 Mb) werden synchron und einmal pro Zellzyklus repliziert (EGAN *et al.*, 2004; MAKINO *et al.*, 2003). Auf beiden Chromosomen werden essentielle Gene codiert, sodass vermutlich beide Chromosomen zum Überleben notwendig sind (MAKINO *et al.*, 2003). Allerdings weist Chromosom 2 eine höhere Variabilität als Chromosom 1 auf und scheint für mehr artspezifische Gene zu codieren (BOYD *et al.*, 2008; REEN *et al.*, 2006). Allgemein wurde eine hohe Frequenz von horizontalem Gentransfer bei *Vibrionaceae* beobachtet, dies führt auch bei *V. parahaemolyticus* zu einer hohen genetischen Diversität (DRYSELIUS *et al.*, 2007).

## 1.4 Vorkommen und Bedeutung von *V. parahaemolyticus*

### 1.4.1 Vorkommen

Wie die anderen Bakterien der Familie der *Vibrionaceae* ist *V. parahaemolyticus* ubiquitär in marinen und küstennahen Gewässern verbreitet (HALEY *et al.*, 2014).

Die Detektionsrate unterliegt in den gemäßigten Breiten saisonalen Schwankungen. Sobald die Temperaturen in den gemäßigten Breiten im Herbst unter 14 °C bis 19 °C fallen, geht *V. parahaemolyticus* in einen Übergangszustand über– den sogenannten „lebend aber nicht kultivierbar“-Zustand (VBNC-Zustand) –, in dem das Bakterium zwar lebendig, aber nicht kultivierbar ist (JIANG und CHAI, 1996; KANEKO und COLWELL, 1973; WONG und WANG, 2004) (Abbildung 1 und vgl. 1.5.2.3). In diesem Zustand sind die Bakterien lebendig und metabolisch aktiv, können aber nicht mittels kultureller Methoden detektiert werden, da keine Vermehrung stattfindet (GAUTHIER, 2000; OLIVER, 2000). Bei niedrigen Temperaturen bzw. im Winter wird *V. parahaemolyticus* daher sehr selten aus der Wassersäule isoliert und nur in kleinen Mengen im Sediment nachgewiesen (ALIPOUR *et al.*, 2014; KANEKO und COLWELL, 1973; KAPER *et al.*, 1981). Sobald sich die Umweltbedingungen verbessern, kann *V. parahaemolyticus* zum vegetativen Wachstum zurückkehren und wird bei Temperaturen über 15 °C wieder vermehrt in der Wassersäule und in Assoziation mit marinen Organismen detektiert (DEPAOLA *et al.*, 1990; HALEY *et al.*, 2014; KANEKO und COLWELL, 1973; KAPER *et al.*, 1981; OLIVER, 2010). Es kommt zu Peaks in den Sommermonaten und zu einer graduellen



**Abbildung 1:** Übergänge in und aus dem VBNC-Zustand

Bei ungünstigen Stressbedingungen gehen kultivierbare Zellen in den VBNC-Zustand über oder sterben ab. Im VBNC-Zustand ist ein Überleben der widrigen Bedingungen möglich. Sobald sich die Umweltbedingungen verbessern, verlassen die Zellen den VBNC-Zustand, sind kultivierbar und teilen sich. Modifiziert nach TREVORS *et al.* (2012).

Reduktion der detektierten Bakterien, wenn es kälter wird (COOK, 1994; DEPAOLA *et al.*, 1994; KAYSNER *et al.*, 1987; MOTES *et al.*, 1998; O'NEILL *et al.*, 1992; WRIGHT *et al.*, 1996). In der Literatur wird der Zusammenhang zwischen der Temperatur, dem Auftreten von Kopepoden und Plankton und dem Vorhandensein von pathogenen und apathogenen *V. parahaemolyticus* kontrovers diskutiert (DEPAOLA *et al.*, 2003a; TURNER *et al.*, 2013a). Generell ist der Anteil Toxin-codierender Stämme in der Umwelt eher gering (DEPAOLA *et al.*, 1990; HALEY *et al.*, 2014).

In tropischen und subtropischen Regionen ist *V. parahaemolyticus* dagegen das ganze Jahr über in der Wassersäule detektiert. Im Zusammenhang mit der globalen Klimaerwärmung und insbesondere der Erwärmung der Ozeane ist mit einer weiteren Verbreitung von (pathogenen) *V. parahaemolyticus* in den Norden bzw. Süden zu rechnen (BAKER-AUSTIN *et al.*, 2010; BAKER-AUSTIN *et al.*, 2012). Außerdem sind höhere absolute Populationszahlen bzw. längere Detektionszeiträume und vermehrte Infektionen auch in den gemäßigten Breiten zu erwarten. Selbst in Alaska und Norwegen konnten bereits *Vibrio* spp. detektiert werden (BAUER *et al.*, 2006; MARTINEZ-URTAZA *et al.*, 2010; MCLAUGHLIN *et al.*, 2005). Gerade für die Nordsee kann mit einer Zunahme auch von pathogenen *V. parahaemolyticus* gerechnet werden, da sie durch die vergleichsweise optimale Salinität (3,5 % NaCl) und die steigenden Wassertemperaturen ein ideales Ökosystem darstellt (OBERBECKMANN *et al.*, 2011a; WILTSHIRE und MANLY, 2004). So wurde *V. parahaemolyticus* zwischen Dezember 2009 und Dezember 2011 jeden Monat sowohl im Wasser als auch im Sediment an Badestränden der Nordsee detektiert (BOER *et al.*, 2013).



## 1.4.2 Habitate

Vibrionen werden regelmäßig in großen Mengen aus Wasser, Muscheln, Krustentieren, Fischen, Plankton und Sediment isoliert (COLWELL *et al.*, 1977; DEPAOLA *et al.*, 1994; JOSEPH *et al.*, 1982; KANEKO und COLWELL, 1973; KELLY, 1982; KRANTZ *et al.*, 1969; O'NEILL *et al.*, 1992; OLIVER *et al.*, 1982; TAMPLIN *et al.*, 1982).

Vibrionen sind sowohl im Brackwasser, in Küstennähe als auch im offenen Ozean detektierbar (MARTINEZ-URTAZA *et al.*, 2011; TURNER *et al.*, 2013a; YAN *et al.*, 2011). Aus dem Sediment wurde *V. parahaemolyticus* das ganze Jahr über isoliert und für *V. cholerae* und *V. parahaemolyticus* konnte eine saisonale Migration zwischen dem Sediment im Winter und Zooplankton sowie der Wassersäule im Sommer gezeigt werden (BROBERG *et al.*, 2011; DETER *et al.*, 2010b; HOOD und NESS, 1982; HUEHN, 2012a; KANEKO und COLWELL, 1973).

Durch den Besitz von Chitinasen können sich Vibrionen in das Exoskelett von Krustentieren einbetten und diese permanent besiedeln. Außerdem stellen sie einen großen Anteil der natürlichen Mikroflora von Zooplankton dar, besonders von Zooplankton mit Chitin-Exoskelett, wie z. B. Kopepoden (CARLI *et al.*, 1993; CHOWDHURY *et al.*, 1989; HUQ *et al.*, 1983; NAIR *et al.*, 1988; SARKAR *et al.*, 1983). Zooplankton kann somit als ein Hauptreservoir von Vibrionen angesehen werden (ARAGI *et al.*, 1977).

Des Weiteren sind *Vibrio* spp. häufig als Kommensalen bzw. als natürliche Flora im Verdauungstrakt und auf der Oberfläche von marinen Lebewesen zu finden, wie z. B. Salmoniden, Garnelen und Austern (ABBOTT *et al.*, 1989; OLAFSEN *et al.*, 1993; OXLEY *et al.*, 2002; YOSHIMIZU *et al.*, 1976).

Krustentiere und Muscheln, die ihre Nahrung durch Filtration des Meerwassers aufnehmen, können Bakterien, wie *V. parahaemolyticus* und andere *Vibrio* spp., akkumulieren, sodass die Konzentration der Bakterien in ihrem Inneren die des Wassers um das bis zu 1000-fache übersteigt (CAVALLO und STABILI, 2002). In Muscheln und Austern werden generell höhere Zelldichten im Hepatopankreas als im Muskelfleisch gefunden (DEPAOLA *et al.*, 1997; TAMPLIN und CAPERS, 1992).

Vor allem im Winter konnten Vibrionen auch im Kot von Wasservögeln nachgewiesen werden, die somit auch als Vektor dienen, um *Vibrio* spp. in der Umwelt zu verteilen (BUCK, 1990; MIYASAKA *et al.*, 2006). Insgesamt wurde aber eine eher niedrige Belastung des Vogelkots mit *Vibrio* spp. beobachtet.

## 1.4.3 Vektoren zur Verbreitung von *V. parahaemolyticus*

Neben der Verbreitung durch Meeresströmungen kann *V. parahaemolyticus* durch verschiedene Vektoren lokal, aber auch global verbreitet werden (VELAZQUEZ-ROMAN *et al.*, 2014). Dazu zählen mit Bakterien belastete Meerestiere, Phyto- und Zooplankton und Vögel sowie Ballastwasser von Schiffen oder an Schiffen anhaftende Biofilme, die *V. parahaemolyticus* enthalten (ALTUG *et al.*, 2012; BUCK, 1990; FERNANDEZ-PIQUER *et al.*, 2011; FLEGEL und FEGAN, 2002; MARTINEZ-URTAZA *et al.*, 2011; RIVERA *et al.*, 2012; VELAZQUEZ-ROMAN *et al.*, 2014). Für Schrimps aus Aquakulturen wurden diverse Kontaminations- und Verbreitungsmöglichkeiten identifiziert: So kann durch Seewasser, Eier, Futter oder Ausrüstung eine Kontamination bei der Larvenanzucht in speziellen zentralisierten Einrichtungen auftreten (OTTA *et al.*, 1999, 2001; VANDENBERGHE *et al.*, 1999; VASEEHARAN und RAMASAMY, 2003). Durch diese Einrichtungen erfolgt eine Verteilung der *V. parahaemolyticus*-enthaltenden Larven an ggf. geographisch nicht benachbarte Farmen. LIGHTNER *et al.* (1997) haben für die Transmission von

Schrimps-assoziierten Viren verschiedene Möglichkeiten vorgestellt: Durch die Weiterverwertung von (importierten) Schrimps in Fischereihäfen könnten flüssige und feste Abfälle ins Meer gelangen, die *V. parahaemolyticus* enthalten. Außerdem könnten Vögel, wie z. B. Möwen, die weggeworfenen Köpfe und Schalen von weiterverarbeiteten Schrimps fressen und die enthaltenen Viren mit ihren Ausscheidungen in der Umwelt verteilen. Diese Transmissions-Wege können auch auf assoziierte Bakterien übertragen werden.

### 1.4.4 *V. parahaemolyticus* in Lebensmitteln

Da *V. parahaemolyticus* zur typischen Bakterienflora der Küstengewässer gehört und sich vor allem in den wärmeren Monaten schnell vermehren kann, wird die Spezies besonders im Sommer häufig aus Meeresfrüchten und Fischen isoliert (KAYSNER und DEPAOLA, 2004). Die meisten *V. parahaemolyticus*-Stämme aus Umwelt- oder Lebensmittelproben sind apathogen. Dennoch ist es wichtig, die Abwesenheit von pathogenen Stämmen zu bestätigen bzw. die Anwesenheit dieser zuverlässig festzustellen (vgl. Abschnitt 1.7.13).

Untersuchungen von Muscheln, Meeresfrüchten und Meerwasser zeigten in Deutschland sowie dem europäischen und außer-europäischen Ausland hohe Prävalenzen von *V. parahaemolyticus* und anderen *Vibrio* spp. (Tabelle 2). Dabei konnten i. d. R. mehrere *Vibrio* spp. parallel in den untersuchten Proben nachgewiesen werden.

Durch den Verzehr von rohen oder nicht ausreichend gegarten Muscheln und Meeresfrüchten, die als Kommensalen *V. parahaemolyticus* in sich tragen, können Infektionen entstehen. Auch nach dem Verzehr gegarter Krustaceen (z. B. Hummer und Garnelen) kam es zu Infektionen durch *V. parahaemolyticus* (BLAKE *et al.*, 1980). Da *V. parahaemolyticus* sehr empfindlich auf Hitze reagiert, resultiert das Vorhandensein in gegarten Produkten entweder aus unzureichender Erhitzung oder Rekontamination nach dem Kochvorgang (SIEFFERT und STOLLE, 2002; YEUNG und BOOR, 2004). Eine weitere Infektionsquelle stellen kreuzkontaminierte verzehrfertige stark gesalzene Lebensmittel dar (MA *et al.*, 2014).

Im asiatischen Raum, insbesondere in Japan und Taiwan, sind *V. parahaemolyticus*-Infektionen, hervorgerufen durch roh verzehrten Fisch, die Hauptursache für lebensmittelassoziierte Infektionen (OKABE, 1974; PAN *et al.*, 1996; PAN *et al.*, 1997; RAHMAN *et al.*, 2009). Dagegen entstehen Infektionen in den USA und Europa vornehmlich durch den Verzehr roher Austern und anderer Muscheln (MARTINEZ-URTAZA *et al.*, 2005; NOLAN *et al.*, 1984; RIPPEY, 1994). Neben Einzelfällen treten immer wieder Ausbrüche von *V. parahaemolyticus*-Infektionen auf, die stets durch den Verzehr von Lebensmitteln bedingt sind.

Vermutlich durch die Erwärmung des Meerwassers und Veränderungen der Plankton-Population nimmt die Möglichkeit einer *Vibrio*-Infektion zu (BAKER-AUSTIN *et al.*, 2012; MARTINEZ-URTAZA *et al.*, 2011). So konnte allein in den USA seit 1996 eine Verdopplung der lebensmittelassoziierten *Vibrio*-Infektionen beobachtet werden (CDC, 2010; SCALLAN *et al.*, 2011). Verglichen mit 2007 bis 2011 wurde in den Jahren 2012 und 2013 eine Verdreifachung der durch *V. parahaemolyticus* hervorgerufenen Infektionen in den USA registriert (NEWTON *et al.*, 2014).

**Tabelle 2:** Auswahl von Studien zur Prävalenz von *Vibrio* spp. und *V. parahaemolyticus* in Lebensmittelproben

Art der Probe (Probenanzahl)	Land	Zeitraum der Untersuchung	<i>Vibrio</i> spp.-positive Proben	Davon <i>Vp</i>	Referenz
Krusten- und Schalentiere (82)	Deutschland	2001	19,5 %	6,3 %	SIEFFERT und STOLLE (2002)
Miesmuscheln (82)	Deutschland	2004-2005	74,4 %	39,5 %	LHAFI und KUHNE (2007)
Fische, Muscheln und Krebstiere (710)	Deutschland	k. A.	17,7 %	29,4 %	LEHMACHER und HANSEN (2007)
Muscheln (50)	Deutschland	2007-2008	92 %	20 %	JUDEK <i>et al.</i> (2008)
Garnelen und Muscheln (338)	Deutschland	2008-2009	12,1 %	82,9 %	MESSELHAUSSER <i>et al.</i> (2010)
Muscheln (82)	Deutschland	2009-2010	50 %	15 %	RANDT <i>et al.</i> (2011)
Muscheln (62)	Italien	1997-1998	48,4 %	3,3 %	RIPABELLI <i>et al.</i> (1999)
Muscheln und Meerwasser (726)	Italien	2 Jahre	46,9 %	10 %	CROCI <i>et al.</i> (2001)
Miesmuscheln (885)	Norwegen	2002-2004	n. u. <sup>1</sup>	10,3 %	BAUER <i>et al.</i> (2006)
Muscheln (147)	Italien	2011-2012	n. u. <sup>1</sup>	40,8 %	SUFFREDINI <i>et al.</i> (2014)
Austernchargen (350)	USA und Kanada	1998-1999	n. u. <sup>1</sup>	72,9 %	COOK <i>et al.</i> (2002)
Austern (156)	USA	1999-2000	100 %	100 %	DEPAOLA <i>et al.</i> (2003a)
Muscheln (173)	Japan	2001	n. u. <sup>1</sup>	95,8 %	HARA-KUDO <i>et al.</i> (2003)
Meeresfrüchte und Fisch (123)	Senegal	2007-2009	n. u. <sup>1</sup>	30,1 %	COLY <i>et al.</i> (2013)
Garnelen in Garnelenfarmen (16)	Thailand	2007-2009	100 %	37,5 %	YANO <i>et al.</i> (2014)
Muscheln (84)	Chile	2008-2009	n. u. <sup>1</sup>	88,1 %	GARCIA <i>et al.</i> (2009)
Garnelenfarmen (170)	Sri Lanka	2010-2011	95,1 % <sup>2</sup>	91,2 % <sup>2</sup>	KORALAGE <i>et al.</i> (2012)
Krabben, Krebse, Herzmuscheln (120)	Ägypten	2011	n. u. <sup>1</sup>	41,7 % <sup>3</sup>	ABD-ELGHANY und SALLAM (2013)

n. u., nicht untersucht; *Vp*, *V. parahaemolyticus*

<sup>1</sup> Die Proben wurden nur auf das Vorhandensein von *V. parahaemolyticus* hin untersucht.

<sup>2</sup> bezogen auf die untersuchten Becken

<sup>3</sup> kultureller Nachweis, biochemischer Nachweis bei 33,3 % der Proben

## 1.5 Stressantwort

Um die quantitative Belastung von Lebensmitteln mit Vibrionen zu verringern, sind verschiedene technologische Prozesse möglich. Dabei ist zu beachten, dass sich *Vibrio* spp. an Stressbedingungen adaptieren und dadurch höhere Resistenzen gegenüber nachfolgenden Stressbedingungen ausbilden können (CHANG *et al.*, 2004; WHITAKER *et al.*, 2010). Verschiedene Methoden zur Reduktion von *Vibrio* spp. in Lebensmitteln sind in Tabelle 3 vorgestellt. Auch im marinen Lebensraum und in Assoziation mit eukaryotischen Wirten begegnet *V. parahaemolyticus* einer Vielzahl von verschiedenen Umweltbedingungen, die als Stressoren wirken können. Häufig tragen die Systeme zur Stressantwort auch dazu bei, dass sich *V. parahaemolyticus* im Wirt etablieren kann. Über die vermehrte Expression von alternativen Sigma-Faktoren und Stressproteinen wird die Lebensfähigkeit gesichert und die Stressresistenz weiter erhöht (VASUDEVAN und VENKITANARAYANAN, 2006).

**Tabelle 3:** Auswahl von Studien zur Reduktion von *Vibrio* spp. in Lebensmitteln durch technische Prozessierung

Behandlung	Reduktion	Referenz
Thermisch durch Pasteurisierung und Kälteschock	4 bis 5 log CFU	ANDREWS <i>et al.</i> (2003a)
Thermisch durch Tiefkühlung	2 log CFU	VANDERZANT und NICKELSON (1972)
Bestrahlung mit Gamma-Strahlen	4 bis 6 log CFU	MALLETT <i>et al.</i> (1991); RASHID <i>et al.</i> (1992)
Hochdruck	4 bis 9 log CFU	CALIK <i>et al.</i> (2002); KOO <i>et al.</i> (2006); KURAL und CHEN (2008)
Veränderung des pH-Wertes	3 log CFU	VANDERZANT und NICKELSON (1972)
Zusatz von Limettensaft	5 log CFU	MATHUR und SCHAFFNER (2013)
Saures Elektrolysewasser	5 log CFU	WANG <i>et al.</i> (2014)
Silber Nanopartikel	7 log CFU <sup>1</sup>	ZAREI <i>et al.</i> (2014)

CFU, Kolonie bildende Einheiten (colony forming units)

<sup>1</sup> Behandlung zur Dekontamination von Geräten und Oberflächen in der lebensmittelverarbeitenden Industrie.

### 1.5.1 Stresssensoren und Regulatoren

Um auf auftretende Stressoren zu reagieren, benötigen Bakterien Systeme, mit denen sie Veränderungen der extrazellulären Umweltbedingungen wahrnehmen und die entsprechenden Reaktionen einleiten können. Wichtige Mechanismen zur Genregulation bei Stress stellen Zweikomponentensysteme und unterschiedliche Sigma-Faktoren dar.

#### Zweikomponentensystem ToxRS

*Vibrionaceae* besitzen das bisher ausschließlich für diese Familie beschriebene Zweikomponentensystem ToxRS. Bei *V. parahaemolyticus* wurde ein System identifiziert, das eine Homologie von 52 % bzw. 62 % auf Nukleotid-Ebene zu dem intensiv untersuchten ToxRS-System von *V. cholerae* aufweist (LIN *et al.*, 1993). ToxR fungiert sowohl als Sensor als auch Response-Regulator (MILLER und MEKALANOS, 1984). Die periplasmatische Domäne des Proteins dient als Sensor und reagiert u. a. auf Veränderungen des pH-Wertes, der Temperatur, vorhandener Aminosäuren und der Osmolarität (MILLER und MEKALANOS, 1988; MILLER *et al.*, 1987). Als Antwort auf Umweltveränderungen bildet ToxR Homodimere (DZIEJMAN und MEKALANOS, 1994; OTTEMANN und MEKALANOS, 1995). Dies führt zu einer Konformationsänderung des cytoplasmatischen Teils, der daraufhin an Desoxyribonukleinsäure (DNA) binden kann. Das Gen *toxR* wird zusammen mit dem Gen *toxS* transkribiert. ToxS interagiert mit der periplasmatischen Domäne von ToxR, stabilisiert auf diese Weise die ToxR-Homodimere und ermöglicht so die Bindung der Dimere an entsprechende Promotorregionen (DIRITA und MEKALANOS, 1991). Somit wird ToxS zur Expression des ToxR-Regulons benötigt. Bei *V. cholerae* aktiviert ToxR das Gen *toxT*, das direkt die Expression des Cholera-Toxins und des Toxin co-regulierten Pilus reguliert (DIRITA *et al.*, 1991). Zusätzlich ist ToxRS wichtig für das Überleben bei wechselnden Umweltbedingungen. Dabei reguliert ToxR direkt die Expression der beiden Porine OmpU und OmpT der äußeren Membran (PROVENZANO und KLOSE, 2000) (vgl. Abbildung 6 in Abschnitt 1.5.3.3). Bei *V. parahaemolyticus* ist das ToxRS-System an der Regulation von *tdh* beteiligt (LIN *et al.*, 1993). *V. parahaemolyticus* besitzt nur ein Homolog zu OmpU (66 %) und keine zu OmpT und ToxT. Zusätzlich besitzt *V. parahaemolyticus* ein zweites ToxRS-Regulon, das innerhalb der Typ III Sekretionssystem 2-Insel (T3SS2) liegt und eine indirekte Funktion bei der Regulation der *tdh*- und T3SS2-Expression besitzt (GOTOH *et al.*, 2010; KODAMA *et al.*, 2010). WHITAKER *et al.* (2010) haben die Expression des ToxRS-Regulators bei verschiedenen

Umweltbedingungen untersucht und konnten eine Induktion bei leichtem pH-Stress (pH 5) und niedrigen Salzkonzentrationen (1 % NaCl) zeigen. Diese Induktion könnte ein Hinweis dafür sein, dass ToxRS an der durch Umweltveränderungen induzierten Änderung der Genexpression beteiligt ist. So war eine Mutante mit fehlendem *toxRS* nicht mehr in der Lage, die adaptive Säuretoleranz gegenüber anorganischen und organischen Säuren auszubilden. Die genauen Mechanismen der durch das ToxRS-System vermittelten Resistenzen in *V. parahaemolyticus* sind unbekannt (WHITAKER und BOYD, 2012). Da aber wie bei *V. cholerae* OmpU vorhanden ist, ist es wahrscheinlich, dass dieses Protein einen Einfluss auf die Säuretoleranz besitzt. Bei *V. parahaemolyticus* RIMD 2210633 wird ToxRS durch die Gene VP0819 und VP0820 auf Chromosom 1 codiert (MAKINO *et al.*, 2003).

### Alternative Sigma-Faktoren

Eine weitere Möglichkeit zur Regulation der Genexpression stellen alternative Sigma-Faktoren dar. Sigma-Faktoren sind bakterielle Proteine, die reversibel an die RNA-Polymerase binden und so das fertige Holoenzym bilden. Durch den gebundenen Sigma-Faktor kann das Holoenzym die für den Sigma-Faktor spezifischen Promotorsequenzen erkennen. Nach der Initiation der Transkription dissoziiert der Sigma-Faktor vom Holoenzym-Komplex und die RNA-Polymerase setzt die Elongation fort (HELMANN und CHAMBERLIN, 1988; KAZMIERCZAK *et al.*, 2005). Bei *Escherichia (E.) coli* wird die Genexpression unter normalen Bedingungen durch den primären Sigma-Faktor RpoD (auch als  $\sigma^{70}$  bezeichnet) kontrolliert. Alternative Sigma-Faktoren werden verwendet, um die Transkription unter spezifischen Umweltbedingungen zu steuern und so als Antwort auf wechselnde Bedingungen schnell die Genexpression zu verändern. Die Anzahl der alternativen Sigma-Faktoren kann je nach Spezies variieren.

Der Sigma-Faktor RpoS ( $\sigma^{38}$ ) wurde sowohl in gramnegativen als auch grampositiven Bakterien identifiziert und ist bei den Enterobakterien *E. coli* und *Salmonella enterica* essentiell für die Transkription von Genen, die für das Überleben der Zellen in der stationären Phase und bei verschiedenen Stressbedingungen notwendig sind (FANG *et al.*, 1992; KAZMIERCZAK *et al.*, 2005; LANGE und HENGGE-ARONIS, 1991). In der stationären Phase wird RpoS zur Induktion vieler Gene für Chemotaxis, Motilität, Produktion der Flagelle und für das Schwärmen benötigt (NIELSEN *et al.*, 2006). Bei *E. coli* ist RpoS an der Säuretoleranz- und Osmotoleranz-Antwort beteiligt und bei *Salmonella enterica* Subspezies *enterica* Serovar (S.) Typhimurium ein Hauptregulator der Virulenz (ARNOLD *et al.*, 2001; CULHAM *et al.*, 2001; FANG *et al.*, 1992; KAZMIERCZAK *et al.*, 2005). Bei *V. cholerae* konnte gezeigt werden, dass RpoS für das Überleben bei Wasserstoffperoxid-Stress, hyperosmotischem Stress und Kohlenstoffmangel (carbon starvation) sowie für das Überleben *in vivo* notwendig ist (MERRELL und CAMILLI, 2000; YILDIZ und SCHOOLNIK, 1998). Für *V. parahaemolyticus* RIMD 2210633 wurde dagegen gezeigt, dass das Überleben einer *rpoS*-Response-Regulator-Deletionsmutante *in vivo* nicht beeinträchtigt war (HAINES-MENGES *et al.*, 2014). Außerdem war RpoS an der Repression von Virulenz-Genen *in vivo* und *in vitro* beteiligt (YILDIZ und SCHOOLNIK, 1998). *V. cholerae*, isoliert aus Ileumschlingen oder Mukus, zeigte eine signifikante RpoS-abhängige Induktion von Genen, die an der Chemotaxis und Motilität beteiligt sind (YILDIZ und SCHOOLNIK, 1998).

Der alternative Sigma-Faktor RpoE ( $\sigma^{24}$ ) ist bei *E. coli* an der Antwort auf Stress der äußeren Membran, wie z. B. durch Detergenzien und antimikrobielle Peptide, beteiligt. Bei normalen Bedingungen wird RpoE durch einen Anti-Sigma-Faktor inaktiviert, der RpoE an der inneren Membran hält, bis Stress an der Membran entsteht oder fehlgefaltete Proteine im Periplasma auftreten. Dann

wird RpoE proteolytisch vom Anti-Sigma-Faktor abgespalten und steuert die Transkription der entsprechenden Gene (BASHYAM und HASNAIN, 2004). Auch bei *V. cholerae* konnte gezeigt werden, dass RpoE eine wichtige Rolle bei der Antwort auf Stress an der äußeren Membran und durch antimikrobielle Peptide spielt (MATHUR *et al.*, 2007; WALSH *et al.*, 2003). Das Protein OmpU könnte als Signal zur Aktivierung von RpoE dienen und wäre somit initial an der Reaktion auf Stress an der äußeren Membran beteiligt (MATHUR *et al.*, 2007; WALSH *et al.*, 2003). Bei *V. parahaemolyticus* RIMD 2210633 wurde ein homologes Protein identifiziert (VP2578), das bei einer Vielzahl von an der äußeren Membran wirkenden Stressoren sowie zum Überleben in und zur gastrointestinalen Kolonisation von Streptomycin-behandelten Mäusen benötigt wird (HAINES-MENGES *et al.*, 2014). Eine *rpoE*-Deletionsmutante war sensitiver gegenüber Polymyxin-B, Ethanol und hohen Temperaturen. Eine *ompU*-Deletionsmutante wies eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Gallensäure auf, die Resistenz gegenüber Polymyxin-B war aber unverändert, sodass OmpU nicht essentiell an der Antwort auf Stress an der äußeren Membran oder der Funktion von RpoE beteiligt zu sein scheint.

RpoH ( $\sigma^{32}$ ) ist der alternative Sigma-Faktor, der für die Transkription von Hitzeschock-Genen verantwortlich ist (YURA *et al.*, 1993). Bei Hitze ist die Boten-RNA (mRNA) transient stabiler, akkumuliert und führt so zu einer verstärkten Expression der Hitzeschock-Gene. Wurden ausreichend Hitzeschock-Proteine (HSP) gebildet, wird die Aktivität von RpoH reduziert, indem die HSPs die Interaktion des Sigma-Faktors mit der RNA-Polymerase stören.

Bei *V. parahaemolyticus* RIMD 2210633 sind die Sigma-Faktoren RpoD, RpoH und RpoS durch die Gene VP0404, VP2953, VP2553 sowie RpoE durch die zwei Gene VP2578 und VPA1690 codiert (MAKINO *et al.*, 2003).

### 1.5.2 Stress in der Umwelt

Im aquatischen Lebensraum müssen Bakterien z. B. bei wechselnden Temperaturen und Salzkonzentrationen sowie mit limitiertem Nährstoffangebot überleben. Im Rahmen der globalen Klimaerwärmung nimmt die steigende Ozeantemperatur und die zunehmende Azidifikation der Gewässer Einfluss auf marine Populationen (WHITAKER und BOYD, 2012).

#### 1.5.2.1 Osmotischer Stress

Sowohl im aquatischen Lebensraum als auch im Wirt tritt osmotischer Stress auf. Vor allem im Mündungsgebiet von Flüssen, in dem sich Süß- und Salzwasser mischen, treten kontinuierliche und teils starke räumliche und zeitliche Fluktuationen in der Salzkonzentration auf (REEN *et al.*, 2006). *V. parahaemolyticus* benötigt zum Überleben und zur Vermehrung NaCl. Dabei toleriert das Bakterium NaCl-Konzentrationen zwischen 0,5 % und 10,5 % (NAUGHTON *et al.*, 2009; ONGAGNA-YHOMBI und BOYD, 2013). Die natürlichen NaCl-Konzentrationen mariner Habitats liegen zwischen 0,8 % und 3,5 %, wobei ca. 95 % des gesamten Wassers mit 3,5 % NaCl sogar im für *V. parahaemolyticus* optimalen Bereich der NaCl-Konzentrationen von 2 % bis 4 % liegen (DEPAOLA *et al.*, 2000). Allerdings können die NaCl-Konzentrationen vor allem im Sommer im Zuge einer vermehrten Evaporation ansteigen (MANN, 2009). Verglichen mit den anderen beiden wichtigen humanpathogenen Spezies *V. cholerae* und *V. vulnificus* besitzt *V. parahaemolyticus* die größte Osmotoleranz (NAUGHTON *et al.*, 2009).

Obwohl *V. parahaemolyticus* zu den halophilen Bakterien zählt und das Konzentrationsgefälle von

Natrium-Ionen verschiedene Transportsysteme (z. B. für Kohlenhydrate und Aminosäuren), aber auch die Rotation der Flagelle antreibt, können zu hohe, aber auch zu niedrige Salzkonzentrationen negative Effekte auf das Überleben und die Vermehrung der Bakterienzelle haben (KURODA *et al.*, 2005; WOOD, 2011). Um den Zellturgor aufrechtzuerhalten, müssen Bakterienzellen einen intrazellulären osmotischen Druck erzeugen, der höher ist als der extrazelluläre osmotische Druck. Der Zellturgor wird als treibende Kraft bei Zellextension, Wachstum und Teilung angesehen (SLEATOR und HILL, 2002). Bei osmotischem Stress wird die Zellhomöostase gestört, indem Wasser innerhalb weniger Sekunden über die semipermeable Cytoplasmamembran entweder aus dem Cytoplasma heraus oder in es hinein strömt (WOOD, 2011).

Liegen hohe extrazelluläre Salzkonzentrationen vor, strömt Wasser schnell aus der Zelle hinaus, was zu einem Schrumpfen der Zelle, einem verringerten Turgor und einer relativen Erhöhung der Ionen-Konzentration im Cytoplasma führt (CSONKA und HANSON, 1991). Diese Prozesse dienen als Signal für die Induktion von Systemen zur Wiederherstellung des normalen Turgors (BALAJI *et al.*, 2005; CSONKA und HANSON, 1991). Außerdem werden die meisten membranbasierten bioenergetischen Funktionen und die Makromolekülsynthese inhibiert, während bestehende Systeme zur Osmoregulation aktiviert werden und die Expression von osmoregulatorischen Genen induziert wird. Die Reaktion ist dabei abhängig von der Verfügbarkeit von Osmoprotektanten, die aufgenommen werden und als kompatible Solute oder deren Vorläufer dienen (WOOD, 2011).

Um sich vor hohen extrazellulären Salzkonzentrationen zu schützen, haben Bakterien zwei Systeme entwickelt. Das erste System, das vor allem bei *Archaea* und einigen halophilen Bakterien vorhanden ist, besteht darin,  $K^+$ -Ionen und organische Anionen wie Glutamat aufzunehmen, um die hohe extrazelluläre osmotische Konzentration auszugleichen (ROBERTS, 2004). Viele Spezies benutzen dieses System, um sich kurzzeitig vor dem hohen osmotischen Druck zu schützen. Als langfristiger Schutz ist es aber ungeeignet, da eine hohe Konzentration von intrazellulärem  $K^+$  dauerhaft auch schädliche Effekte auf die Zelle ausübt. Daher ist diese Methode in den meisten Spezies nur transient (BROWN, 1976; EMPADINHAS und DA COSTA, 2008; GALINSKI, 1995; SANTOS und DA COSTA, 2002).

Das zweite System, das in den meisten Bakterien und einigen Eukaryoten anzutreffen ist, besteht aus der Verwendung von kompatiblen Soluten (DA COSTA *et al.*, 1998; GALINSKI, 1995; SLEATOR und HILL, 2002). Kompatible Solute sind kleine gut wasserlösliche Moleküle, die auch in hohen Konzentrationen ( $> 500$  mM) keine größeren inhibitorischen Effekte auf zelluläre Prozesse haben und daher langfristig im Cytoplasma akkumuliert werden können (ATKINSON, 1969; BROWN und SIMPSON, 1972; DA COSTA *et al.*, 1998). Neben ihrer Funktion beim Ausgleich hoher Osmolaritäten dienen sie auch zum Schutz bei hoher Temperatur, Gefrier-Auftau-Stress und Austrocknung, indem sie die enzymatische Aktivität stabilisieren (DA COSTA *et al.*, 1998; SLEATOR und HILL, 2002; WELSH, 2000). Sie können entweder aus dem extrazellulären Raum aufgenommen oder *de novo* synthetisiert werden (EMPADINHAS und DA COSTA, 2008; GÖLLER, 1999; JEBBAR *et al.*, 1997; WOOD, 2011). Da dazu meist Proteine neu synthetisiert werden müssen, akkumulieren kompatible Solute i. d. R. langsamer als  $K^+$ -Ionen. Kompatible Solute können Zucker wie Trehalose, freie Aminosäuren wie Prolin und Glutamat sowie Aminosäurederivate wie Betain und Ectoin oder Ester und Amine sein (DA COSTA *et al.*, 1998; GALINSKI, 1995).

Zwei unter Bakterien weit verbreitete kompatible Solute sind Betain und Ectoin. Betain (*N,N,N*-

Trimethylammonioacetat) wird von den meisten Prokaryoten durch die Umwandlung von Cholin zu Betain-Aldehyd und weiter zu Betain synthetisiert. Die Gene *betABI* codieren für die Enzyme, die zur Synthese von Betain benötigt werden (LAMARK *et al.*, 1991). Ectoin ((S)-2-Methyl-1,4,5,6-tetrahydropyrimidin-4-carbonsäure) wird vor allem von halophilen Prokaryoten hergestellt und die Synthese durch die Gene *ectABC* realisiert. Aspartat wird in zwei Schritten zu L-Aspartat- $\beta$ -semialdehyd umgewandelt, dieses dann im Ectoin-Syntheseweg in drei Schritten zu Ectoin konvertiert (PFLUGHOEFT *et al.*, 2003).

Neben der *de novo* Synthese können die fertigen kompatiblen Solute auch direkt aus der Umwelt aufgenommen werden, wenn sie z. B. von Mitgliedern der mikrobiellen Gemeinschaft synthetisiert und sekretiert worden sind oder durch verrottendes Pflanzenmaterial und Wurzelexsudate in die Umwelt eingetragen werden (HOLTMANN, 2002; KAPFHAMMER *et al.*, 2005). Die Aufnahme erfolgt mittels spezieller Transporter wie den Betain/Carnitin/Cholin-Transportern (BCCTs) sowie durch das ProU-System, das eine Vielzahl fertiger Solute und deren Vorläufer transportieren kann (WHITAKER und BOYD, 2012; ZIEGLER *et al.*, 2010).

Bei zu niedrigen extrazellulären Salzkonzentrationen strömt Wasser in die Zelle ein, die Membran wird plötzlich gedehnt und der Turgor erhöht sich. Dabei öffnen sich mechanosensitive Kanäle (MSCs) in der Membran, die den unspezifischen Efflux von cytoplasmatischen Soluten und nachfolgend Wasser erlauben und so die Zellyse verhindern (BOOTH *et al.*, 2007; KUNG *et al.*, 2010; LEVINA *et al.*, 1999). Bei *V. cholerae* konnte gezeigt werden, dass verschiedene MSCs (homolog zu MscS bzw. MscL) aktiviert werden, je nachdem wie stark die Membran gedehnt wird (ROWE *et al.*, 2013). Obwohl *V. cholerae* im Vergleich zu *E. coli* insgesamt eine höhere Dichte an MSCs besitzt, ist die beobachtete Toleranz gegenüber verringerten Salzkonzentrationen niedriger (ROWE *et al.*, 2013). Die Ursachen liegen vermutlich in Unterschieden in der Festigkeit der Membran, der Zellgeometrie, der Wasserpermeabilität, der cytoplasmatischen Osmolyte und der Permeabilität der MSCs. *V. alginolyticus* besitzt keine zu MscL homologen MSCs und reagiert deutlich empfindlicher auf Verringerungen der Osmolarität (NAKAMARU *et al.*, 1999). Bei *V. parahaemolyticus* RIMD 2210633 konnten bisher drei verschiedene putative MscS-Homologe identifiziert werden (VP2168, VPA1439, VPA1501), deren Eigenschaften allerdings noch nicht untersucht wurden (JENSEN *et al.*, 2013; MAKINO *et al.*, 2003).

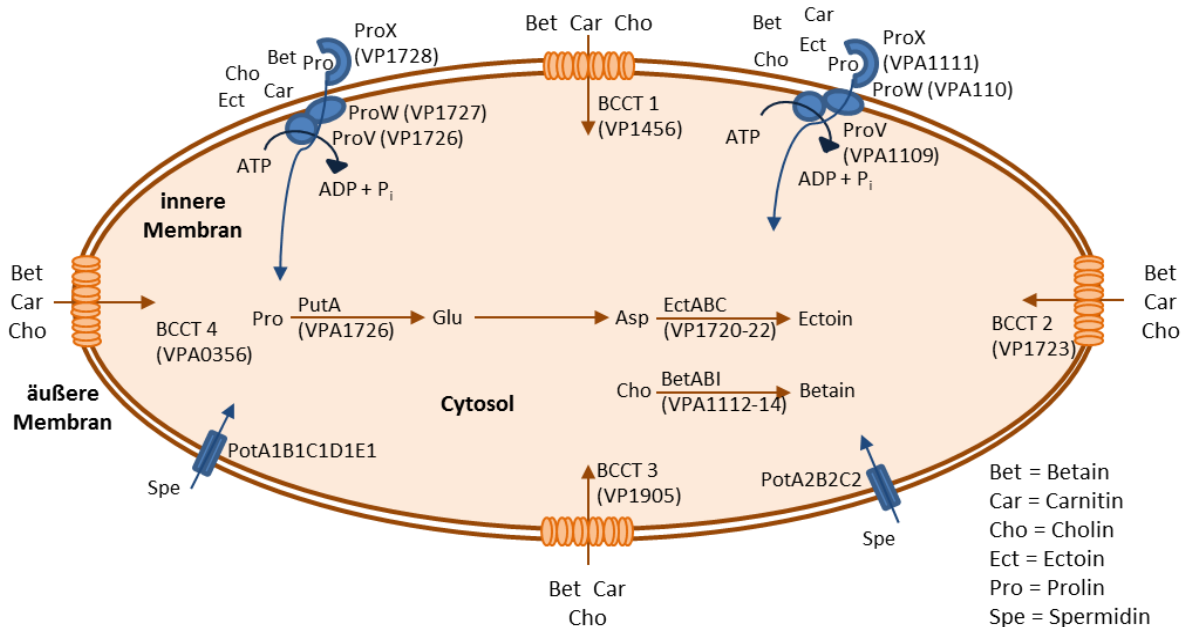
Außerdem konnte bei *V. parahaemolyticus* gezeigt werden, dass Gene, die am Energie-Transfer zur äußeren Membran beteiligt sind und die Aktivität von Energie-verbrauchenden Transportern ermöglichen, bei niedrigen Salzkonzentrationen reprimiert werden (YANG *et al.*, 2010). Im Gegensatz dazu waren Gene des *groESEL*-Operons auf Chromosom 2 (VPA0286-0287) induziert, die dazu beitragen, neusynthetisierte oder durch Stress denaturierte Polypeptide vor Fehlfaltung und Aggregation zu schützen. Weiterhin waren Gene des FeoAB-Systems induziert, das spezifisch für den Transport von  $Fe^{3+}$ -Ionen verantwortlich ist (HANTKE, 2003; YANG *et al.*, 2010).

Bioinformatische Analysen des *V. parahaemolyticus* RIMD 2210633 Genoms haben gezeigt, dass mehrere Systeme zur *de novo* Synthese und zum Transport von kompatiblen Soluten codiert werden (MAKINO *et al.*, 2003). Diese sind in Abbildung 2 dargestellt. *V. parahaemolyticus* RIMD 2210633 codiert je ein putatives System zur Synthese von Betain (*betABI*) bzw. Ectoin (*ectABC*), vier putative BCCTs sowie zwei Systeme zu Aufnahme und Transport von Prolin, (Glycin-)Betain, Ectoin und deren Vorläufern (*proVWX*) (NAUGHTON *et al.*, 2009; REEN *et al.*, 2006). Außerdem konnten zwei *pot-*



ähnliche Transporter (*potA1B1C1D1E1* und *potA2B2C2*) identifiziert werden, die an der Spermidin-Aufnahme beteiligt sind (YANG *et al.*, 2010). Das Ectoin-Synthese-System wird mit der durch *lysC*-codierten Aspartat-Kinase in einem Operon coexprimiert, wobei diese Kinase als limitierender Faktor in der Ectoin-Synthese beschrieben wurde (MAKINO *et al.*, 2003; YANG *et al.*, 2010). Die Gene des Ectoin-Synthese-Systems, eines BCCT und eines ProU-Transporters (homolog zu *proVWX* bei *E. coli*) liegen in einem Gencluster auf Chromosom 1, während sich die Gene des Betain-Synthese-Systems in einem Gencluster mit den Genen eines ProU-Transporters (homolog zu *proVWX* von *Pseudomonas syringae*) auf Chromosom 2 befinden. Die Synthese-Systeme scheinen spezieisweit verbreitet zu sein, da sie in 42 *V. parahaemolyticus*-Stämmen nachgewiesen werden konnten (WHITAKER und BOYD, 2012). In der transienten Phase der Antwort auf osmotischen Stress spielen vermutlich folgende Gene eine wichtige Rolle durch die Bildung von Glutamat (als Anion zu  $K^+$ ): zwei putative Glutaminsynthetase-Gene (VP0121, VP1781), ein Glutamat-Synthetase-Gen (VPA0765), ein Glutamat-Synthese-Gencluster (VP0481-84) sowie ein Gen (VPA1726), das für ein Enzym zur reversiblen Umwandlung von Glutamat zu Prolin codiert (LUCHT und BREMER, 1994; MCLAGGAN *et al.*, 1994; ONGAGNA-YHOMBI und BOYD, 2013). *V. parahaemolyticus* besitzt verglichen zu *V. cholerae* viermal und zu *V. vulnificus* doppelt so viele Systeme zur Aufnahme und Synthese von kompatiblen Soluten, wodurch der Wachstumsvorteil von *V. parahaemolyticus* bei höheren Salzkonzentrationen erklärt werden könnte (NAUGHTON *et al.*, 2009).

Bei Versuchen konnte gezeigt werden, dass *V. parahaemolyticus* in Gegenwart von 6 % NaCl den größten Wachstumsvorteil durch den Zusatz des kompatiblen Solutes Betain, gefolgt von Cholin, dann Prolin und Glutamat und zuletzt Ectoin erlangte, wobei Glutamat und Prolin auch als Kohlenstoffquelle dienen könnten (ONGAGNA-YHOMBI und BOYD, 2013). Dabei zeigten Expressionsanalysen, dass das Gen *ectA* eine höhere Expression als *betA* besaß, beide aber abhängig von der extrazellulären NaCl-



**Abbildung 2:** Transport und Synthese kompatibler Solute in *V. parahaemolyticus*

*V. parahaemolyticus* besitzt verschiedene Systeme zum Schutz bei osmotischem Stress: vier BCCT, zwei ProU-ABC-Transporter und je ein Synthesesystem für die kompatiblen Solute Ectoin und Betain. Die sechs Transportsysteme können kompatible Solute oder deren Vorläufer direkt aus dem extrazellulären Raum aufnehmen. Aus den Vorläufern kann *V. parahaemolyticus* Ectoin und Betain *de novo* synthetisieren. Modifiziert nach WHITAKER und BOYD (2012) und YANG *et al.* (2010).

Konzentration induziert wurden und vor allem die Ectoin-Synthese essentiell für das Wachstum bei hohen Salzkonzentrationen war (ONGAGNA-YHOMBI und BOYD, 2013).

Neben der Synthese und dem Transport von kompatiblen Soluten konnte bei *E. coli* eine differentielle Expression von Proteinen der äußeren Membran (OMPs) und besonders der porenbildenden Proteine OmpF und OmpC bei veränderten Umweltbedingungen beobachtet werden. Der durch OmpC gebildete Kanal scheint enger zu sein als der, der durch OmpF gebildet wird (MATSUYAMA *et al.*, 2008; NIKAIDO, 2003). Demnach wird bei hohen Osmolaritäten vermehrt OmpC exprimiert, um den Influx von Salzen bzw. Ionen zu minimieren, wohingegen bei niedrigen Osmolaritäten OmpF bevorzugt synthetisiert wird, damit der Influx von seltenen Nährstoffen begünstigt wird (MATSUYAMA *et al.*, 2008; NIKAIDO, 2003). YANG *et al.* (2010) konnten zeigen, dass bei *V. parahaemolyticus* in Gegenwart von 2 % NaCl die Gene *ompW*, *ompN* und *ompA2* induziert wurden, wohingegen die Gene *ompA1*, *ompU* und VP1008 reprimiert wurden. Die vermehrte Expression von OmpW unter hohen Osmolaritäten und von OmpV unter niedrigen Osmolaritäten konnte auch durch Proteom-Studien aufgezeigt werden (XU *et al.*, 2004). Demnach ist eine Umstrukturierung der OMPs auch bei *V. parahaemolyticus* zu vermuten. Unklar ist bisher, inwieweit diese Gene an der Bildung von Porin-Kanälen beteiligt sind oder zur Veränderung der Permeabilität beitragen (YANG *et al.*, 2010). Durch die gegensätzliche Expression der beiden Proteine könnten diese, wie OmpF und OmpC bei *E. coli*, als Regulationssystem fungieren (XU *et al.*, 2004). Außerdem wurden Flagellin-Gene induziert, dies führt vermutlich zu einer Erhöhung der Na<sup>+</sup>-abhängigen Bewegungsgeschwindigkeit von *V. parahaemolyticus* bei höheren Salzkonzentrationen (XU *et al.*, 2004; YANG *et al.*, 2010).

NAUGHTON *et al.* (2009) konnten zeigen, dass *V. parahaemolyticus* durch hohe Salzkonzentrationen sowohl bei erhöhten (bis 42 °C) als auch verringerten (20 °C) Temperaturen einen Wachstumsvorteil besaß. Demnach scheinen diese Systeme zum Schutz bei hohen Osmolaritäten auch zu einer Kreuzprotektion bei Temperaturstress und ggf. auch anderen Stressoren beizutragen (vgl. Abschnitt 1.5.4).

### 1.5.2.2 Kältestress

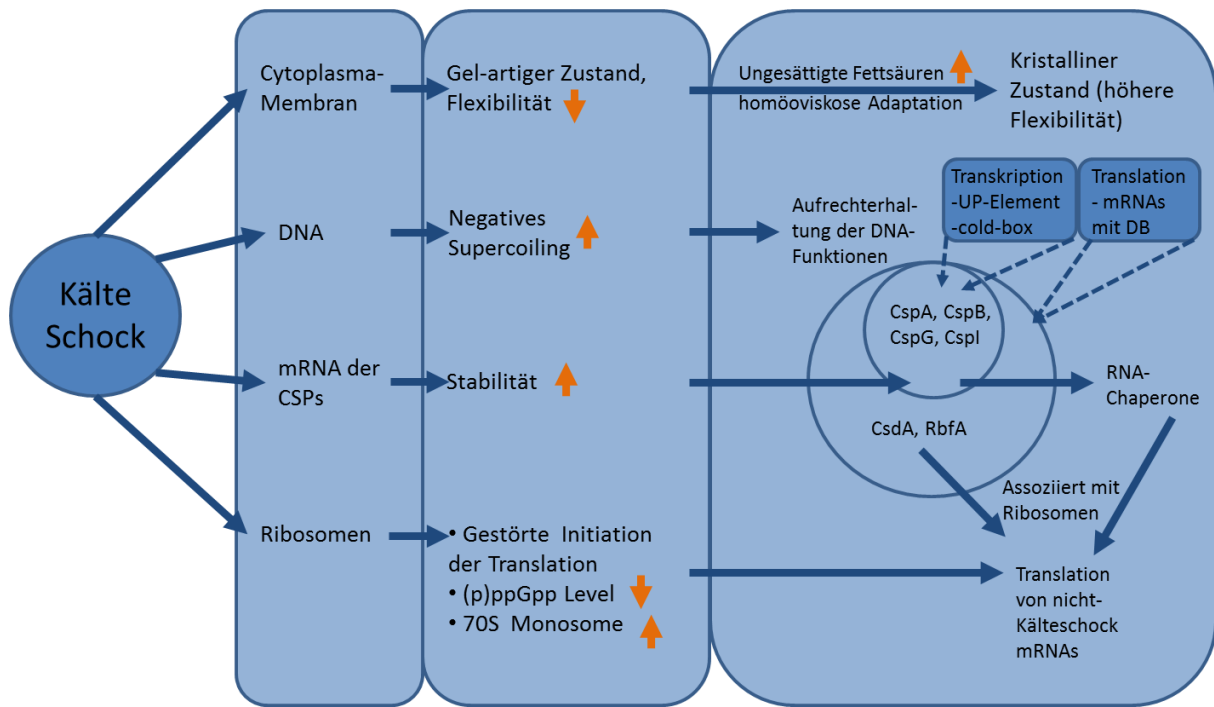
*V. parahaemolyticus* ist in der Umwelt schwankenden Temperaturen ausgesetzt. Abrupte Temperaturveränderungen treten z. B. auf, wenn die Bakterien von Tieren in die Umwelt ausgeschieden werden oder ein Lebensmittel zur Verlängerung der Haltbarkeit gekühlt bzw. gefroren wird. Die zelluläre Reaktion auf ein Absinken der Umgebungstemperatur gliedert sich in drei Phasen (PHADTARE *et al.*, 2000). Zunächst muss die Temperaturveränderung vom Bakterium wahrgenommen werden, anschließend erfolgt eine Antwort auf den Kältestress und zuletzt die Adaptation.

Die allgemeine Kältestress-Antwort wurde vor allem bei *E. coli* untersucht (Abbildung 3).

### Thermosensoren

Zur Wahrnehmung der Temperaturveränderungen dienen zelluläre Thermosensoren, wie die Membran, die Ribosomen, Nukleinsäuren sowie Proteine (PHADTARE *et al.*, 2000).

Durch Kälte verändert sich die normalerweise flüssig-kristalline Struktur der Cytoplasmamembran zu einer Gel-artigen Konsistenz. Die Membranfluidität (d. h. das Verhältnis von ungesättigten zu gesättigten Fettsäuren) hat eine entscheidende Rolle für die Funktionalität der Membran (PHADTARE *et al.*, 2000). Der Anteil an ungesättigten Fettsäuren in den Lipiden der Membran wird bei niedrigen



**Abbildung 3:** Modell zur Kältestress-Antwort in *E. coli*

CSPs, Kälteschock-Proteine; DB, downstream box; (p)ppGpp, Guanosin-5'-triphosphat-3'-diphosphat (pppGpp) und Guanosin-5'-diphosphat-3'-diphosphat (ppGpp). Modifiziert nach (PHADTARE *et al.*, 2000).

Temperaturen erhöht, da diese einen niedrigeren Schmelzpunkt als gesättigte Fettsäuren besitzen. Dieser Prozess wird als homöoviskose Adaptation bezeichnet (SINENSKY, 1974). Die Synthese des Enzyms zur Herstellung der ungesättigten Fettsäuren in *E. coli* wird nicht durch Kälte induziert, sondern durch niedrige Temperaturen lediglich aktiviert. Ein anderer Mechanismus wurde bei *Listeria (L.) monocytogenes* beschrieben: Hier dominieren verzweigte Fettsäuren das Fettsäureprofil. Um die Fluidität zu erhalten, wird die Verzweigung von der iso- zur anteiso-Form geändert (ANNOUS *et al.*, 1997).

Je höher die Temperatur ist, desto schneller laufen Reaktionen sowie zelluläre Prozesse ab: So verläuft bei hohen Temperaturen die Translation schneller, der Nachschub an beladenen tRNAs wird geringer und die A-Seite des Ribosoms ist leer (JONES *et al.*, 1992; JONES und INOUE, 1994; PHADTARE *et al.*, 2000). Bei niedrigen Temperaturen reduziert sich die Translationskapazität, die beladenen tRNAs stauen sich an und blockieren die A-Seite des Ribosoms. Dies führt zu einer verringerten Konzentration an Guanosin-5'-triphosphat-3'-diphosphat (pppGpp) und Guanosin-5'-diphosphat-3'-diphosphat (ppGpp) – im Folgenden zusammengefasst als (p)ppGpp –, da die RelA-vermittelte Synthese von (p)ppGpp inhibiert wird. Die niedrige Konzentration von (p)ppGpp bei Kälte erhöht die Expression von Kälteschock-Proteinen (CSP) und steuert so die Intensität der Kältestress-Antwort. Zudem transkribieren Ribosomen bei Kälteschock keine zellulären mRNAs, außer solche, die für Kälteschock-Proteine codieren (JONES und INOUE, 1996). Während des dadurch entstehenden Wachstumsstopps werden Kälte-unadaptierte Ribosomen zu Kälte-adaptierten Ribosomen, indem sie spezielle ribosomale Faktoren (z. B. RbfA und CsdA) binden, die während des Wachstumsstopps gebildet wurden. Diese nun Kälte-adaptierten Ribosomen sind in der Lage, alle zellulären mRNAs zu translatieren.

Auch die räumliche Struktur der DNA dient als Sensor für Temperaturveränderungen (WANG und SYVANEN, 1992). Durch die Enzyme DNA-Gyrase und DNA-Topoisomerase wird das Ausmaß des

negativen Supercoilings der DNA reguliert. Bei Kälte nimmt das negative Supercoiling vorübergehend zu. Durch diese Veränderung der Orientierung können bestimmte Erkennungsstrukturen (z. B. -35 und -10 Regionen der  $\sigma^{70}$  Promotoren) von der RNA-Polymerase nicht erkannt und die entsprechenden Gene somit nicht transkribiert werden (WANG und SYVANEN, 1992). Auch nach dem Kältetestress spielt die Topologie der DNA eine wichtige Rolle, so wird das kalteinduzierte Protein H-NS zur Adaptation an Kälte benötigt (DERSCH *et al.*, 1994; PHADTARE *et al.*, 2000). Auf RNA-Ebene wird z. B. die mRNA des Gens *cspA* bei Kälte deutlich stabilisiert, was zu einer vermehrten Synthese des Proteins führt (PHADTARE *et al.*, 2000).

### **Kälteschock-Proteine**

Bei einer Temperaturverringerung auf oder unter die minimale Wachstumstemperatur produziert *E. coli* Kälteschock-Proteine, wohingegen eine vorübergehende Inhibition der meisten zellulären Prozesse zu einem Wachstumsstopp führt (PHADTARE *et al.*, 1999). Nach der Produktion dieser Kälteschock-Proteine kann *E. coli* zu den normalen zellulären Prozessen und somit dem Wachstum zurückkehren (ERMOLENKO und MAKHATADZE, 2002; PHADTARE, 2004; WEBER und MARAHIEL, 2003).

Das Kälteschock-Protein CspA gilt als Hauptprotein der Kältetestress-Antwort, es fungiert vermutlich als RNA-Chaperon, das eine effiziente Translation bei niedrigen Temperaturen ermöglicht und als Induktor für das Kälteschock-Regulon fungiert. Die CspA-Familie bei *E. coli* besteht aus neun homologen Proteinen, die die Translation bei verschiedenen suboptimalen Temperaturen oder auch in der stationären Phase und bei Glucose-Mangel sicherstellen, wobei diese Homologe entweder konstitutiv exprimiert oder durch Kälte induziert werden (GOLDSTEIN *et al.*, 1990; LEE *et al.*, 1994; NAKASHIMA *et al.*, 1996; PHADTARE *et al.*, 1999; WANG *et al.*, 1999; YAMANAKA und INOUE, 1997). Vermutlich ist diese Genfamilie durch Genduplikationen entstanden, die sich nach Adaptation zu mehreren Gengruppen entwickelt hat, die auf verschiedene Temperaturen bzw. Stressoren reagieren (YAMANAKA *et al.*, 1998). CspA wird konstitutiv bei 37 °C exprimiert, wobei es nach Kälte-Schock eine erhöhte Aktivität durch posttranskriptionelle Regulation und erhöhte Stabilität der *cspA*-mRNA zeigt (FANG *et al.*, 1997; PHADTARE und SEVERINOV, 2005).

Der durch Kälte induzierte Trigger-Faktor TF katalysiert die cis/trans-Isomerisierung von Peptidbindungen und trägt bei Kälteschock dazu bei, dass die Synthese und Faltung von Proteinen aufrechterhalten bleibt (KANDROR und GOLDBERG, 1997). Ggf. sorgt es auch im Zusammenspiel mit dem Chaperon GroEL dafür, dass durch Kälte beschädigte Proteine neu gefaltet werden (KANDROR und GOLDBERG, 1997).

Wie bereits erwähnt, sind die ribosomalen Faktoren RbfA und CsdA nötig, damit die Ribosomen an die Kälte adaptieren und in der Lage sind, zelluläre mRNAs zu translatieren (JONES und INOUE, 1996).

Neben Kälteschock-Proteinen werden auch Kälte-adaptierte Enzyme mit erhöhter katalytischer Effizienz gebildet, um der durch die niedrigen Temperaturen verringerten Substrat-Affinität entgegen zu wirken (FIELDS, 2001; GEORLETTE *et al.*, 2004; RODRIGUES und TIEDJE, 2008).

### **Funktion der RNA-Chaperone**

CspA bindet RNA ohne spezielle Sequenz-Spezifität und mit niedriger Affinität (JIANG *et al.*, 1997). Als wichtigste Funktionen verstärkt CspA die Translation der eigenen mRNA und verändert mRNA so, dass sie anfälliger für den Abbau durch RNasen wird. Stabile Sekundärstrukturen der mRNA sind

resistent gegenüber dem Abbau durch RNasen. Durch CspA werden diese Sekundärstrukturen destabilisiert, daher gilt CspA als RNA-Chaperon (JIANG *et al.*, 1997). Diese Funktion ist essentiell, um mRNA bei niedrigen Temperaturen in ihrer linearen Form zu halten und so die Initiation der Translation zu ermöglichen. So trägt die erhöhte Konzentration von Kälteschock-Proteinen dazu bei, die höhere Stabilität der RNA-Sekundärstrukturen bei niedrigen Temperaturen zu kompensieren. CspA bindet nur sehr schwach und unspezifisch an RNA-DNA-Moleküle, sodass die Bewegung von Ribosomen an der mRNA nicht gestört wird (GRAUMANN und MARAHIEL, 1998).

### **Kältestress bei *Vibrio* spp.**

Die Kältestress-Antwort von *V. cholerae* verläuft meist analog, jedoch in Teilaspekten unterschiedlich zu der von *E. coli*. Als Reaktion auf einen plötzlichen Temperaturabfall produziert *V. cholerae* zwei kleine Kälteschock-Proteine (CspA<sub>VC</sub> und CspV), deren Gene beide auf Chromosom 2 liegen (DATTA und BHADRA, 2003). Dabei fungiert scheinbar nur CspV als wirkliches Kälteschock-Protein, da es bei höheren Temperaturen instabil ist.

Bei *V. vulnificus* führte eine Temperaturabsenkung von 35 °C auf 10 °C zu einer allgemeinen Gen-Repression, wohingegen ein Absenkung unter 10 °C vor allem zu einer allgemeinen Induktion führte (WOOD und ARIAS, 2011). Die höchste Induktion zeigten dabei zwei der fünf Kälteschock-Proteine (*cspA* und *cspB*), ribosomale Proteine, Regulatoren zur Proteinfaltung und Membran-Proteine. Repression wurde dagegen vor allem bei Genen beobachtet, die für katalytische Enzyme codieren oder für Enzyme, die an der allgemeinen Stressantwort beteiligt sind. LIMTHAMMAHISORN *et al.* (2009) konnten zeigen, dass die Induktion der Kälteschock-Gene abhängig vom verwendeten Stamm sowie dem Zeitpunkt der Probennahme bzw. der Dauer des Kälteschocks war. In einer anderen Studie konnten die Kälteschock-Gene nicht durch Kälte induziert werden (LIMTHAMMAHISORN *et al.*, 2008). Außerdem konnte gezeigt werden, dass das Hämolyisin (*vvhA*) von *V. vulnificus* sowohl an der Osmoregulation als auch an der Kältestress-Antwort beteiligt war. Homologe Gene zu *vvhA* konnten in allen anderen *Vibrio* spp. identifiziert werden und könnten bei diesen eine ähnliche Rolle spielen (REEN *et al.*, 2006; SMITH und OLIVER, 2006).

Bei *V. parahaemolyticus* wurden vier CspA-ähnliche Proteine (VP1889, VPA1289-VPA1291) und ein CspD-ähnliches Protein (VP1012) identifiziert (MAKINO *et al.*, 2003). Das durch Kälte induzierte Genexpressionsprofil wurde von YANG *et al.* (2009) in einer Zeitreihe bei 10 °C untersucht. Der verwendete Stamm war genetisch nahezu identisch zum sequenzierten Stamm RIMD 2210633 (MAKINO *et al.*, 2003). Fast 60 % der Gene waren zu mindestens einem der drei untersuchten Zeitpunkte differentiell exprimiert. Gene der metabolismusverwandten Gen-Kategorien „Aminosäure-Synthese“, „Energie-Metabolismus“, „Protein-Synthese“, „Fettsäure- und Phospholipid-Metabolismus“ sowie „Purin-, Pyrimidin-, Nukleosid- und Nukleotid-Metabolismus“ waren hauptsächlich reprimiert. Dies wurde auf den generell reduzierten zellulären Proteingehalt zurückgeführt, der bei einem plötzlichen Temperaturabfall zu beobachten ist (WEBER und MARAHIEL, 2003). Im Gegensatz dazu waren Gene ohne Zuordnung zu metabolismusverwandten Gen-Kategorien, wie „Zellhülle“, „Transport- und Bindeproteine“, Gene mit „regulatorischer Funktion“ und „zelluläre Prozesse“ sowie Gene mit unbekannter oder nicht-zugeordneter Funktion häufiger induziert. Gene bzw. Genprodukte dieser Kategorien werden zur Veränderung der Zellhüllen-Struktur sowie für den Transport über die Zellmembran benötigt. Das Kälteschock-Protein CspA (VPA1289) zeigte zu allen drei Zeitpunkten eine erhöhte Transkription (> 30-fach). Außerdem konnte eine antagonistische Regulation der Kälte-

und Hitzeschock-Gene beobachtet werden. So waren bei 10 °C Gene, die an der Hitzestress-Antwort beteiligt sind (HSPs, Adenosintriphosphat-(ATP-)abhängige Proteasen und Chaperone), hauptsächlich reprimiert (GOPHNA und RON, 2003; SEGAL und RON, 1998; YURA *et al.*, 1993). Des Weiteren zeigten fünf putative Hämolyisin-Gene (VP2536, VP0446, VP0372, VP3048, VP2536) eine signifikante Induktion (YANG *et al.*, 2009).

Um Kälte zu überdauern, wechseln Bakterien auch in den VBNC-Zustand (vgl. Abschnitte 1.4.1 und 1.5.2.3).

### 1.5.2.3 VBNC-Zustand

Wie bereits beschrieben, dient der VBNC-Zustand dazu, ungünstige Umweltbedingungen zu überdauern (vgl. Abschnitt 1.4.1 und Abbildung 1). Neben niedrigen Temperaturen können auch andere Faktoren, wie z. B. Nährstoffmangel und pH-Stress, den VBNC-Zustand induzieren (CHEN *et al.*, 2009; GAUTHIER, 2000). Durch die Erhöhung der Temperatur können *V. parahaemolyticus*-Zellen wieder aus dem VBNC-Zustand in den vegetativen Zustand übergehen (WONG *et al.*, 2004b). Es konnte ein Toxin-Antitoxin-System (VP1842/VP1843) identifiziert werden, das bei *V. parahaemolyticus* zur Induktion des VBNC-Zustands führt, indem es das Zellwachstum und Zellteilung stoppt (HINO *et al.*, 2014).

Der Status dient Bakterien als Mechanismus, um lebensfeindliche Umweltbedingungen zu überleben, und wird durch eine Veränderung der Aktivität von Enzymen, einem veränderten Fettsäureprofil (FA-Profil), dem Verlust der polaren Flagelle und dem Wechsel zu einer kokkoiden Zellform charakterisiert (CHEN *et al.*, 2009; WONG *et al.*, 2004a). Für *V. parahaemolyticus* und *V. vulnificus* konnte zudem gezeigt werden, dass VBNC-Zellen ihre Virulenz behalten (BAFFONE *et al.*, 2003; OLIVER und BOCKIAN, 1995; WOLF und OLIVER, 1992). Die Resistenz gegenüber thermischer Inaktivierung, niedrigen NaCl-Konzentrationen und pH-Werten sowie verändertem osmotischen Druck ist im VBNC-Zustand erhöht (KOGA und TAKUMI, 1995; WONG und WANG, 2004). Diese erhöhte Stressresistenz ist auch bei der Inaktivierung von *Vibrio* spp. in Lebensmitteln zu beachten (DRAKE *et al.*, 2007). Allerdings konnten JOHNSTON und BROWN (2002) zeigen, dass VBNC-Zellen sensitiver auf Hitzebehandlung reagieren als Zellen im vegetativen Zustand. Die erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Wasserstoffperoxid liegt an der verringerten Aktivität der Superoxid-Dismutase im VBNC-Zustand (WONG *et al.*, 2004a). Damit kann auch der Verlust der Kultivierbarkeit auf nährstoffreichen Medien erklärt werden, da bei der Sterilisation von nährstoffreichen Medien schädliche Peroxide entstehen, die zu oxidativem Stress führen (WHITESIDES und OLIVER, 1997). Dies führt zu einem generellen Problem beim Nachweis von Zellen im VBNC-Zustand: Sie sind nicht durch kulturelle Methoden auf Standard-Medien nachweisbar und entgehen so z. B. der Detektion in Lebensmittelproben (GAUTHIER, 2000; OLIVER, 2000). BOGOSIAN (2000) vermutete, dass durch den Zusatz von Natriumpyruvat oder Katalase zu nährstoffreichen Medien diesem Effekt entgegengewirkt werden könnte und sich so die Detektionsrate von *V. vulnificus* erhöhen würde. Ein Übergang von Zellen aus dem VBNC-Zustand in den vegetativen Zustand erfolgte auch bei erhöhten Temperaturen auf nährstoffarmen Medien.

### 1.5.2.4 Hitzestress

Eine Erhöhung der Temperatur über die optimale Wachstumstemperatur führt in Bakterien zur Akkumulation von fehlgefalteten und somit nicht-funktionalen Proteinen, die entweder in ihre native

Form zurückgefaltet oder durch Proteolyse abgebaut werden und die Hitzestress-Antwort induzieren (SKOWYRA *et al.*, 1990). Die Hitzestress-Antwort ist eine ubiquitär verbreitete Schutz- und Homöostase-Antwort, um mit dem durch Hitze induzierten Schaden an z. B. Proteinen umzugehen. Daher sind viele der durch Hitze induzierten Proteine Hitzeschock-Proteine (ARSENE *et al.*, 2000; BUKAU, 1993). Diese HSPs sind molekulare Chaperone oder ATP-abhängige Proteasen, die wichtige Funktionen bei der Faltung, der Reparatur und dem Abbau von Proteinen sowohl unter normalen als auch Stressbedingungen haben (LINDQUIST und CRAIG, 1988). Zusätzlich können HSPs zu einer Kreuzprotektion bei anderen Stress-Arten führen, wie z. B. z. B. EtOH-Stress, Osmotischem Stress, Oxidativem Stress oder Kältestress (GOPHNA und RON, 2003; KILSTRUP *et al.*, 1997; SALOTRA *et al.*, 1995). Auch bei der Invasion in und Kolonisation von homoiothermen Wirten spielen HSPs eine wichtige Rolle (GOPHNA und RON, 2003) (vgl. Abschnitt 1.5.3.1).

Zu den bekanntesten HSPs zählen die molekularen Chaperone GroEL, GroES, DnaK und DnaJ. GroEL, das zu den Chaperoninen der Hsp60 Familie gehört, wird zusammen mit dem Co-Chaperonin GroES (Hsp10) zum Wachstum benötigt und spielt eine wichtige Rolle bei fundamentalen zellulären Prozessen sowohl bei erhöhten als auch sub-optimalen Temperaturen (FAYET *et al.*, 1989). Zusammen mit dem Chaperonin DnaK (Hsp70) und dem Co-Chaperonin DnaJ (Hsp40) erhalten sie die native Struktur von Proteinen bei erhöhten Temperaturen (LANGER *et al.*, 1992). DnaK und DnaJ interagieren mit den fehlgefalteten Proteinen und stabilisieren ihre Konformation, dann vermittelt GrpE den Transport dieser Proteine zum GroESEL-Komplex, der für die Faltung in die native Form verantwortlich ist (CRAIG *et al.*, 1993). Innerhalb der *Gammaproteobacteria* besitzen überwiegend Mitglieder der *Vibrionaceae* eine chromosomale Duplikation des *groESEL*-Operons (CHOWDHURY *et al.*, 2014). Dabei ist *groESEL1* (Chromosom 1) die ursprüngliche Kopie und *groESEL2* (Chromosom 2) ist durch ein Genduplikationsevent entstanden. Bei *V. parahaemolyticus* RIMD 2210633 ist GroESEL1 durch die Gene VP2851-VP2852, GroESEL2 durch VPA0286-VPA0287, DnaKJ durch VP0653-54 und GrpE durch VP0651 codiert. Für *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* und *V. cholerae* konnte gezeigt werden, dass *groEL1* in der log-Phase stärker induziert war als *groEL2*. Beide Duplikate zu behalten, könnte für die *Vibrio* spp. einen evolutionären Vorteil darstellen.

Die Produktion der HSPs wird durch den alternativen Sigma-Faktor RpoH induziert (MORITA *et al.*, 1999; PHADTARE *et al.*, 2000). Die Induktion wird noch verstärkt, indem bei höheren Temperaturen die Sekundärstruktur der *rpoH*-mRNA partiell geschmolzen wird, sodass der Eintritt der mRNA ins Ribosom und somit die Initiation der Translation erleichtert wird.

*V. parahaemolyticus* zeigte in Studien von JOHNSTON und BROWN (2002) eine höhere Hitze-Resistenz (bei 55 °C) als *V. vulnificus* und *V. cholerae*. Da *V. parahaemolyticus* die Proteine GroEL und DnaK sowie mindestens acht weitere HSP-Homologe im Genom codiert, scheint die Hitzestress-Antwort einen wichtigen Überlebens-Mechanismus darzustellen (REEN *et al.*, 2006).

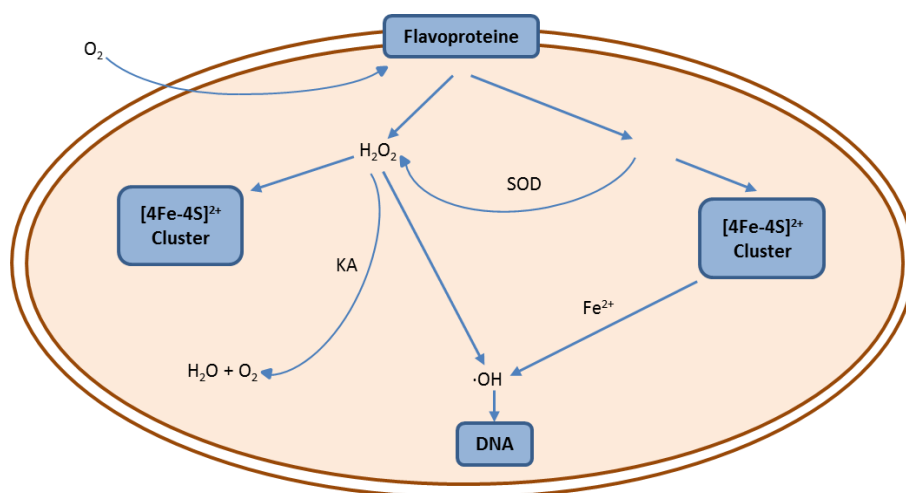
Bei *V. parahaemolyticus* wurde durch Hitzeschock die Zelloberfläche beschädigt, die Fettsäurezusammensetzung verändert (Zunahme von gesättigten Fettsäuren) sowie eine verringerte Kapazität der Superoxid-Dismutase und Katalase beobachtet (CHIANG *et al.*, 2008; CHIANG *et al.*, 2005). Außerdem wurde gezeigt, dass die Synthese von TDH zunahm (CHIANG und CHOU, 2008). Durch die Induktion von GroEL konnte neben dem Überleben bei 47 °C eine zusätzliche Kreuzprotektion gegenüber 20 ppm H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und 8 % Ethanol beobachtet werden (CHANG *et al.*, 2004; CHIANG *et al.*, 2006, 2008) (vgl. Abschnitt 1.5.4).

### 1.5.2.5 Oxidativer Stress

Molekularer Sauerstoff ist klein genug, um frei durch die bakteriellen Membranen zu diffundieren. Da die meisten Biomoleküle schlechte univalente Elektronen-Donatoren sind, kann molekularer Sauerstoff als schwacher Elektronen-Akzeptor Nucleinsäuren und Aminosäuren nur sehr ineffizient oxidieren. Stärkere univalente Oxidationsmittel sind die reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) Superoxid-Anionen ( $O_2^-$ ), Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) und Hydroxyl-Radikale ( $OH\cdot$ ) (IMLAY, 2003). Als unvermeidliches Nebenprodukt aeroben Wachstums entstehen ROS bei der Reduktion von molekularem Sauerstoff durch Membran-assoziierte Enzyme der Atmungskette. Außerdem werden ROS als Abwehrmechanismus von Makrophagen bei der Invasion von pathogenen Bakterien gebildet und entstehen, wenn Lebensmittel durch Bestrahlung, die Anwesenheit von Schwermetallen und Desinfektionsmitteln oder durch wiederholtes Einfrieren prozessiert werden, sowie bei Säure- und Hitzestress (CABISCOL *et al.*, 2000; MOLS und ABEE, 2011; RODRIGUEZ-ROMO und YOUSEF, 2002). In der marinen Umwelt führt die Absorption der Sonneneinstrahlung zusammen mit gelöstem organischen Material im Meerwasser zur photochemischen Produktion von ROS (LESSER, 2006).

Ein Ungleichgewicht zwischen Produktion und Elimination von ROS führt in Bakterien zu oxidativem Stress, bei dem DNA, Proteine und Fette beschädigt werden und der letztlich zum Zelltod führen kann (IMLAY, 2002). Um diesem Stress entgegenzuwirken, besitzen Bakterien Anti-Oxidationssysteme wie Superoxid-Dismutasen, Katalasen, DNA-bindende Proteine, Peroxiredoxine, Thioredoxine und Thioredoxin-Reduktasen. Die Mechanismen, durch die ROS Zellschäden hervorrufen, sind in Abbildung 4 dargestellt. Wasserstoffperoxid aktiviert bei vielen gramnegativen Bakterien den transkriptionellen Regulator OxyR, der die Antwort auf oxidativen Stress reguliert (MADDOCKS und OYSTON, 2008).

Für *V. cholerae* und *V. vulnificus* konnte gezeigt werden, dass OxyR bzw. OxyR-regulierte Katalasen wichtige Funktionen bei der Antwort auf oxidativen Stress haben (KONG *et al.*, 2004; WANG *et al.*, 2012). In *V. vulnificus* führte Kältestress zur Induktion von *katG* und *oxyR* (LIMTHAMMAHISORN *et*



**Abbildung 4:** Mechanismen der Zellschädigung durch oxidativen Stress

Molekularer Sauerstoff gelangt über die Membranen in die Zelle und wird mittels direkter Oxidation durch die Flavoproteine in  $O_2^-$  und  $H_2O_2$  umgewandelt.  $O_2^-$  und  $H_2O_2$  dringen in die  $[4Fe-4S]^{2+}$  Cluster von Dehydratasen ein.  $O_2^-$  oxidiert das Cluster und das freigesetzte katalytische Eisenatom inaktiviert das Enzym. Das Eisen wird zu  $Fe^{2+}$  reduziert und reagiert mit  $H_2O_2$ . Dabei entstehen hoch reaktive Hydroxylradikale, die die DNA angreifen, die Replikation blockieren und dadurch zum Zelltod führen können. Die Enzyme Superoxid-Dismutase (SOD) und Katalase (KA) bauen  $O_2^-$  und  $H_2O_2$  ab. Dabei wandelt SOD  $O_2^-$  in  $H_2O_2$  um, das danach durch KA in  $H_2O$  und  $O_2$  gespalten wird. Modifiziert nach WALECKA und BANIA (2012).



---

*al.*, 2008). *V. parahaemolyticus* RIMD 2210633 besitzt Gene, die für die Enzyme Superoxid-Dismutase (VP2118, VP2860, VPA1514), Katalase (VPA0305, VPA0453, VPA0768, VPA1418), Peroxiredoxin (VP2753), Thioredoxin (VP0806, VP2005, VP3001, VPA0972) und Thioredoxin-Reduktase (VP1251) codieren (MAKINO *et al.*, 2003).

### 1.5.3 Stress im Menschen

Bei der Infektion des menschlichen Wirts trifft *V. parahaemolyticus* im Gastrointestinaltrakt auf verschiedene Bedingungen und Stressoren. Dazu zählen ein niedriger pH-Wert, niedrige Salzkonzentrationen, die Anwesenheit von Gallensäure und organischen Säuren, eine erhöhte Temperatur, die geringe Verfügbarkeit von Eisen sowie die Immunantwort des Wirts (GOPHNA und RON, 2003; WHITAKER und BOYD, 2012).

#### 1.5.3.1 Hitzestress

Die Stressantwort, die bei Hitze erfolgt, wurde in Abschnitt 1.5.2.4 vorgestellt.

Das Eindringen eines pathogenen Bakteriums in einen homoiothermen Wirt wird üblicherweise von einer Erhöhung der Umgebungstemperatur begleitet (GOPHNA und RON, 2003). Außerdem begegnen den Bakterien im Wirt veränderte pH-Werte und osmotischer Stress. Alle diese Stressarten wirken auf Proteine denaturierend. Es wird daher angenommen, dass Hitzeschock-Gene nach der Infektion induziert werden, um Fehlfaltung und Aggregation von beschädigten Proteinen durch Rückfaltung oder Proteolyse zu verhindern. Die Induktion der Hitzestress-Antwort beeinflusst die Pathogenese vor allem indirekt, da sie die Resistenz gegenüber der Immunabwehr des Wirtes erhöht und damit ein Überleben sicherstellt oder an der Regulation von Virulenzgenen beteiligt ist. Dabei wurde die Induktion der Hitzeschock-Gene auch noch zu einem späteren Zeitpunkt der Infektion nachgewiesen. Vor allem beim intrazellulären Wachstum dienen HSPs auch zum Schutz vor oxidativem Stress und niedrigen pH-Werten. Bei einigen Bakterien, wie z. B. *S. Typhimurium* und *Mycobacterium tuberculosis*, spielen HSPs eine direkte Rolle in der Pathogenese (ENSGRABER und LOOS, 1992; MEGHJI *et al.*, 1997).

Da die Temperaturerhöhung beim Eintritt in den Wirt ein klares Signal für das Bakterium darstellt, wird angenommen, dass viele zur Virulenz und Adaptation an den Wirt benötigte Gene durch HSPs reguliert werden (GOPHNA und RON, 2003).

Diese Co-Regulation von Hitzeschock- und Virulenzgenen ist von Vorteil, da durch die Freisetzung von Toxinen und anderen Pathogenitätsfaktoren häufig eine Temperaturerhöhung und oxidativer Stress im Wirt induziert wird, die wiederum eine vermehrte Aktivität von HSPs erfordern.

#### 1.5.3.2 Säurestress

Der niedrige pH-Wert im menschlichen Magen spielt nicht nur für den Verdauungsprozess eine wichtige Rolle, sondern dient auch als physiologische Barriere, um enteropathogene Bakterien im Magen auf ihrem Weg in den Darm, dem Ort ihrer Kolonisation, aufzuhalten. Der Dick- und Dünndarm enthält, trotz eher neutralem pH-Wert, wechselnde Konzentrationen an Fettsäuren, die Nebenprodukte der fermentativen symbiotischen Mikroflora darstellen (WHITAKER und BOYD, 2012). Demnach müssen Enterobakterien nicht nur den niedrigen anorganischen pH-Wert im Magen, sondern auch den Stress durch organische Säuren im Darm überleben (WHITAKER und BOYD, 2012).

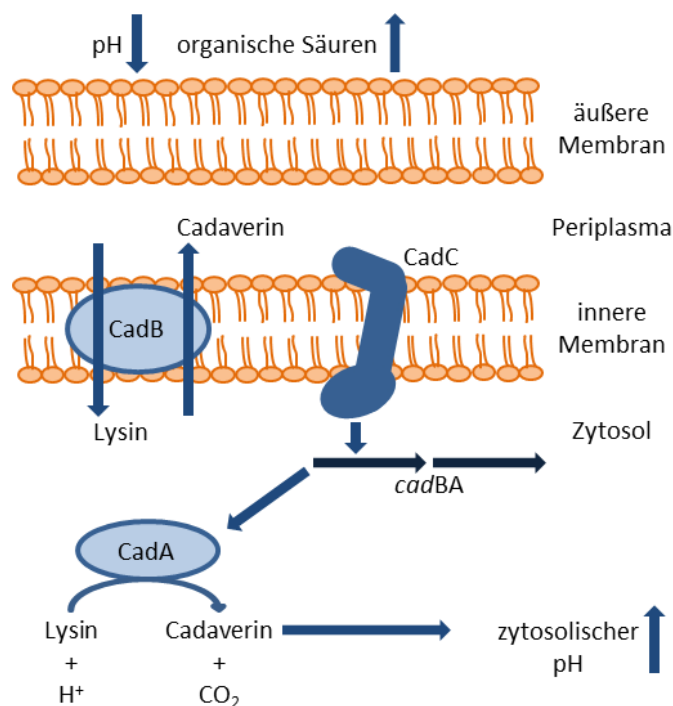
Dabei verbleiben anorganische Säuren außerhalb der Zellen, während organische Säuren über die Zellmembran ins Cytoplasma gelangen, dort dissoziieren, den cytoplasmatischen pH-Wert verringern und durch die Anwesenheit der Säure-Anionen den Turgor erhöhen (WHITAKER *et al.*, 2010).

*V. parahaemolyticus* und andere *Vibrionaceae* gelten generell als säureempfindlicher als andere Bakterien (NISHIKAWA *et al.*, 1993; WATERMAN und SMALL, 1998). Viele Enterobakterien und auch *Vibrio* spp. sind zur sogenannten adaptiven Säuretoleranz-Antwort (adaptive acid tolerance response) in der Lage (FOSTER, 1999; MERRELL und CAMILLI, 2002). Dabei beginnen Bakterien, die leichtem subletalen pH-Stress ausgesetzt werden, damit, Systeme zu exprimieren, die für das Überleben bei noch niedrigeren letalen pH-Werten nötig sind. So konnte bei *V. cholerae* gezeigt werden, dass alle Zellen durch eine 30-minütige Inkubation bei pH 4,5 abgetötet wurden, wohingegen eine Inkubation bei pH 5,7 und anschließend bei pH 4,5 auch nach 60 min zu keiner Reduktion der Zellzahl führte (MERRELL und CAMILLI, 1999). In weiteren Untersuchungen konnten MERRELL und CAMILLI (1999) zeigen, dass die adaptive Antwort auf der Synthese von Stress-Proteinen und im speziellen von Säurestress-Proteinen beruht. Auch *V. parahaemolyticus* ist in der Lage, eine adaptive Säuretoleranz-Antwort auszubilden. So zeigten WONG *et al.* (1998) und TANAKA *et al.* (2008), dass eine Inkubation bei pH 5 bzw. pH 5,5 für 30 min ausreicht, damit ein Überleben bei ansonsten letalen pH-Werten möglich ist. Diese Adaptation wurde auch bei organischen Säuren beobachtet (WHITAKER *et al.*, 2010). In Proteinexpressionsstudien konnte gezeigt werden, dass durch den pH-Stress eine Vielzahl von Proteinen differentiell exprimiert wird. Dies bestätigt die Beobachtungen bei *V. cholerae*, dass die Säureadaptation durch eine Änderung der Proteinexpression und eine Induktion von Säurestress-Proteinen ermöglicht wird (CHIANG *et al.*, 2005). Die Säureadaptation scheint außerdem einen Einfluss auf die Pathogenität von *V. parahaemolyticus* zu besitzen. Zum einen war bei Mäusen, die mit säureadaptierten *V. parahaemolyticus* infiziert wurden, das Gewicht der Därme durch vermehrte Flüssigkeitsakkumulation signifikant höher (WONG *et al.*, 1998). Zum anderen war die Cytotoxizität gegenüber Zellen der humanen epithelialen kolorektalen Adenokarzinom-Zelllinie CaCo-2 2-fach erhöht (WHITAKER *et al.*, 2010).

### **Molekulare Mechanismen der Säuretoleranz**

Zu den unter Enterobakterien weit verbreiteten induzierbaren Systemen der Säurestress-Antwort zählen Aminosäure-Decarboxylase-Systeme. Diese sind in Operons organisiert und bestehen in der Regel aus zwei Genen, wobei von einem ein Decarboxylase-Enzym und von dem anderen ein Substrat/Produkt-Antiporter codiert wird. Außerdem gibt es noch entsprechende mit dem Operon assoziierte Response-Elemente, die die Expression als Antwort auf vorhandene spezifische Aminosäuren und/oder veränderte extrazelluläre pH-Werte regulieren (FOSTER, 2004; MERRELL und CAMILLI, 2002).

Bei *V. cholerae* ist das Lysin-Decarboxylase-System für die Antwort auf Säurestress verantwortlich (MERRELL und CAMILLI, 2002). Der Mechanismus ist in Abbildung 5 dargestellt. Das Enzym Lysin-Decarboxylase wird vom Gen *cadA* codiert und wird zusammen mit dem Lysin/Cadaverin-Antiporter (codiert von *cadB*) in einem Operon exprimiert. Die Lysin-Decarboxylase ermöglicht die Umwandlung von Lysin in Cadaverin und Kohlenstoffdioxid. Bei der Reaktion wird ein H<sup>+</sup>-Ion aus dem Cytoplasma verbraucht und damit der interne pH-Wert der Zelle bei Säurestress erhöht (MERRELL und CAMILLI, 1999, 2002). Es konnte gezeigt werden, dass Mutanten ohne *cadA* nicht mehr in der Lage waren, eine adaptive Säuretoleranz-Antwort bei Anwesenheit von subletalen



**Abbildung 5:** Das Lysin-Decarboxylase-System in *V. parahaemolyticus* und *V. cholerae*

Das Lysin-Decarboxylase-System ist wichtig für das Überleben bei niedrigen pH-Werten. CadC gehört zur OmpR-Familie der DNA-bindenden Proteine und ist an der inneren Membran der Zelle lokalisiert. Wenn der pH-Wert im extrazellulären Raum sinkt oder die Konzentration extrazellulärer organischer Säuren ansteigt, verstärkt CadC die Expression des *cadBA*-Operons. CadB ist ein Lysin/Cadaverin-Antiporter und CadA das Enzym Lysin-Decarboxylase, das Lysin in Cadaverin und Kohlenstoffdioxid umwandelt. Dabei wird ein Proton im Cytoplasma verbraucht und somit der intrazelluläre pH-Wert erhöht. Modifiziert nach WHITAKER und BOYD (2012).

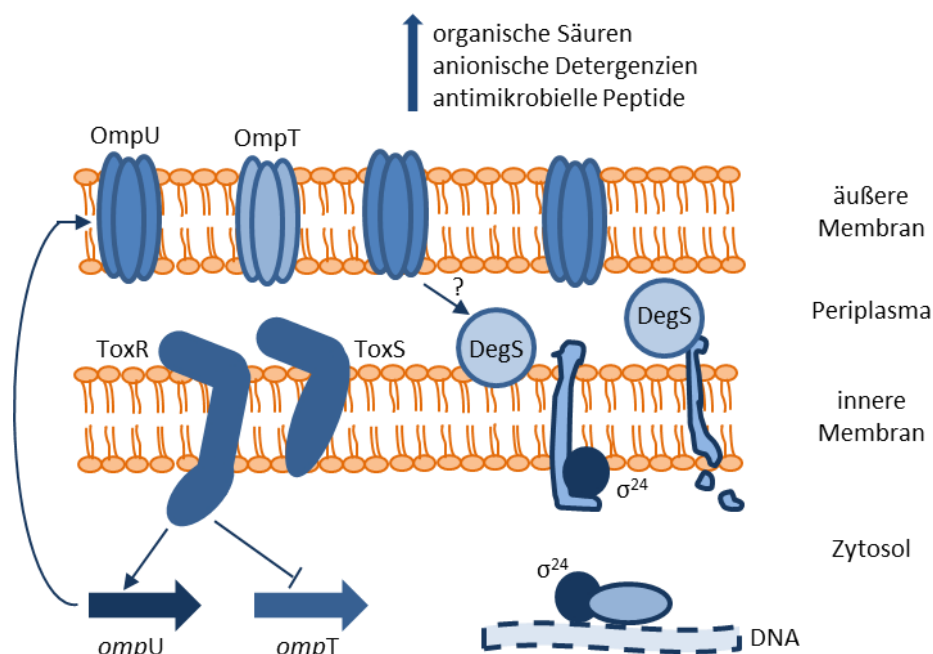
Konzentrationen anorganischer und organischer Säuren auszubilden (MERRELL und CAMILLI, 1999). Das *cadBA*-Operon wird durch CadC reguliert, das ähnlich wie das Protein ToxR mit der DNA interagieren kann (MERRELL und CAMILLI, 2000). Zusätzlich besitzt *V. cholerae* noch ein Ornithin-Decarboxylase-System, das die Umwandlung von Ornithin in Putrescin ermöglicht. Untersuchungen haben gezeigt, dass dieses System aber nicht benötigt wird, um die Säurestress-Antwort auszuführen (MERRELL und CAMILLI, 1999). Außerdem wird die adaptive Säuretoleranz-Antwort durch das ToxRS-Regulon vermittelt, indem *ompU* induziert wird, das generell bei der Antwort auf Stress an der äußeren Membran beteiligt ist, und unter anderem auch für ein Überleben in Gegenwart von organischen Säuren benötigt wird (MERRELL *et al.*, 2001; MERRELL und CAMILLI, 1999).

Bei *V. parahaemolyticus* wurde ein zu *V. cholerae* homologes *cadBA*-Operon auf Chromosom 1 identifiziert, dessen Transkription durch den externen pH-Wert reguliert wird (TANAKA *et al.*, 2008). Auch konnte von TANAKA *et al.* (2008) gezeigt werden, dass *V. parahaemolyticus* in Minimalmedium nur durch die Zugabe von Lysin zum Überleben bei niedrigen pH-Werten in der Lage ist. Das durch den Lysin-Decarboxylase Weg gebildete Cadaverin konnte im Überstand der Kulturen nachgewiesen werden. Des Weiteren scheint die Lysin-Decarboxylase zum Überleben bei niedrigen pH-Werten essentiell zu sein, da Mutanten ohne das Gen *cadA* deutlich geringere Überlebensraten zeigten. Außerdem wird das *toxR*-Gen bei niedrigen pH-Werten induziert und ist damit vermutlich an der Säuretoleranz beteiligt (WHITAKER *et al.*, 2010).

### 1.5.3.3 Stress durch Gallensäuren, antimikrobielle Peptide und Detergenzien

Nach der Passage durch den Magen gelangen die Vibrionen in den Dünndarm, der den bevorzugten Ort zur Kolonisation im menschlichen Gastrointestinaltrakt darstellt. Im Dünndarm existieren verschiedene Bedingungen, die als Stressoren wirken (WHITAKER und BOYD, 2012). Dazu zählen u. a. hohe Konzentrationen an Gallensäuren und eine Vielzahl verschiedener organischer Säuren, die von der bakteriellen Mikroflora gebildet werden. Gallensäuren stellen rund 50 % der organischen Bestandteile der Galle dar und werden in der Leber aus Cholesterin synthetisiert (BEGLEY *et al.*, 2005). Gallensäuren besitzen einen starken antimikrobiellen Effekt, der die Kolonisation von Bakterien hemmt: So sind im Dickdarm, der nur niedrige Konzentrationen an Gallensäuren enthält, bis zu  $10^{14}$  Bakterienzellen pro ml zu finden, während im Dünndarm, der hohe Gallensäuren-Konzentrationen (bis zu 10 mM) enthält, nur  $10^5$  Bakterienzellen pro ml nachzuweisen sind (HOFMANN und ECKMANN, 2006). Gallensäuren selbst sind Emulgatoren, die dazu dienen, die Verdauung zu unterstützen und Lipide im Dünndarm zu absorbieren. Es wird vermutet, dass der antibakterielle Effekt der Gallensäuren durch die Induktion von Schäden in der bakteriellen Membran entsteht (BEGLEY *et al.*, 2005; BILLINGTON *et al.*, 1979). Außerdem scheinen Gallensäuren nachteilige Effekte auf bakterielle Proteine zu besitzen, da durch Gallensäuren die vermehrte Expression von molekularen Chaperonen induziert wird, die für die korrekte Faltung von Proteinen benötigt werden (BEGLEY *et al.*, 2005).

Bei *V. cholerae* (und vermutlich auch *V. parahaemolyticus*) dient das ToxRS-System zur Wahrnehmung von extrazellulären Gallensäuren und zur Reaktion auf diese. Die Reaktion besteht aus der vermehrten Expression des Proteins OmpU (Abbildung 6). Vergleichbares wurde bei weiteren anionischen Detergenzien, wie z. B. Natriumdodecylsulfat (SDS), aber nicht bei nicht-ionischen



**Abbildung 6:** Die Rolle von *toxRS* bei der Antwort auf Stress der äußeren Membran  
Obwohl *ToxRS* durch die Rolle als Regulator der Virulenz am bekanntesten ist, spielt er auch eine entscheidende Rolle bei der Regulation von Membranproteinen, die an der Antwort auf Stress der äußeren Membran sowie bei der Anwesenheit von anionischen Detergenzien und antimikrobiellen Peptiden beteiligt sind. Das Protein OmpU der äußeren Membran wird durch *ToxRS* reguliert und fungiert vermutlich als Aktivator des alternativen Sigma-Faktors RpoE (oder  $\sigma^{24}$ ), der als extracytoplasmatischer Sigma-Faktor für die Stressantwort bei Stress der äußeren Membran verantwortlich ist. Modifiziert nach WHITAKER und BOYD (2012).

Detergenzien wie Triton X-100 beobachtet (PROVENZANO *et al.*, 2000). Das Vorhandensein bzw. die Abwesenheit des Proteins OmpU bestimmt den Grad der Sensitivität gegenüber Gallensäuren und anderen ionischen Detergenzien und damit das Überleben in Gegenwart dieser (PROVENZANO und KLOSE, 2000; PROVENZANO *et al.*, 2000). Bei *V. parahaemolyticus* wurden drei Efflux-Transporter (VmeAB, VmeCD und VmeTUV) des Resistance-Nodulation-Division-(RND)-Typs identifiziert, die an der Resistenz gegenüber Gallensäuren beteiligt sind (MATSUO *et al.*, 2013; MATSUO *et al.*, 2014).

Gallensäuren dienen *V. parahaemolyticus* als Signal dafür, dass das Bakterium im Darm angekommen ist, und fungieren als Induktor für die vermehrte Expression von Genen zur Bildung von TDH und T3SS2-verwandten Proteinen (GOTOH *et al.*, 2010; OSAWA *et al.*, 2002a; OSAWA und YAMAI, 1996). Diese Induktion wird durch die Gene *vtrA* (VPA1332) und *vtrB* (VPA1348) vermittelt, die eine hohe Ähnlichkeit zu *toxR* aufweisen.

Antimikrobielle Peptide gehören zur angeborenen Immunantwort von Vertebraten, die vor allem im Darm gegen eindringende Bakterien zu finden sind. Eines dieser Peptide, BPI (bakterizid/Permeabilität induzierend), ist in neutrophilen Granulozyten, an der Oberfläche von Neutrophilen und auf der Oberfläche intestinaler Epithelzellen lokalisiert und hebt u. a. die Wirkung von Endotoxinen auf (CANNY *et al.*, 2002; WEISS *et al.*, 1978). Das Peptid besitzt neben der Affinität zur Lipid A-Domäne von Lipopolysacchariden (LPS) bei gramnegativen Bakterien noch mehrere funktionelle Domänen, die verschiedene antimikrobielle Effekte ausüben. P2, ein künstliches Protein mit BPI-Regionen, tötet abhängig von der Dosis *V. cholerae*-Wildtypzellen (MATHUR und WALDOR, 2004). Es konnte gezeigt werden, dass ToxR und damit das von ToxR regulierte Protein OmpU zur Resistenz gegenüber P2 beiträgt. Zusätzlich ist OmpU an der Resistenz gegenüber dem antibiotisch wirkenden Polymyxin-B-Sulfat beteiligt. Polymyxin-B-Sulfat besitzt sowohl hydrophile als auch hydrophobe Domänen und wird zu den kationischen Detergenzien gezählt. Die hydrophile Domäne bindet an die gramnegativen LPS, die hydrophobe Domäne zerstört anschließend die äußere und innere Membran und agiert demnach wie ein Detergens, indem es bakterielle Membranen unterbricht und zu einer erhöhten Permeabilität führt (MATHUR und WALDOR, 2004). Allerdings konnte bei einer *ompU*-Deletionsmutante von *V. parahaemolyticus* keine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Polymyxin-B beobachtet werden (HAINES-MENGES *et al.*, 2014).

Ein wichtiger Weg, über den die Genexpression bei Stress der äußeren Membran und durch antimikrobielle Peptide reguliert wird, ist der alternative Sigma-Faktor RpoE (Abbildung 6 und vgl. Abschnitt 1.5.1).

#### 1.5.3.4 Eisen-Mangel

Eisen ist für verschiedene physiologische Prozesse essentiell und muss daher von fast allen Organismen aus der Umwelt aufgenommen werden. Im Organismus wird Eisen in Proteine inkorporiert, um das Redoxpotential, den Spin oder die Geometrie des Ions je nach vorgesehener Verwendung zu verändern (WHITAKER und BOYD, 2012). Viele pathogene Bakterien besiedeln verschiedene Lebensräume, wobei der Wirt als Lebensraum eine Sonderstellung einnimmt. Vom Wirt können sie Kohlenstoff (aus Wirtsgewebe und -flüssigkeiten), Stickstoff (aus Aminosäuren und Nukleotiden) sowie Phosphat und andere anorganische Ionen akquirieren. Eisen dagegen ist im Wirt stärker limitiert als in der Umwelt. Die Löslichkeit von  $\text{Fe}^{3+}$  beträgt in der Umwelt  $10^{-9}$  bis  $10^{-18}$  M (pH 7) während sie im Wirt bei ca.  $10^{-24}$  M liegt (BUTLER, 2003). Diese Verknappung des Eisens wird als

nutritional immunity bezeichnet und gehört zur angeborenen Abwehr gegen die Kolonisation von bakteriellen Pathogenen. Da jegliches freie Eisen durch verschiedene Proteine (z. B. Transferrin, Lactoferrin und Ferritin) im Wirt gebunden wird, um es zu speichern oder zu transportieren, wird es eingedrungenen Pathogenen vorenthalten (ANDREWS *et al.*, 2003b; BUTLER, 2003; RATLEDGE und DOVER, 2000; WHITAKER und BOYD, 2012). Als wichtiges Eisenspeicher-Protein wird sowohl von Eukaryoten als auch Prokaryoten das große globuläre Protein Ferritin gebildet. Der Ferritin-Komplex aus 24 Untereinheiten kann bis zu 4500 Fe<sup>3+</sup> binden. Da Ferritin ein intrazelluläres Protein ist, erlaubt es Eukaryoten, das Eisen innerhalb der Zellen zu speichern, wodurch es gleichzeitig weniger leicht verfügbar für kolonisierende Bakterien wird (ANDREWS *et al.*, 2003b; BUTLER, 2003; RATLEDGE und DOVER, 2000).

### **Extrazelluläres Eisen als Signal für die Genregulation**

Durch die Bedeutung von Eisen in der Umgebung von Bakterien dient das Vorhandensein bzw. die Abwesenheit von freiem löslichen Eisen als starkes Regulationssignal (WHITAKER und BOYD, 2012). Eine Möglichkeit, um freies Eisen zu detektieren und auf dessen Anwesenheit zu reagieren, ist bei gramnegativen Bakterien durch Fur (Ferric uptake regulator), einen Eisen(III)-Aufnahme-Regulator (BAGG und NEILANDS, 1987; ESCOLAR *et al.*, 1999). Das Fur-Protein besitzt zwei funktionelle Domänen, die DNA-bindende Domäne am Amino-Terminus mit helix-turn-helix Motiv sowie zwei Metall-Bindestellen am Carboxy-Terminus. Bei *V. cholerae* konnte gezeigt werden, dass Fur mit mehr als 5000 Moleküle pro Zelle stark exprimiert wird (WATNICK *et al.*, 1997). Unter Eisen-limitierten Bedingungen ist kein Eisen an Fur gebunden, das Protein ist inaktiv, es besitzt nur eine geringe Affinität zur DNA und Gene zur Aufnahme von Eisen werden transkribiert (SMITH *et al.*, 1996). Wenn Eisen dagegen in großen Mengen im Zytoplasma vorliegt, bindet Fur dieses. Dadurch steigt die Affinität von Fur zur DNA um ungefähr das 1000-Fache an, es bindet an eine spezifische Sequenz der DNA (fur-Box) und Gene zur Eisen-Aufnahme werden nicht weiter transkribiert. Bei *V. parahaemolyticus* konnte ein Fur-Homolog (VP0833) identifiziert werden (MAKINO *et al.*, 2003). Im Gegensatz zum Fur-Fe<sup>2+</sup>-Komplex aktivieren transkriptionelle Regulatoren der AraC-Typ Familie und LysR-Typ Familie die Transkription von Genen zur Siderophor-Synthese und Siderophor-Verwendung (ANDERSON und ARMSTRONG, 2004; BALADO *et al.*, 2008; FETHERSTON *et al.*, 1996; HEINRICHS und POOLE, 1993; HOLLANDER *et al.*, 2011; TANABE *et al.*, 2012; TANABE *et al.*, 2005; VISCA *et al.*, 2002).

### **Eisen-Akquirierung**

Da die Eisen-Akquirierung auch als wichtiger Pathogenitätsfaktor gilt, wird der Mechanismus und die Bedeutung zur Pathogenität von *V. parahaemolyticus* in Abschnitt 1.7.7 vorgestellt. Generell werden von Bakterien Siderophore produziert, um Eisen aus der Umgebung zu erhalten. Siderophore sind Eisen-chelatierende Moleküle, die in den extrazellulären Raum sekretiert werden, um freies oder an Wirtsmoleküle gebundenes Eisen zu binden. Anschließend werden die Siderophore über spezifische Rezeptoren gebunden und durch Transporter ins Cytoplasma aufgenommen, wo das gebundene Eisen freigesetzt und vom Bakterium verwendet wird (WHITAKER und BOYD, 2012).

#### **1.5.3.5 Osmotischer Stress**

Im Gastrointestinaltrakt des Menschen herrschen mit ca. 17,5 g/l verglichen zu ca. 35 g/l im Meerwasser deutlich niedrigere NaCl-Konzentrationen (ONGAGNA-YHOMBI und BOYD, 2013; WHITAKER

---

*et al.*, 2010). Die Reaktion von *V. parahaemolyticus* auf osmotischen Stress aufgrund zu niedriger Salzkonzentrationen wurde in Abschnitt 1.5.2.1 vorgestellt.

#### 1.5.4 Kreuzprotektion und Adaptation

Wie in den einzelnen Abschnitten erwähnt, kann eine Präadaptation an milde Stressbedingungen erfolgen und so die Stressresistenz erhöht werden. Dabei kann auch eine Kreuzprotektion gegen andere Stressoren ausgebildet werden, i. d. R. wenn die Mechanismen der jeweiligen Stressantworten ähnlich reguliert sind. Diese Formen der Adaptation und Kreuzprotektion sollten bei der Lagerung und der Verarbeitung von Lebensmitteln berücksichtigt werden.

So konnte eine Adaptation von *V. parahaemolyticus* und *V. vulnificus* an niedrige Temperaturen (15 °C für 2 bis 4 h), verbunden mit der Produktion von Kälteschutz-Proteinen, zu einer erhöhten Überlebensrate bei 5 °C und -18 °C führen (BRYAN *et al.*, 1999; LIN *et al.*, 2004). Außerdem wurde durch Kälteadaptation eine Kreuzprotektion gegenüber Kristall-Violett ausgebildet und durch die Induktion der Gene *oxyR* und *kafG* kann eine Kreuzprotektion gegenüber oxidativem Stress nicht ausgeschlossen werden (LIMTHAMMAHISORN *et al.*, 2008; LIN *et al.*, 2004). Dagegen nahm die Empfindlichkeit gegenüber hohen Temperaturen (47 °C), Wasserstoffperoxid sowie Milch- und Essigsäure zu.

Die Adaptation an Säure (pH 5) erhöhte bei *V. parahaemolyticus* das Überleben bei sonst letalem pH 4 und induzierte eine Kreuzprotektion gegenüber Hitze, Gallensäuren, Desoxycholsäure, Kristall-Violett, niedrigen NaCl-Konzentrationen und – abhängig vom verwendeten Stamm – gegen Ethanol (CHIANG *et al.*, 2014; KOGA *et al.*, 1999; WONG *et al.*, 1998). Durch die Säureadaptation konnte dagegen keine Veränderung bzgl. der Kältetoleranz (4 °C und -20 °C) induziert werden, die Empfindlichkeit gegenüber Wasserstoffperoxid nahm zu und je nach untersuchtem Stamm kam es zu einer Erhöhung der Toleranz bzw. der Empfindlichkeit gegenüber hohen Salzkonzentrationen (CHIANG *et al.*, 2014).

Durch die Adaptation an hohe pH-Werte wurde bei *V. parahaemolyticus* eine Kreuzprotektion gegenüber Hitze, Kristall-Violett, Desoxycholsäure sowie Wasserstoffperoxid induziert und an Nährstoffmangel-adaptierte Zellen bildeten eine Kreuzprotektion gegenüber Hitze, osmotischem Stress und Wasserstoffperoxid aus (KOGA *et al.*, 2002; KOGA und TAKUMI, 1995).

Dagegen wurde durch Hitze kein Säure- oder Alkali-Schutz, sondern im Gegenteil Alkali-Stress induziert und die Empfindlichkeit gegenüber Säure erhöht (KOGA *et al.*, 2002; KOGA *et al.*, 1999). Bei der Anpassung an erhöhte Temperaturen wird in *V. parahaemolyticus* die Bildung von GroEL induziert, das neben seiner Funktion bei Hitze auch zu einer Kreuzprotektion gegenüber 20 ppm H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und 8 % Ethanol führte (CHANG *et al.*, 2004; CHIANG *et al.*, 2006, 2008).

Vermutlich wegen der halophilen Lebensweise von *V. parahaemolyticus* spielt die extrazelluläre Salzkonzentration eine entscheidende Rolle sowohl beim allgemeinen Wachstum von *V. parahaemolyticus* als auch bei dessen Fähigkeit, zusätzlichem Umweltstress zu widerstehen (WHITAKER und BOYD, 2012). Aus Versuchen geht hervor, dass bei *V. parahaemolyticus*, wenn die Kultivierung bei vergleichsweise niedriger Salzkonzentration (1 % NaCl) erfolgte, eine leichte Abnahme der Wachstumsrate und eine deutliche Reduktion der maximal erreichten Zellzahl beobachtet werden konnte (WHITAKER *et al.*, 2010). Dieser Effekt trat verstärkt auf, wenn die Salzkonzentration weiter absank (z. B. bei 0,5 % NaCl).

Wurden Kulturen, die bei verschiedenen Salzkonzentrationen gewachsen sind, in ein Medium mit niedrigerem pH-Wert überführt, konnten solche, die bei höheren Salzkonzentrationen kultiviert wurden, deutlich besser überleben (KALBURGE *et al.*, 2014; WHITAKER *et al.*, 2010). Auch konnten Zellen aus einem Medium mit niedrigen NaCl-Konzentrationen keine ausgeprägte adaptive Säuretoleranz ausbilden. Erklärt werden diese Beobachtungen durch die rund 3-fach verringerte Expression des Gens *cadA* nach Kultivierung in Anwesenheit von 1 % NaCl (statt 3 % NaCl) und anschließendem Überführen in ein Medium mit pH 5. (WHITAKER *et al.*, 2010). Allerdings konnten KALBURGE *et al.* (2014) zeigen, dass das Überleben letaler Säurekonzentrationen nach einer Präadaptation in höheren Salzkonzentrationen nur zu einem kleinen Anteil vom Lysin-Decarboxylase-Weg abhängt. Bei extremen Temperaturen (-20 °C und 42 °C) zeigten Zellen aus einem Medium mit hohen Salzkonzentrationen (3 % bzw. 6 % NaCl) eine (je nach Studie teils signifikant) höhere Überlebensrate (KALBURGE *et al.*, 2014; NAUGHTON *et al.*, 2009; WHITAKER *et al.*, 2010). So wiesen KALBURGE *et al.* (2014) darauf hin, dass *V. parahaemolyticus* in Austern und Muscheln, die in sehr NaCl-haltigem Wasser gewachsen sind, eine erhöhte Überlebensrate beim Einfrieren (-20 °C) besitzen könnte und daher das Level des Bakteriums eher durch Hitze (50 °C, > 20 min) reduziert werden sollte.

### 1.6 Klinik von *V. parahaemolyticus*-Infektionen

Die meisten *V. parahaemolyticus*-Stämme sind strikt umweltassoziiert, doch sind auch viele Stämme pathogen für den Menschen. Virulente Stämme können drei unterschiedliche Krankheitsbilder hervorrufen.

Das am häufigsten auftretende Krankheitsbild ist die akute Gastroenteritis, die durch den Verzehr von rohen oder unzureichend gegarten Meeresfrüchten, insbesondere Muscheln, und Fischen hervorgerufen wird, die *V. parahaemolyticus* enthalten. Die Darmentzündung wird durch eine teils starke Schädigung der Mukosa charakterisiert, bei der Serum und Zellen in das Darmlumen austreten (BLAKE *et al.*, 1980). Die dabei auftretenden Symptome umfassen Abdominal-Krämpfe, Durchfall, Übelkeit, Erbrechen, Fieber, Kopfschmerzen und gelegentlich blutigen Durchfall. Die Infektion tritt vier bis 96 Stunden nach dem Verzehr *V. parahaemolyticus*-enthaltender Lebensmittel auf und hält in der Regel bis zu vier Tage an. In immunkompetenten Personen ist die Krankheit selbst-limitierend und kann allein durch orale Rehydrierung behandelt werden (NAIR *et al.*, 2007; YEUNG und BOOR, 2004).

Vor allem unter Fischern und muschelverarbeitenden Personen treten häufig Wundinfektionen auf. Dabei gelangt *V. parahaemolyticus* bei Kontakt mit Wasser oder Meeresfrüchten v. a. über kleine Verletzungen der Hände in die Haut ein (BROBERG *et al.*, 2011; HLADY und KLONTZ, 1996; NISHIBUCHI und KAPER, 1995). Diese Wundinfektionen können auf Cellulitis beschränkt sein, aber auch zu nekrotisierender Fasziiitis, einer seltenen Erkrankung des weichen Gewebes, fortschreiten, die durch eine schnelle Verbreitung der Bakterien und damit Entzündungen und Gewebnekrosen charakterisiert ist und bei eintretendem septischen Schock und Multiorganversagen zum Tod führen kann (AHMAD *et al.*, 2013).

Septikämien können auftreten, wenn *V. parahaemolyticus* in den Blutkreislauf gelangt und so im ganzen Körper verteilt wird. Die resultierende systemische Immunantwort ruft Entzündungen und eine erhöhte vaskuläre Permeabilität hervor, die zu einer Verringerung der zirkulierenden Blutmenge (hypovolämischem Schock), Multiorganversagen und dem Tod führen kann. Besonders gefährdet sind Personen mit bereits bestehenden Erkrankungen wie Diabetes, Krebs, Lebererkrankungen oder



kürzlich durchgeführten Magenoperationen (YEUNG und BOOR, 2004). Immunkompromittierte Personen und solche mit Leberversagen aufgrund von Leberzirrhose oder Hepatitis-Infektionen scheinen das größte Risiko für Septikämien zu besitzen (BLAKE *et al.*, 1979; HLADY und KLONTZ, 1996). In einer Fall-Kontrollstudie, bei der Vibrio-Infektionen in Florida von 1981-1993 analysiert wurden, betrug die Mortalität bei Gastroenteritiden 1 %, bei Wundinfektionen 5 % und bei Septikämien 44 % (HLADY und KLONTZ, 1996). Bei 68 % der Gastroenteritiden und 83 % der Septikämien waren die Infektionen mit dem Verzehr oder der Verarbeitung von rohen Austern verbunden. Generell verlaufen viele Gastroenteritiden eher mild, sodass die Dunkelziffer hoch sein müsste (ALTER, 2012a; DRAKE *et al.*, 2007).

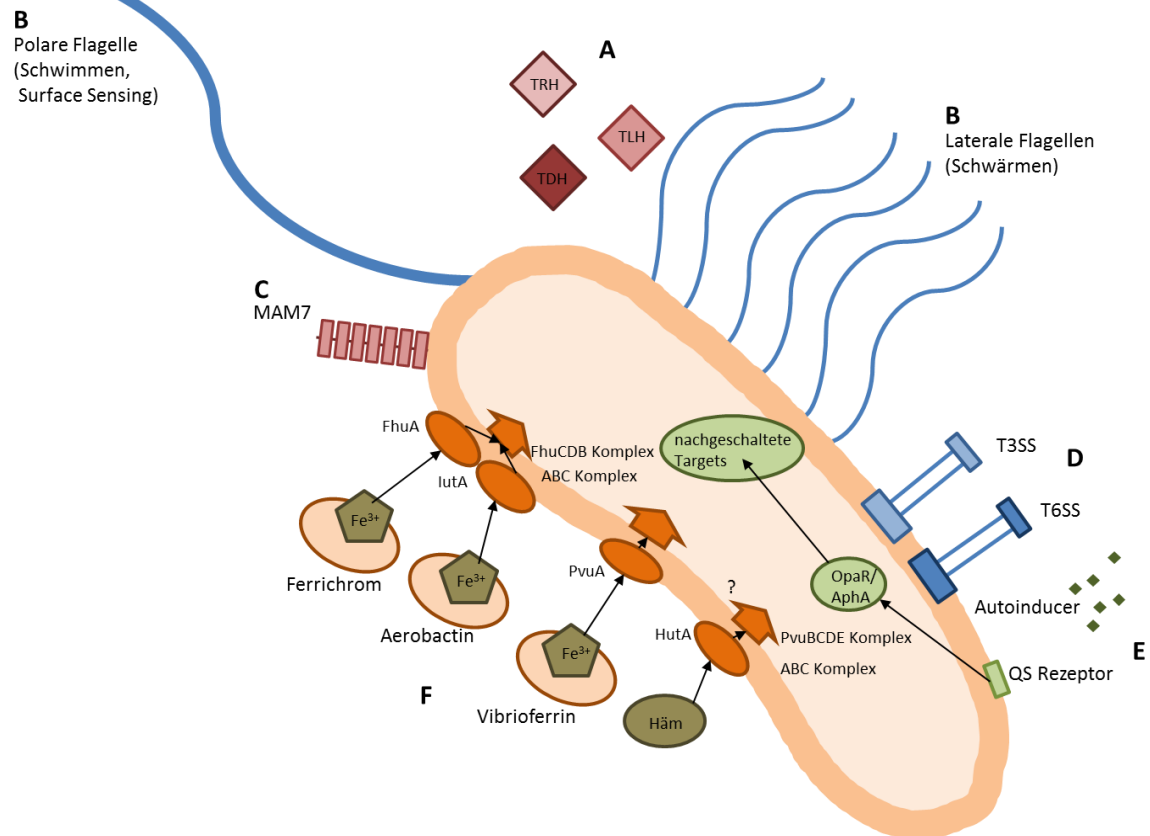
Innerhalb des Wirtes müssen die beweglichen *Vibrio* spp. den Abwehrmechanismen des Wirtes entgehen, die Mukus-Schicht der intestinalen Villi durchdringen, an die Oberfläche der Epithelzellen des Dünndarms adhären und diese besiedeln. Dabei wechseln sie zu einer unbeweglichen Phase, replizieren sich und rufen Erkrankungen hervor, indem sie verschiedene Exoproteine, wie z. B. die Toxine TDH und TRH und Effektoren der Sekretionssysteme, am Ort der Infektion sekretieren (OLIVER und KAPER, 1997). Diese Exoproteine und die Pathogenitätsfaktoren, die zur Besiedlung der Gewebe und Organe sowie zur Ausbreitung im Wirt nötig sind, werden in den folgenden Abschnitten vorgestellt. Durch die Komplexität und Instabilität der Wirtsumgebung sind außerdem mehrere Mechanismen der Stress-Antwort zum Überleben nötig, wie z. B. Systeme zur ROS-Eliminierung, Hitzeschock-Proteine und die Anpassung an niedrige pH-Werte (REEN und BOYD, 2005) (vgl. Abschnitte 1.5.2.5, 1.5.3.1 und 1.5.3.2).

## 1.7 Pathogenitätsfaktoren von *V. parahaemolyticus*

Pathogenitätsfaktoren sind Strukturelemente an sich oder Stoffwechselprodukte der Bakterien, die an der Entstehung von Infektionen beteiligt sind. *V. parahaemolyticus* besitzt eine Vielzahl solcher Pathogenitätsfaktoren. Dazu zählen Adhäsine, Toxine und sekretierte Effektoren, die beim Anheften an Zellen, an der Cytotoxizität und der Enterotoxizität beteiligt sind. Außerdem zählen Quorum-Sensing (QS) und Surface-Sensing, die Fähigkeit zur Eisen-Akquirierung sowie die Bildung von Flagellen, Biofilmen und Kapseln zu den Pathogenitätsfaktoren (BROBERG *et al.*, 2011). Diese werden in den folgenden Abschnitten vorgestellt und sind in Abbildung 7 zusammenfassend dargestellt. Die Toxine und Effektoren sind in Tabelle 4 zusammengefasst.

### 1.7.1 Surface-Sensing

Neben dem Wechsel vom Schwimmer- zum Schwärmer-Typ (vgl. Abschnitt 1.7.4) werden eine Vielzahl anderer Prozesse durch das Surface-Sensing bei *V. parahaemolyticus* reguliert. Dazu zählen eine Reihe von Kolonisations- und Pathogenitätsfaktoren, wie Proteine zur Adhäsion an Chitin und humane Epithelzellen, Komponenten der Typ III und Typ VI Sekretionssysteme (T3SS und T6SS) sowie Collagenasen (GODE-POTRATZ *et al.*, 2011). So zeigte *V. parahaemolyticus*, der zuvor auf halbfestem Medium gewachsen ist, eine erhöhte Fähigkeit, Wirtszellen zu zerstören. Das Wachstum auf Oberflächen bzw. das Erkennen dieser scheint *V. parahaemolyticus* demnach auf eine Adhäsion an und Invasion in Wirtszellen vorzubereiten (GODE-POTRATZ *et al.*, 2011).



**Abbildung 7:** Pathogenitätsfaktoren von *V. parahaemolyticus*

**A** Exotoxine TLH, TDH und TRH, **B** polare Flagelle bzw. laterale Flagellen, **C** Adhäsionsmolekül MAM7, **D** Sekretionssysteme T3SS und T6SS, **E** Quorum-Sensing über Autoinducer, Rezeptor und OpaR, **F** Eisenakquirierung mittels Ferrichrom, Aerobactin, Vibrioferriin und Häm. Modifiziert nach BROBERG *et al.* (2011) und ZHANG und ORTH (2013).

### 1.7.2 Biofilm-Bildung

Biofilme sind eine oberflächenassoziierte und von Exopolymer-Matrix umschlossene multizelluläre Gemeinschaft einer oder mehrerer Bakterien-Spezies und ein Wachstum innerhalb dieser Matrix stellt eine wichtige Überlebensstrategie vieler Bakterien dar (COSTERTON *et al.*, 1995; DONLAN und COSTERTON, 2002; ENOS-BERLAGE *et al.*, 2005; O'TOOLE *et al.*, 2000; SHIRTLIFF *et al.*, 2002). *V. parahaemolyticus* kann sowohl an Luft/Flüssigkeit- als auch Festkörper/Flüssigkeit-Grenzen robuste Biofilme ausbilden (ENOS-BERLAGE *et al.*, 2005; LAWRENCE *et al.*, 1992; LAWRENCE *et al.*, 1991). Je nach Art der Interaktion (Zelle-Zelle, Zelle-Oberfläche oder Zelle-Matrix) unterscheidet sich die Biofilmbildung und -architektur (ENOS-BERLAGE *et al.*, 2005). Viele bakterielle Infektionen entstehen durch Biofilme, da Bakterien innerhalb von Biofilmen eine reduzierte Empfindlichkeit gegenüber antibakteriellen Substanzen und der Immunantwort ihrer Wirte zeigen (WILSON, 2001; WILSON *et al.*, 2002). Rund 88 % aller von CHAO *et al.* (2010) untersuchten pandemischen, pathogenen und umweltassoziierten *V. parahaemolyticus*-Stämme besaßen alle zuvor identifizierten Gene, die mit der Bildung von Biofilmen assoziiert sind (BOYD *et al.*, 2008; CHAO *et al.*, 2010). Der Regulator *aphA* nimmt eine Sonderstellung ein, da er die Transkription von Biofilm- und Virulenz-assoziierten Genen aktiviert und so auf zwei Arten die Fähigkeit zur Infektion und Kolonisation von *V. parahaemolyticus* erhöht (WANG *et al.*, 2013).

### 1.7.3 Adhäsine

Zu den Adhäsinen gehören Fimbrien oder Membranproteine, die den Bakterien ein Anhaften an Zielzellen ermöglichen. Dabei interagieren die Adhäsine mit homologen Rezeptoren der Wirtszelle. Während einer Infektion werden verschiedene Adhäsine exprimiert, die den Kontakt zur Wirtszelle herstellen, der nötig ist, um Effektoren oder Toxine zu sekretieren. Bei *V. parahaemolyticus* können sowohl klinische als auch umweltassoziierte Stämme an humane Zellen adhären, dabei ist der Grad der Adhärenz variabel (HACKNEY *et al.*, 1980). Von Patienten isolierte Stämme zeigten stets große und Umweltstämme stets nur schwache Adhärenz. Dabei ist ein einzelnes Protein der äußeren Membran nötig und ausreichend, um den initialen Kontakt zu verschiedenen Zelllinien herzustellen. Dieses multivalente Adhäsions-Molekül (MAM7) besteht aus sieben Domänen und dient zum Eintritt in Säugetierzellen. Verschiedene andere gramnegative Pathogene besitzen homologe Domänen. MAM7 bindet an Fibronectin und Phosphatidsäure der Phospholipide und ist essentiell für die Zell-Anheftung und den T3SS-vermittelten Zelltod (KRACHLER *et al.*, 2011; KRACHLER und ORTH, 2011). Durch ein Blockieren dieser beiden Zielmoleküle konnte eine Bindung von *V. parahaemolyticus* an die Wirtszelle verhindert werden (KRACHLER *et al.*, 2011). Somit könnte eine solche Blockade als therapeutische Methode für durch *V. parahaemolyticus* und andere gramnegative Bakterien ausgelöste Infektionen eingesetzt werden.

### 1.7.4 Invasionsfaktoren

Invasionsfaktoren ermöglichen es Bakterien, sich im Gewebe auszubreiten. Dazu zählen u. a. Proteasen zum Auflösen von Proteinen, DNasen zum Abbau von DNA oder auch Lipasen zum Auflösen von Lipiden sowie Flagellen, die eine aktive Beweglichkeit ermöglichen.

*V. parahaemolyticus* kann verschiedene an seiner Pathogenität beteiligte Enzyme produzieren, wie z. B. Lipasen, Gelatinasen und Collagenasen (BAFFONE *et al.*, 2001; GODE-POTRATZ *et al.*, 2011). Extrazelluläre proteolytische Enzyme hydrolysieren die Peptid-Bindungen von Proteinen und Peptiden und sind an verschiedenen physiologischen Prozessen beteiligt (MIYOSHI, 2013). *V. parahaemolyticus* besitzt eine Metalloprotease, die Collagenase VppC, die vermutlich an der Entstehung von Wundinfektionen beteiligt ist, da sie Bestandteile der extrazellulären Matrix abbaut und so die Ausbreitung von *V. parahaemolyticus* im Gewebe beschleunigt. Die Serin-Protease A/VVP1 gehört zu den Chymotrypsin-ähnlichen Proteasen und besitzt proteolytische Aktivität gegenüber Laminin und Typ I Collagen, die beide Bestandteile der extrazellulären Matrix sind. Die Produktion beider Enzyme ist bei 25 °C, der Oberflächentemperatur des menschlichen Körpers, induziert.

Neben diesen Enzymen besitzt *V. parahaemolyticus* eine konstitutiv exprimierte polare Flagelle, die zur Fortbewegung in flüssiger Umgebung dient (McCARTER, 1999). Das Filament besteht aus sechs verschiedenen ummantelten Flagellin-Proteinen, die ggf. eine Rolle bei der Anheftung spielen. Die Energie, die zur Rotation der Flagelle benötigt wird, stammt aus dem Konzentrationsgefälle von Natrium-Ionen, was im Meerwasser bei pH 8 vorteilhaft ist. Die von *V. parahaemolyticus* erreichte Maximalgeschwindigkeit beträgt rund 60 µm/s. Wird die Rotationsgeschwindigkeit der polaren Flagelle durch höhere Viskosität der Umgebung oder bei reduziertem Eisengehalt verringert, wechselt *V. parahaemolyticus* vom Schwimmer- zum Schwärmer-Zelltyp. Dazu wird eine Vielzahl von nicht-ummantelten peritrichen Flagellen gebildet, die ein Schwärmen auf festen oder halbfesten Oberflächen ermöglichen. Sie unterscheiden sich von der polaren Flagelle dadurch, dass sie aus nur

einem Flagellin-Protein bestehen und von der protomotorischen Kraft angetrieben werden.

### 1.7.5 Quorum-Sensing

Viele Pathogenitätsfaktoren und Faktoren der Stressantwort werden durch Quorum-Sensing (QS) koordiniert und reguliert (REEN und BOYD, 2005). QS ist ein von der Zelldichte abhängiger Genregulations-Mechanismus (MILLER und BASSLER, 2001; VON BODMAN *et al.*, 2008; WATERS und BASSLER, 2005). Bakterien produzieren niedermolekulare diffusionsfähige Signalmoleküle – sogenannte Autoinducer –, die akkumulieren, wenn die Zelldichte ansteigt. Die Autoinducer-Moleküle werden aus dem extrazellulären Raum aufgenommen und ermöglichen so die Detektion der Zelldichte. Sobald die Konzentration der aufgenommenen Autoinducer einen bestimmten Schwellenwert übersteigt und somit eine hohe bakterielle Zelldichte signalisiert, erfolgt – vermutlich über einen Master-QS-Regulator – eine Veränderung der Genexpression vieler Ziel-Gene (REEN und BOYD, 2005).

*V. parahaemolyticus* besitzt wie *V. harveyi* drei verbreitete Systeme zum QS, die unabhängig voneinander auf Stimuli reagieren, aber alle im Regulator-Protein LuxO zusammenfließen (HENKE und BASSLER, 2004). Vom QS werden viele Zellfunktionen wie Symbiose, Virulenz, Kompetenz, Konjugation, Motilität und Biofilm-Bildung reguliert. Der Master-QS-Regulator OpaR reguliert das T3SS1 und die T6SSs, die Induktion der Kapselbildung sowie das Schwärmen (GODE-POTRATZ und MCCARTER, 2011).

### 1.7.6 Phasen-Variationen und Kapsel

Für die Untersuchung von Phasen-Variationen wurde insbesondere *V. vulnificus* betrachtet. Dagegen wurden Phasen-Variationen bei *V. parahaemolyticus* kaum untersucht, können aber auch bei diesem und anderen pathogenen Mikroorganismen beobachtet werden (ENOS-BERLAGE *et al.*, 2005; ENOS-BERLAGE und MCCARTER, 2000; WHITAKER und BOYD, 2012). Phänotypisch führen Phasen-Variationen zu einer durchscheinenden Kolonie-Morphologie, im Gegensatz zur sonst typischen opaken Morphologie. Der Wechsel von opaker zur durchscheinenden Kolonie-Morphologie ist assoziiert mit einer verringerten Menge an kapsulären Polysacchariden (CPS), die von Zellen in einer Kolonie produziert werden und die Zellkapsel bilden (HILTON *et al.*, 2006; WRIGHT *et al.*, 2001). CPS – bzw. das Fehlen dieser – haben eine wichtige Funktion bei der Interaktion mit dem Immunsystem des Wirtes und beim Überleben im Wirt, allerdings ist die Funktion der CPS noch nicht vollständig untersucht (WHITAKER und BOYD, 2012). Für *V. vulnificus* konnte gezeigt werden, dass die Kapsel das Bakterium schützt, indem es Resistenz gegenüber den bakteriziden Effekten des Serums verleiht und eine Phagozytose durch Makrophagen verhindert (STROM und PARANJPYE, 2000; YOSHIDA *et al.*, 1985).

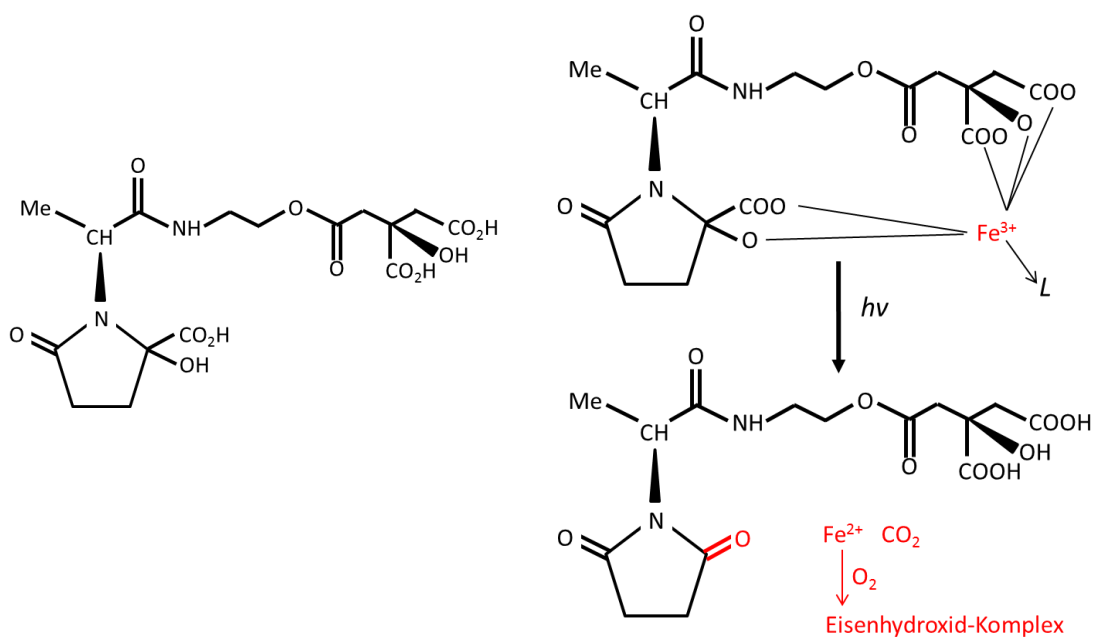
Die Fähigkeit, der Immunantwort des Wirtes zu entgehen und starke Gewebeschäden im Wirt zu erzeugen, hängt zumindest teilweise davon ab, ob der Infektionsstamm CPS besitzt (SIMPSON *et al.*, 1987). Bei *V. vulnificus* trat der Wechsel zwischen beiden Morphologie-Typen zufällig und mit niedriger Frequenz auf, wobei eine Temperaturerhöhung von 30 °C auf 37 °C den Wechsel zur durchscheinenden Morphologie begünstigte (HILTON *et al.*, 2006). Außerdem konnte beobachtet werden, dass klinische Stämme seltener als Umweltstämme zur durchscheinenden Morphologie wechselten (WHITAKER und BOYD, 2012). Dies deutet darauf hin, dass eine vermehrte CPS-Produktion

zum Überleben im Wirt nötig ist, wohingegen in der marinen Umwelt eine verringerte Anzahl CPS benötigt werden bzw. ausreichend sind. Neben dem Schutz vor Phagozytose kann die Kapsel auch als Schutz vor äußeren Stressoren dienen, wie z. B. Austrocknung (GIBSON *et al.*, 2006; OPHIR und GUTNICK, 1994).

### 1.7.7 Eisen-Akquirierung

Die Ursachen, die zum Eisenmangel im Wirt führen, sowie der Mechanismus zur Genregulation durch Eisen wurden im Abschnitt 1.5.3.4 detailliert dargestellt.

Da im Wirt und in der Umwelt nur wenig verwertbares Eisen vorhanden ist, haben Bakterien verschiedene Methoden entwickelt, um das lebenswichtige Element zu akquirieren. Im menschlichen Organismus ist Eisen mit den molekularen Komplexen Transferrin, Lactoferrin, Ferritin und Hämoglobin assoziiert. Bei Infektionen verwenden Bakterien Eisen-Chelatoren (Siderophore), um Eisen vom Wirt zu erhalten (KUSTUSCH *et al.*, 2011). *V. parahaemolyticus* produziert das Siderophor Vibrioferrin, dargestellt in Abbildung 8, das vermutlich von Proteinen des *pvs*ABCDE-Operons synthetisiert und sekretiert wird (AMIN *et al.*, 2009). Zur Vibrioferrin-Aufnahme dienen die Siderophor-Membranrezeptoren PvuA1 und PvuA2, die an ATP-bindende Kassetten (ABC) der inneren Membran gekoppelt sind. Das ABC-Transportsystem wird von Genen des *pvu*BCDE-Genclusters codiert und zum Transport der Siderophore über die innere Membran benötigt (TANABE *et al.*, 2003). Die Energie zum Transport des Vibrioferrin-Fe<sup>3+</sup> wird durch die TonB-Systeme (TonB1 und TonB2) aus der protomotorischen Kraft weitergeleitet (KUEHL und CROSA, 2010; TANABE *et al.*, 2011). Eine einzigartige Eigenschaft von Vibrioferrin ist dessen Photosensitivität, sobald Fe<sup>3+</sup> komplexiert ist. Bei der Anwesenheit von Licht wird Vibrioferrin-Fe<sup>3+</sup> photolysiert, dabei wird die Carboxylat-Gruppe des Siderophors als CO<sub>2</sub> abgespalten und das gebundene Fe<sup>3+</sup> zu Fe<sup>2+</sup> reduziert (AMIN *et al.*, 2009). Dieser Prozess ist irreversibel, da das photolysierte Vibrioferrin keine Affinität zu Fe<sup>3+</sup> zeigt. Das entstandene Fe<sup>2+</sup> wird vorübergehend zu einem Eisenhydroxid-Komplex oxidiert, der vergleichsweise löslich bleibt. Dieser lösliche transiente Eisenpool kann leichter von Bakterien aufgenommen werden



**Abbildung 8:** Vibrioferrin und die Photolyse von Vibrioferrin-Fe<sup>3+</sup>

Dargestellt ist die Strukturformel von Vibrioferrin sowie die photolytische Umwandlung des Vibrioferrin-Fe<sup>3+</sup> unter Abspaltung der Carboxylat-Gruppe und Reduktion des Fe<sup>3+</sup>.

als Vibrioferrin-Fe<sup>3+</sup> selbst (AMIN *et al.*, 2009).

Klinische *V. parahaemolyticus*-Stämme produzieren größere Mengen Vibrioferrin als umweltassoziierte Stämme und zeigen dadurch eine größere Adhärenz an Wirtszellen, eine größere hämolytische Aktivität und weisen eine höhere Proliferationsrate auf (DAI *et al.*, 1992; WONG und LEE, 1994). Eisen kann außerdem mit Hilfe der Siderophore Ferrichrom und Aerobactin, die von anderen Bakterien oder Pilzen produziert wurden, über vergleichbare Systeme (FhuA, IutA und FhuCDB-Komplex) aufgenommen werden (FUNAHASHI *et al.*, 2009). Das von *Enterobacteriaceae* gebildete Enterobactin kann durch die Rezeptoren IrgA und VctA, durch das von *vctPDGC* codierte ABC-Transport System und mit der Energie aus TonB1 und TonB2 genutzt werden (TANABE *et al.*, 2012). Unter Eisen-limitierten Bedingungen und bei Anwesenheit von Enterobactin aktivieren die transkriptionellen Regulatoren IrgB und VctR die Expression von *irgA* und *vctA* (TANABE *et al.*, 2012). Die Proteine, die zur Verwertung von Häm als Eisenquelle zum Einsatz kommen, sind unbekannt. *V. parahaemolyticus* besitzt ein Homolog zum *V. cholerae* Häm-Membranrezeptor *hutA* (VPA0882), aber dessen Funktion wurde bisher nicht charakterisiert (O'MALLEY *et al.*, 1999).

### 1.7.8 Endotoxine

Als Endotoxine werden Toxine bezeichnet, die aus der äußeren Zellmembran gramnegativer Bakterien stammen. Das einzige bekannte Endotoxin Lipid A kommt in den LPS der äußeren Membran vor und wird durch den Zerfall der Membran beim Absterben der Bakterien freigesetzt (JACOBS *et al.*, 1997). Durch Lipid A werden Signalwege von immunkompetenten Zellen aktiviert, die zu einer Entzündung oder zur Apoptose führen können. Das Endotoxin von *V. parahaemolyticus* besitzt Ähnlichkeit zum Endotoxin von *S. Typhi* und anderer *Enterobacteriaceae* (SOCHARD und COLWELL, 1976, 1979). Ein Fall eines Endotoxin-Schocks wurde beschrieben, der bei einer durch *V. parahaemolyticus* verursachten Wundinfektion und Gastroenteritis auftrat (ROLAND, 1970).

### 1.7.9 Exotoxine

Im Gegensatz zu Endotoxinen werden Exotoxine von lebenden Bakterien sezerniert. Bei *V. parahaemolyticus* wurden bisher drei verschiedene Exotoxine identifiziert.

Das thermolabile Toxin (TLH) wurde in allen Stämmen gefunden, allerdings ist sehr wenig über seine Funktion bekannt. Unter Bedingungen, die denen im menschlichen Darm entsprechen, wurde eine starke Induktion des *tlh*-Gens beobachtet (GOTOH *et al.*, 2010). Daher kann eine wichtige Beteiligung des Toxins an Infektionen vermutet werden.

Fast alle klinischen *V. parahaemolyticus*-Stämme besitzen  $\beta$ -hämolytische Aktivität, die auf der Aktivität der Toxine Thermostabiles Direktes Hämolysin (TDH) und/oder TDH-ähnliches Hämolysin (TRH) beruht (NISHIBUCHI und KAPER, 1995). Beide Toxine bestehen aus 189 Aminosäuren und besitzen die gleiche Sekundärstruktur (HUEHN, 2012b). TDH ist nach 10 min bei 100 °C noch aktiv und die Wirkung wird nicht durch Zugabe von Lecithin erhöht, d. h. sie ist direkt (NISHIBUCHI und KAPER, 1995; SAKURAI *et al.*, 1973). Die Gene für beide Toxine sind auf mobilen Elementen codiert (NISHIBUCHI und KAPER, 1995; PARK *et al.*, 2000) und wurden auch bei anderen *Vibrio* spp. detektiert (HONDA *et al.*, 1986; NISHIBUCHI *et al.*, 1985; NISHIBUCHI *et al.*, 1996; NISHIBUCHI und KAPER, 1990). Obwohl nur ein kleiner Teil der umweltassoziierten *V. parahaemolyticus*-Isolate *tdh*<sup>+</sup> und/oder *trh*<sup>+</sup> ist, wird vermutet, dass das marine Ökosystem als Reservoir für diese Gene dient (ALAM *et al.*, 2002).

**Tabelle 4:** Toxine und Effektoren von *V. parahaemolyticus* [nach BROBERG *et al.* (2011), ZHANG und ORTH (2013) und SALOMON *et al.* (2013b)]

Name	Aktivität	Funktion und Referenz
<b>Toxine und Adhäsine</b>		
TDH	porenbildendes Toxin	bedingt Cyto- und Enterotoxizität (MATSUDA <i>et al.</i> , 2010; OHNISHI <i>et al.</i> , 2011; YANAGIHARA <i>et al.</i> , 2010)
TRH	porenbildendes Toxin	bedingt Cyto- und Enterotoxizität (OHNISHI <i>et al.</i> , 2011; SHIMOHATA und TAKAHASHI, 2010; SHINODA, 2011)
MAM7	bindet an Fibronectin und Phosphatidsäure der Phospholipide	ermöglicht Anheftung des Bakteriums an Wirtszelle (KRACHLER <i>et al.</i> , 2011; KRACHLER und ORTH, 2011)
<b>T3SS1-Effektoren</b>		
VopQ (VP1680)	bindet an V-ATPase	induziert Autophagie (BURDETTE <i>et al.</i> , 2009; BURDETTE <i>et al.</i> , 2008; MATSUDA <i>et al.</i> , 2012; ONO <i>et al.</i> , 2006)
VopR (VP1683)	bindet spezifisch an Phosphoinositide der Plasmamembran	unbekannt (ONO <i>et al.</i> , 2006; SALOMON <i>et al.</i> , 2013b)
VopS (VP1686)	AMPyliert GTPasen der Rho-Familie	zerstört Aktin-Cytoskelett (LUONG <i>et al.</i> , 2010; ONO <i>et al.</i> , 2006; YARBROUGH <i>et al.</i> , 2009)
VPA0450	hydrolysiert PI(4,5)P <sub>2</sub> zu PI4P	zerstört die Integrität der Plasmamembran (BROBERG <i>et al.</i> , 2010; ONO <i>et al.</i> , 2006)
<b>T3SS2-Effektoren</b>		
VopC (VPA1321)	deaminiert Rho-GTPase, macht sie konstitutiv aktiv	zerstört Aktin-Netzwerk, ermöglicht bakterielle Invasion und inhibiert Apoptose (Hypothese) (KODAMA <i>et al.</i> , 2007; ZHANG <i>et al.</i> , 2012)
VopT (VPA1327)	ADP-Ribosylierung von Ras	Induktion der Cytotoxizität (KODAMA <i>et al.</i> , 2007)
VopA/P (VPA1346)	inhibiert MAPK Signaling	unterdrückt die angeborene Immunantwort und die Cytokin-Produktion (KODAMA <i>et al.</i> , 2007; LAWRENCE <i>et al.</i> , 2008; TROSKY <i>et al.</i> , 2007; TROSKY <i>et al.</i> , 2004)
VopV (VPA1357)	Aktin Bindung und Bündelung	bedingt Cyto- und Enterotoxizität (HIYOSHI <i>et al.</i> , 2011)
VopL (VPA1370)	Umbau der Aktin-Filamente	Induktion der Aktin-Stressfasern, Veränderung der Zellform, Verlust der Integrität der tight-junctions (LIVERMAN <i>et al.</i> , 2007; NAMGOONG <i>et al.</i> , 2011; YU <i>et al.</i> , 2011a; ZAHM <i>et al.</i> , 2013)
VPA1380	Cystein-Protease	Abbau von Wirtssubstraten (CALDER <i>et al.</i> , 2014)

TDH, Thermostabiles Direktes Hämolyisin; TRH, TDH-verwandtes Hämolyisin; MAM, multivalentes Adhäsions-Molekül; T3SS, Typ III Sekretionssystem; ATP, Adenosintriphosphat; V-ATPase, ATPase der Vakuole; AMP, Adenosinmonophosphat; GTP, Guanosintriphosphat; PI4P, Phosphatidylinositol-4-phosphat; ADP, Adenosindiphosphat; MAP, Mitogen-aktiviertes Protein; MAPK, MAP-Kinase

Insgesamt sind fünf verschiedene Varianten des Toxins TDH beschrieben worden, die sich nur zu ca. 3 % in ihrer Sequenz unterscheiden (NISHIBUCHI und KAPER, 1995). In Lösung formt TDH ein Tetramer, dessen Pore einen Durchmesser von 23 Å und eine Höhe von 50 Å besitzt. Diese somit eher große Pore besitzt eine niedrige Ionen-Selektivität, die es sowohl Wasser als auch Ionen erlaubt, ohne großen Widerstand aus der Zelle hinaus- oder in die Zelle hineinzuströmen (YANAGIHARA *et al.*, 2010). Diese Veränderung des Ionen-Flusses in betroffenen Darmzellen ist verantwortlich für den bei einer Infektion auftretenden Durchfall (FABBRI *et al.*, 1999). Des Weiteren ist TDH ein reversibles Amyloid-Toxin, das an Liposomen anheftet und vermutlich porenbildende Eigenschaften besitzt (FUKUI *et al.*, 2005). Die gebildeten Poren haben einen Durchmesser von ca. 2 nm, werden in die

eukaryotische Zellmembran von z. B. Erythrozyten inseriert und zerstören so die Integrität der Zellmembranen (HONDA *et al.*, 1992). Die genaue molekulare Funktion ist unbekannt, an Zellkulturen konnte aber gezeigt werden, dass TDH Cytotoxizität besitzt, indem es Poren in Cholesterin-reiche Mikrodomänen der Plasmamembran – Lipid Rafts – induziert. Die hämolytische Aktivität von TDH ist davon unabhängig (MATSUDA *et al.*, 2010).

In *in vitro* Versuchen konnte gezeigt werden, dass TRH wie TDH als Tetramer vorliegt und eine ähnliche hämolytische Aktivität besitzt, dies kann mit der hohen Sequenzhomologie (69 %) der beiden Toxine erklärt werden (OHNISHI *et al.*, 2011; TANIGUCHI *et al.*, 1986). Beide Toxine stammen vermutlich von einer gemeinsamen Urform ab (HONDA *et al.*, 1988; NISHIBUCHI *et al.*, 1989). Verschiedene Varianten des *trh*-Gens unterscheiden sich in einzelnen Nukleotiden und die resultierenden TRH-Varianten rufen eine unterschiedlich starke Hämolyse hervor (KISHISHITA *et al.*, 1992). Alle Varianten stammen aber wahrscheinlich von einer ursprünglichen Form ab und lassen sich durch Hitze inaktivieren.

Obwohl TDH und TRH als die Hauptpathogenitätsfaktoren von *V. parahaemolyticus* galten, behielten Mutanten mit deletierten Genen ihre Cytotoxizität gegenüber Zellkulturen und die Schwere der Enterotoxizität war nur teilweise reduziert (HIYOSHI *et al.*, 2011; PINEYRO *et al.*, 2010; RITCHIE *et al.*, 2012; SHIMOHATA und TAKAHASHI, 2010; SHINODA, 2011; ZHANG *et al.*, 2012). Demnach müssen andere Pathogenitätsfaktoren für die verbleibende Virulenz von *tdh*<sup>-</sup> und *trh*<sup>-</sup>-*V. parahaemolyticus* verantwortlich sein (LIVERMAN *et al.*, 2007; LYNCH *et al.*, 2005; PARK *et al.*, 2004a; PARK *et al.*, 2004b; SHIMOHATA und TAKAHASHI, 2010; XU *et al.*, 1994).

### 1.7.10 Typ III Sekretionssysteme

Typ III Sekretionssysteme (T3SS) sind nadelähnliche Strukturen – Injektisome –, die an der Anheftung an Wirtszellen beteiligt sind und mit deren Hilfe bakterielle Proteine direkt in die eukaryotische Wirtszelle injiziert werden können, ohne dass sie dem extrazellulären Raum ausgesetzt werden (CORNELIS, 2006; HUEHN, 2012a). Der T3SS-Apparat besteht aus einem Basalkörper, der die bakterielle innere und äußere Membran durchspannt, einer Nadel, die in den extrazellulären Raum hineinreicht, und der Spitze, die vermutlich an der T3SS-Aktivierung beteiligt ist (DICKENSON *et al.*, 2011; IZORE *et al.*, 2011). Die strukturellen Komponenten der T3SS sind konserviert, während die sekretierten Effektoren und Ziele je nach Spezies variieren (Tabelle 4).

Bei *V. parahaemolyticus* RIMD 2210633 wurden zwei T3SS identifiziert. Auf Chromosom 1 sind die unter umweltassoziierten als auch klinischen Stämmen verbreiteten Gene lokalisiert, die für T3SS1 codieren (PARANJPYE *et al.*, 2012). Vier verschiedene Effektoren werden vom T3SS1 sekretiert. VopQ aktiviert den MAPK-Weg, bindet an V-ATPase und ruft schnelle Autophagie hervor, wodurch ein Abbau der Bakterien durch die Wirtszelle verhindert wird (BROBERG *et al.*, 2010; BURDETTE *et al.*, 2009; BURDETTE *et al.*, 2008; MATLAWSKA-WASOWSKA *et al.*, 2010; MATSUDA *et al.*, 2012; SHIMOHATA *et al.*, 2011). VopS heftet ein AMP an GTPasen der Rho-Familie, was zu einem Zerfall des Aktin-Cytoskeletts und einer Abrundung der Zellen führt (LUONG *et al.*, 2010; YARBROUGH *et al.*, 2009). Durch VPA0450 wird die Homöostase des Phosphatidylinositols zerstört, was zu einer Dissoziation des Cytoskeletts von der Plasmamembran führt und in einem Abschnüren von Membranvesikeln – als Zeiose oder Blebbing bezeichnet – resultiert, was wiederum zur Zellyse beiträgt (BROBERG *et al.*, 2010). Das Ziel und der Wirkmechanismus des vierten Effektors VopR sind nicht bekannt, allerdings



weiß man, dass VopR an Phosphoinositide der Plasmamembran des Wirtes bindet und diese spezifische Bindung zur Faltung von VopR führt (ONO *et al.*, 2006; SALOMON *et al.*, 2013b). Es wird angenommen, dass die Aktivität der vier Effektoren zeitlich reguliert wird und das Infektionsprofil dem Muster von Autophagie, Membran-Blebbing, Zell-Abbrundung und schließlich Zellyse folgt (BROBERG *et al.*, 2010). In einer RNA-Sequenzierungsstudie konnte gezeigt werden, dass alle vier Effektoren sechs Stunden nach der Infektion von humanen Epithelzellen eines Zervix-Karzinoms (HeLa-Zellen) die stärkste Induktion zeigten (NYDAM *et al.*, 2014).

Die Gene für das T3SS2 sind in einer Pathogenitätsinsel auf Chromosom 2 lokalisiert, die auch *tdh* codiert und hauptsächlich bei klinischen Stämmen identifiziert wurde (MAKINO *et al.*, 2003; MEADOR *et al.*, 2007; PARANJPYE *et al.*, 2012; PARK *et al.*, 2004b). Das Sekretionssystem wird zusammen mit *tdh* co-reguliert und durch Kontakt mit Gallensäure induziert (GOTOH *et al.*, 2010; KODAMA *et al.*, 2010). Zurzeit sind sechs verschiedene Effektoren des T3SS2 bekannt (Tabelle 4). VopC deaminiert Rac und CDC42, was wiederum zu einer Neuordnung des Aktins, damit zu einer Invasion der Bakterien und einer Verhinderung der Apoptose führt (MIRAGLIA *et al.*, 2007; ZHANG *et al.*, 2012). VopT ist eine ADP-Ribosyltransferase, die die kleine GTPase Ras als Ziel hat (KODAMA *et al.*, 2007). Ras ist an einer Vielzahl zellulärer Prozesse (z. B. Zellwachstum, Differenzierung und Apoptose) beteiligt. VopA/P inhibiert den MAPK-Weg, indem es MAPK-Kinasen acetyliert, und ermöglicht den Bakterien, sich für einige Zellzyklen innerhalb des Phagosoms zu vermehren (TROSKY *et al.*, 2004). VopV bindet und bündelt F-Aktin und ist entscheidend an der T3SS2 vermittelten Enterotoxizität beteiligt (HIYOSHI *et al.*, 2011). Durch VopL wird Aktin nukleiert, dies führt zur Bildung von Filament-ähnlichen Fasern in der Membran (LIVERMAN *et al.*, 2007; NAMGOONG *et al.*, 2011; YU *et al.*, 2011a; ZAHM *et al.*, 2013). Außerdem wird durch VPA1380 eine in Wirtszellen translozierte Cystein-Protease codiert, deren Aktivität vom eukaryotischen Faktor Inositol-Hexakisphosphat (IP6) abhängt und die eine hohe Ähnlichkeit zu verschiedenen anderen bakteriellen Toxinen besitzt (CALDER *et al.*, 2014).

In *tdh<sup>-</sup>trh<sup>+</sup>*-Stämmen konnte bisher kein T3SS2 identifiziert werden. Bei einem *tdh<sup>-</sup>trh<sup>+</sup>*-Stamm konnte ein zu T3SS2 verwandtes, aber zu einer anderen Abstammungslinie gehörendes T3SS identifiziert werden (OKADA *et al.*, 2009). Die Gene für dieses T3SS sind in derselben Pathogenitätsinsel wie *trh* codiert.

Trotz vieler Studien bleibt die exakte Rolle der T3SS bei der Pathogenese unklar. Vermutlich tragen die T3SS dazu bei, dass nicht nur Effektoren transloziert werden, sondern sie ermöglichen *V. parahaemolyticus*, in die Blutbahn zu gelangen und so Septikämien auszulösen. T3SS1, das auch in allen Umweltstämmen vorkommt, ist vermutlich für die Fitness von *V. parahaemolyticus* in seiner natürlichen Umgebung verantwortlich (GODE-POTRATZ *et al.*, 2011). Außerdem ist es an der Pathogenese und dem Überleben im Wirt beteiligt und wird durch Surface-Sensing induziert. Hingegen tritt T3SS2 nahezu ausschließlich in klinischen Stämmen auf, was auf eine entscheidende Funktion bei der Pathogenese schließen lässt (PINEYRO *et al.*, 2010; RITCHIE *et al.*, 2012). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Stämme mit T3SS2 in Gegenwart von Protisten besser überlebten (LASKOWSKI-ARCE und ORTH, 2008; MATZ *et al.*, 2011).

### 1.7.11 Typ VI Sekretionssysteme

Wie T3SS sind auch Typ VI Sekretionssysteme (T6SS) komplexe Injektisome, die Wirtszellen punktieren und Effektor-Proteine in diese translozieren können (SILVERMAN *et al.*, 2012). In etwa

einem Viertel der sequenzierten gramnegativen Bakterien konnten entsprechende Gene identifiziert werden, die an unterschiedlichen Prozessen beteiligt sein können, wie z. B. Virulenz, Symbiose, interbakterieller Interaktion und Antwort auf Umweltstress (JANI und COTTER, 2010; MIYATA *et al.*, 2010; RECORDS, 2011). Bei *V. parahaemolyticus* konnte auf beiden Chromosomen jeweils ein T6SS-Gencluster identifiziert werden (IZUTSU *et al.*, 2008; MAKINO *et al.*, 2003). Rund 79 % der untersuchten pandemischen Stämme besaßen alle Gene, die für die Bestandteile des T6SS1 codieren, während nur 71 % der nicht-pandemischen pathogenen und 54 % der umweltassoziierten Stämme einen Teil dieser Gene besaßen (CHAO *et al.*, 2010). Für T6SS2 konnte keine unterschiedliche Verteilung festgestellt werden (YU *et al.*, 2012). Die Funktionalität wurde noch nicht intensiv erforscht, aber die beiden T6SS tragen vermutlich zur Adhäsion an Wirtszellen bei, scheinen ansonsten aber unterschiedliche Funktionen zu besitzen und/oder bei verschiedenen Umweltbedingungen induziert zu werden (SALOMON *et al.*, 2013a; YU *et al.*, 2012). Die beiden Systeme werden reziprok durch Quorum- und Surface-Sensing reguliert: T6SS1 wird durch den QS-Regulator OpaR reprimiert und durch Surface-Sensing induziert, während T6SS2 durch OpaR induziert und durch Surface-Sensing reprimiert wird (GODE-POTRATZ und McCARTER, 2011; MA *et al.*, 2012; SALOMON *et al.*, 2013a). T6SS1 zeigte bei höheren Temperaturen und NaCl-Konzentrationen, wie sie im Sommer im Meer vorliegen, die höchste Aktivität, wohingegen T6SS2 in Umgebungen mit niedrigen NaCl-Konzentrationen am stärksten induziert war (SALOMON *et al.*, 2013a). Die im T6SS1-Gencluster codierten transkriptionellen Regulatoren VP1391 und VP1407 sind essentiell für die Funktionalität des T6SS1 (SALOMON *et al.*, 2014). H-NS, das für das transkriptionelle Gen-Silencing von horizontal akquirierten Genen verantwortlich ist, fungiert als Repressor für das T6SS1 unter verschiedenen Umweltbedingungen. Außerdem konnte für T6SS1 eine antibakterielle Aktivität gegen andere Spezies und andere *V. parahaemolyticus*-Stämme identifiziert werden (SALOMON *et al.*, 2013a). In Kombination mit der hohen Aktivität in mariner Umgebung scheint dieses System die Fitness klinischer Isolate in der marinen Umwelt zu verbessern, während T6SS2 eher in der Muschel oder dem Menschen funktional ist. Allerdings zeigten beide Systeme keine erhöhte Aktivität bei 37 °C, der im Darm der Landtiere und Menschen vorherrschenden Temperatur. Dies legt nahe, dass die T6SSs keine direkte Rolle bei der Virulenz im Säugetier spielen, sondern eher das Überleben klinischer *V. parahaemolyticus*-Stämme in der Umwelt sichern.

### **1.7.12 Entstehung neuer pathogener Stämme durch Transfer genetischer Elemente**

Ein Mechanismus, durch den die Fähigkeit zur Virulenz verändert werden kann oder neue pathogene Stämme entstehen können, ist der horizontale und vertikale Transfer von genetischen Elementen, wie z. B. von Pathogenitätsfaktoren in bakteriellen Populationen (WALDOR und MEKALANOS, 1996). Bakterielle Pathogenitätsfaktoren können durch zusätzliche genetische Elemente wie Plasmide, Bakteriophagen, Transposons und Pathogenitätsinseln codiert werden. Bei *V. parahaemolyticus* RIMD 2210633 konnten sieben Pathogenitätsinseln identifiziert werden, wobei die meisten ausschließlich in weiteren Stämmen des pandemischen Klons nachgewiesen werden konnten (HURLEY *et al.*, 2006). Diese neuen O3:K6-Isolate haben demnach in einem vergleichsweise kurzen Zeitraum große Regionen neuer DNA erlangt, die vermutlich zur pandemischen Ausbreitung und Pathogenese im Menschen beigetragen haben (HURLEY *et al.*, 2006). Verschiedene Studien legen

nahe, dass es zwischen *V. parahaemolyticus*-Stämmen zu horizontalem Gentransfer kommt. Genetisch sehr ähnliche Stämme wiesen eine unterschiedliche Ausstattung hinsichtlich der Gene *tdh* und *trh* auf, sodass sie diese Elemente vermutlich durch lateralen Gentransfer nach der Diversifizierung erhalten haben (ELLINGSEN *et al.*, 2013). So ist z. B. *tdh* sowohl auf dem Chromosom als auch auf einem Plasmid codiert und konnte auch bei anderen *Vibrio* spp. identifiziert werden (BABA *et al.*, 1991; KLEIN *et al.*, 2013; NISHIBUCHI *et al.*, 1996; NISHIBUCHI und KAPER, 1990; YOH *et al.*, 1985). Auch konnten verschiedene Phagen in *V. parahaemolyticus* nachgewiesen werden (IIDA *et al.*, 2002; NASU *et al.*, 2000; TANIGUCHI *et al.*, 1984). Ein Phage, der bei *V. parahaemolyticus* O4:K58 identifiziert wurde, ist in der Lage, den pandemischen O3:K6 Klon zu infizieren (CHAN *et al.*, 2002). In dem sequenzierten O3:K6 Stamm RIMD 2210633 konnte außerdem eine Vielzahl von Proteinen identifiziert werden, die vermutlich von Phagen stammen, die diesen Stamm zu verschiedenen Zeitpunkten infiziert haben (MAKINO *et al.*, 2003). Es ist davon auszugehen, dass auch weiterhin durch den Austausch mobiler genetischer Elemente neue pathogene *V. parahaemolyticus*-Stämme entstehen (CHANG *et al.*, 1998).

### 1.7.13 Detektion von Pathogenitätsfaktoren

Um das pathogene Potential von *V. parahaemolyticus*-Isolaten abschätzen zu können, werden diese mit klassischen kulturellen bzw. biochemischen Methoden oder molekularbiologischen Methoden hinsichtlich verschiedener Pathogenitätsfaktoren untersucht.

Nur wenige Pathogenitätsfaktoren lassen sich phänotypisch detektieren. Bei *V. parahaemolyticus* kann man zwischen Kanagawa-positiven (KP<sup>+</sup>) und -negativen (KP<sup>-</sup>) Stämmen mittels eines phänotypischen Tests auf Wagatsuma-Agar unterscheiden (MIYAMOTO *et al.*, 1969). Dieser spezielle Hochsalz-Blutagar wurde lange zur Identifizierung pathogener *V. parahaemolyticus*-Stämme eingesetzt. Die Identifizierung beruht auf der Eigenschaft von *tdh*<sup>+</sup>-Stämmen, auf diesem Agar menschliche Erythrozyten durch  $\beta$ -Hämolyse zu lysieren (WAGATSUMA, 1968). Dies wird als Kanagawa-Phänomen bezeichnet. Allerdings liefert dieser Test viele falsch-positive und falsch-negative Ergebnisse (CHUN *et al.*, 1975; NISHIBUCHI *et al.*, 1985). Für das Toxin TRH steht kein solcher Nachweis zur Verfügung. Demnach können auf diese Weise nicht alle potentiell pathogenen *V. parahaemolyticus* identifiziert werden. Außerdem liefern andere *Vibrio*-Spezies, wie z. B. *V. vulnificus* und psychrotrophe *Vibrio*-Spezies, positive Ergebnisse im Kanagawa-Test (JOHNSON und CALIA, 1981; PETERS *et al.*, 1982). Ein weiterer Nachteil ist, dass das Kanagawa-Phänomen als Indikator für pathogene *V. parahaemolyticus* dient, aber häufig Diskrepanzen zwischen der  $\beta$ -Hämolyse und der tatsächlichen TDH-Produktion bestehen (NISHIBUCHI *et al.*, 1985).

Die Serotypisierung basiert auf spezifischen Reaktionen der verwendeten Sera mit i. d. R. Oberflächen-Antigenen. Sowohl die Typisierbarkeit als auch die Verlässlichkeit werden dabei durch Kreuzreaktionen erschwert und sind je nach untersuchter Spezies sehr variabel (VAN BELKUM *et al.*, 2007). Ein generelles Problem der Serotypisierung ist zudem die genetische Instabilität der Antigen-Loki. Durch horizontalen Gentransfer zwischen verschiedenen Spezies und innerhalb einer Spezies kann es zu Veränderungen hinsichtlich der Verteilung der verschiedenen Serotypen kommen (serotype switching). Des Weiteren können sich Antigen-codierende Gene durch den positiven Selektionsdruck mit der Zeit verändern bzw. es können neue Typen auftreten, für die kein passendes Serum erhältlich ist. Einige Serotypisierung-Schemata wurden durch ihre genotypischen Äquivalente

ersetzt oder ergänzt, bei denen die Variabilität auf Ebene der Antigen-codierenden Gene untersucht wird. Alle *V. parahaemolyticus*-Stämme besitzen ein artspezifisches Flagellen-(H)-Antigen und zusätzlich verschiedene somatische (O)- und kapsuläre (K)-Antigene. Das auf den O- und K-Antigenen basierende Serotypisierungs-Schema kann mit Hilfe von kommerziellen Antisera *V. parahaemolyticus*-Isolate in 13 O- und 71 K-Typen differenzieren (IGUCHI *et al.*, 1995; NAIR *et al.*, 2007; SAKAZAKI *et al.*, 1963). Dabei kommen 5 K-Antigene in Kombination mit je 2 O-Antigenen vor. Insgesamt konnten z. B. 75 verschiedene Serotypen identifiziert werden, die mit Gastroenteritis hervorrufenden *V. parahaemolyticus*-Stämmen assoziiert waren (ISHIBASHI *et al.*, 2000). Allerdings lassen sich viele Stämme mit den vorhandenen Antisera nicht typisieren und eine Unterscheidung der Isolate ihrem Ursprung nach ist im Allgemeinen nicht möglich (KAYSNER und DEPAOLA, 2004; YAN *et al.*, 2011). Ein PCR-System zur Identifizierung der verschiedenen O-Typen wurde von CHEN *et al.* (2012a) vorgestellt.

Zu den molekularbiologischen Methoden zur Detektion von Pathogenitätsfaktoren zählt eine Vielzahl PCR-basierter Methoden. So gibt es multiplex PCR-Systeme, die neben den Toxin-Genen *tdh*, *trh* und Genen des T3SS2 zusätzlich Spezies-spezifische Gene als Ziel haben. Dies ermöglicht eine parallele Detektion von pathogenen und apathogenen *V. parahaemolyticus*. Ein weiterer Marker für pathogene Stämme ist das Gen *ure*, das für ein Enzym der Harnstoff-Hydrolyse codiert, da diese Harnstoff-Hydrolyse vor allem bei pathogenen *V. parahaemolyticus*-Stämmen beschrieben wurde und die Gene *tdh*, *trh* und *ure* auf dem Chromosom benachbart sind (ABBOTT *et al.*, 1989; IIDA *et al.*, 1998; KAYSNER *et al.*, 1994). Allerdings wurden auch Urease-produzierende Umweltstämme identifiziert, die kein *trh* besitzen (STRAUCH und DIECKMANN, 2012). Zur Identifizierung des pandemischen Klons von *V. parahaemolyticus* wurden verschiedene GS-PCR-Systeme vorgestellt, bei denen verschiedene Marker verwendet werden. So dienen der open reading frame 8 (ORF8) des filamentösen Phagen f237 (IIDA *et al.*, 2001; NASU *et al.*, 2000) und eine neue Variante des *toxRS*-Gens – *toxRS/new* – (MATSUMOTO *et al.*, 2000) als Marker. Verschiedene Studien zeigten aber, dass diese Systeme auch falsch-positive und falsch-negative Ergebnisse liefern (CHOWDHURY *et al.*, 2004a; OKURA *et al.*, 2003; OSAWA *et al.*, 2002b; RAGHUNATH, 2011). Als Alternative wurde ein duplex PCR-System vorgeschlagen, das *tdh* und *toxRS/new* als Ziel hat, und nur Stämme, die beide Gene besitzen, werden dem pandemischen Klon zugeordnet (OKURA *et al.*, 2003). Auch besteht die Möglichkeit, dass *V. parahaemolyticus* GS-PCR<sup>+</sup> ist und somit zum pandemischen Serovar O3:K6 gehört, aber die Gene *tdh* und *trh* nicht besitzt (THONGJUN *et al.*, 2013). Vermutlich haben solche Stämme *tdh* und *trh* durch Deletion verloren, besitzen aber dennoch pathogenes Potential.

Zur parallelen Detektion vieler verschiedener Marker-Gene einer oder mehrerer Spezies können DNA-Microarray-Analysen verwendet werden (CHEN *et al.*, 2011; PANICKER *et al.*, 2004; VORA *et al.*, 2005).

### 1.8 Molekulare Typisierung von *V. parahaemolyticus*

Zur Typisierung von *V. parahaemolyticus* wurden und werden verschiedene Methoden verwendet. Allgemein ist anzumerken, dass keine Typisierungs-Methode alleine ausreichend ist, um die genetische Verwandtschaft der Stämme komplett zu analysieren, da jede genetische Veränderung unabhängig von anderen passiert und je nach Methode nur ein Teil der Veränderungen erfasst wird (MARSHALL *et al.*, 1999). Einen Überblick über eine Auswahl der vielen bereits durchgeführten Studien

zur Typisierung von *V. parahaemolyticus* zeigt Tabelle A1 im Anhang. Die Typisierung mittels Multi-Locus-Sequenz-Typisierung (MLST) und Aminosäure-MLST (AA-MLST) wird in den Abschnitten 1.8.1 und 1.8.2 ausführlich vorgestellt.

Mittels Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE) und anderen Methoden konnte eine hohe genetische Diversität von lebensmittel- und umweltassoziierten *V. parahaemolyticus*-Stämmen gezeigt werden, wohingegen pandemische Stämme eine sehr homogene Gruppe darstellen (MARSHALL *et al.*, 1999; OKURA *et al.*, 2003; SUFFREDINI *et al.*, 2011; WONG *et al.*, 1999a; ZHANG *et al.*, 2013). Mittels Multiple-Locus Variable Number Tandem Repeat Analysis (MLVA) gelang der Nachweis für eine genetische Heterogenität des pandemischen Genotyps (KIMURA *et al.*, 2008). Rückschlüsse aufgrund der Gruppierung von Stämmen mittels verschiedener Typisierungsmethoden hinsichtlich ihres geographischen Ursprungs oder der Matrix waren in der Regel nicht möglich (WONG *et al.*, 1999a; WONG *et al.*, 1999b). Allerdings konnten mittels PFGE pandemische Stämme aus Europa von solchen aus Amerika und Asien abgegrenzt werden (MARTINEZ-URTAZA *et al.*, 2004). Mit Hilfe der Methoden Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight Massenspektrometrie (MALDI-TOF MS) und Variable Number Tandem Repeat (VNTR) war eine geographische Gruppierung des Serotyps O3:K6 möglich (GARCIA *et al.*, 2012; HAZEN *et al.*, 2009). Zur Unterscheidung von pandemischen und nicht-pandemischen Stämmen bzw. zur Identifikation von Stämmen, die vor oder nach 1996 isoliert wurden, konnten u. a. AP-PCR, Ribotyping und PFGE erfolgreich eingesetzt werden (CHOWDHURY *et al.*, 2000; MATSUMOTO *et al.*, 2000; WONG *et al.*, 2000b; YEUNG *et al.*, 2002). Auch konnten mittels PFGE die neuen pandemischen Serotypen getrennt von den klassischen pandemischen Serotypen gruppiert werden (PAZHANI *et al.*, 2014). Außerdem wurden durch verschiedene Methoden mögliche Marker-Gene für pathogene bzw. pandemische Stämme identifiziert bzw. diese validiert (BHUIYAN *et al.*, 2002; MATSUMOTO *et al.*, 2000; NASU *et al.*, 2000; OKURA *et al.*, 2003; PARVATHI *et al.*, 2006).

### 1.8.1 Multi-Locus-Sequenz-Typisierung

Im Gegensatz zu den meisten Typisierungsmethoden lassen sich mit Hilfe von MLST auch Informationen über phylogenetische Beziehungen der analysierten Stämme untereinander gewinnen (COOPER und FEIL, 2004). MLST dient damit zur genetischen Charakterisierung bakterieller Klone, der globalen Verfolgung von hypervirulenten (oder resistenten) Klonen sowie zur Untersuchung der Evolution bakterieller Populationen und insbesondere bakterieller Klone (FEIL und ENRIGHT, 2004).

Bei der MLST-Analyse werden bakterielle Stämme durch den Sequenzvergleich von Fragmenten ausgewählter relativ konservierter Metabolismus-Gene charakterisiert. Dabei werden in der Regel je nach Bakterienspezies sechs bis acht Gene verwendet, die als Allel-Marker fungieren. Die entsprechenden Fragmente werden in beide Richtungen sequenziert und bei der darauf folgenden Datenanalyse wird jeder einzigartigen Allel-Sequenz eine fortlaufende eindeutige Nummer – ein sogenannter numerischer Identifikator – zugeordnet. Die kombinierten Allel-Identifikatoren ergeben das Allel-Profil und jedem einzigartigen Profil wird wiederum ein numerischer Identifikator – der Sequenztyp (ST) – zugewiesen. Dabei spielt es keine Rolle, wie viele Sequenzunterschiede identifiziert wurden oder ob diese durch einmalige oder mehrfache Mutationen oder Rekombination entstanden sind. Die Profil- und Stamminformationen (z. B. Isolationsort, -matrix, -jahr, Besitz von Pathogenitätsfaktoren) werden in öffentlich zugänglichen Datenbanken hinterlegt, die über das Internet erreichbar sind (JOLLEY *et al.*, 2004).

Die Verwandtschaft der untersuchten Stämme lässt sich anschließend, basierend auf den Allel-Profilen, z. B. mit den frei zugänglichen Programmen eBURST (FEIL *et al.*, 2004) oder goeBURST (FRANCISCO *et al.*, 2009), mit Hilfe von Minimum Spanning Trees (MST) und durch Erstellung von klonalen Komplexen (CC) untersuchen. Dabei beruht die genetische Verwandtschaft nur auf der Anzahl der unterschiedlichen Allele und nicht auf der Anzahl der Mutationen oder Rekombinationen, die zu dem neuen Allel geführt haben (GARCIA *et al.*, 2012). Die Darstellung in MST kann allerdings nur als verlässlich betrachtet werden, wenn die einzelnen Stämme identische oder sehr ähnliche Allel-Profile aufweisen (SPRATT und MAIDEN, 1999). Alternativ können Verwandtschaften auch mittels Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean (UPGMA) erstellt werden, die auf Unterschieden zwischen den zusammengeführten Sequenzen aller Fragmente eines Sequenztyps basieren. In diesem Fall werden die Sequenzen an sich verglichen und jede einzelne Nukleotid-Änderung wird berücksichtigt. Weiterhin sind verschiedene statistische Tests etabliert, wie z. B. die Bestimmung des  $d_N/d_S$ - und  $I_A^S$ -Wertes, die zur Analyse der Substitutionsereignisse oder der Populationsstruktur durchgeführt werden können.

Die Akkumulation von Mutationen in Metabolismus-Genen ist ein vergleichsweise langsamer Prozess, sodass die MLST-Analyse dazu geeignet ist, für globale und längerfristige epidemiologische und phylogenetische Studien genutzt zu werden (ENRIGHT und SPRATT, 1999; STRAUCH und DIECKMANN, 2012). Um die Trennschärfe eines MLST-Schemas zu erhöhen (oder zu verringern), kann die Auswahl der untersuchten Gene verändert werden. So wurde z. B. für *L. monocytogenes* ein Schema zur Multi-Virulenz-Locus-Sequenz-Typisierung (MVLST) entwickelt, bei dem deutlich variabelere Virulenz-Gene analysiert werden (ZHANG *et al.*, 2004).

Der größte Vorteil der MLST-Analyse liegt in der hohen Reproduzierbarkeit auch zwischen verschiedenen Laboratorien, der Austauschbarkeit der Ergebnisse durch frei zugängliche webbasierte Datenbanken und darin, dass abgeschlossene Studien nachträglich durch die Analyseergebnisse neuer Stämme erweitert werden können.

Mit den sinkenden Kosten und der technischen Parallelisierung für DNA-Sequenzierungen wäre es möglich, in der Zukunft auch Schemata zur Typisierung ganzer Gattungen zu entwickeln, die die bisherige Taxonomie revolutionieren könnten (COOPER und FEIL, 2004).

### 1.8.1.1 Multi-Locus-Sequenz-Typisierung bei *V. parahaemolyticus*

Das MLST-Schema für *V. parahaemolyticus* wurde von GONZALEZ-ESCALONA *et al.* (2008) entwickelt und ist in der frei zugänglichen pubMLST-Datenbank unter <http://pubmlst.org/vparahaemolyticus/> hinterlegt (vgl. Abschnitt 2.2.4.1). Außerdem sind die an die Datenbank gesendeten Informationen zu den typisierten Stämmen sowie deren Allel-Profile dort gespeichert.

Die *V. parahaemolyticus*-Population ist durch einen hohen Grad genetischer Diversität gekennzeichnet, die in erster Linie durch Rekombination entstanden ist und daher als semi-klonal bezeichnet wird (GONZALEZ-ESCALONA *et al.*, 2008; YAN *et al.*, 2011). In seinem Habitat begegnet *V. parahaemolyticus* wechselnden Umweltbedingungen (BAKER-AUSTIN *et al.*, 2010). Die Mehrheit der bakteriellen Population ist sehr divers und hoch-rekombinant. Wenn bei der Anpassung an wechselnde Umweltbedingungen oder Habitate sehr gut adaptierte bzw. sich schneller adaptierende Klone entstehen, vermehren sich diese stark (FEIL, 2004). Dieser Vorgang folgt dem pandemischen

Modell der klonalen Ausbreitung. Bei MLST-Analysen werden solche adaptierten Klone als klonale Komplexe (CC) bezeichnet und durch Stämme charakterisiert, deren Allel-Profile bzw. Sequenztypen sich in höchstens einem Allel unterscheiden. Der pandemische Klon von *V. parahaemolyticus*, bestehend aus O3:K6-Stämmen und deren Serovarianten, besitzt die gleichen genetischen Eigenschaften ( $trh^-$ ,  $tdh^+$ , GS-PCR<sup>+</sup>) und bildet den klonalen Komplex 3 (CC3), der vermutlich ursprüngliche Serotyp und wahrscheinliche Gründer dieses klonalen Komplexes ist der Sequenztyp 3 (ST3) mit dem Serotyp O3:K6. Der Umkehrschluss, dass alle zum CC3 gehörenden Stämme diese genetischen Eigenschaften besitzen, ist nicht zulässig, da CC3 auch von nicht-pandemischen, nicht-pathogenen Stämmen gebildet wird (CHAO *et al.*, 2011). Da Sequenztyp und Serotyp unabhängig voneinander sind, besitzen Stämme des ST3 diverse Serotypen, hauptsächlich hervorgerufen durch Serotyp-Wechsel via Rekombination (CHAO *et al.*, 2011; CHOWDHURY *et al.*, 2004a; CHOWDHURY *et al.*, 2000; GONZALEZ-ESCALONA *et al.*, 2008; MARTINEZ-URTAZA *et al.*, 2004; YU *et al.*, 2011b).

Die allgemeine genotypische Diversität unterscheidet sich je nach der Pathogenität der untersuchten Stämme. Pandemische Stämme zeigen eine hohe Uniformität, während nicht-pandemische Stämme sehr divers sind (ANSARUZZAMAN *et al.*, 2008; CHOWDHURY *et al.*, 2004b; ELLIS *et al.*, 2012; THEETHAKAEW *et al.*, 2013). Dies führte zu der Beobachtung, dass eine geographisch begrenzte Teilpopulation ähnlich divers sein kann wie die Population der gesamten weltweiten pubMLST-Datenbank (ELLIS *et al.*, 2012; THEETHAKAEW *et al.*, 2013). Im Gegensatz dazu können umweltassoziierte nicht-pandemische  $tdh^+/trh^+$  *V. parahaemolyticus*-Populationen so divers sein wie nicht-pathogene Populationen (ELLINGSEN *et al.*, 2013; JOHNSON *et al.*, 2009). Die Diversität ist außerdem abhängig von der Wassertemperatur, da eine wenig diverse und an das kalte Wasser adaptierte Population durch eine diverse Population ersetzt wird, sobald die Temperaturen steigen (ELLIS *et al.*, 2012). Die umweltassoziierten Populationen sind durch eine schnelle Evolution gekennzeichnet, die anhand einer schnellen Fluktuation der vorherrschenden Stämme sichtbar wird (HARTH *et al.*, 2009; JOHNSON *et al.*, 2009). Einige Klone oder Stammgruppen können allerdings über Jahre in einem spezifischen Habitat überdauern und so eine endemische Population bilden (ELLIS *et al.*, 2012). Mit Hilfe von MLST-Analysen konnte eine hohe genetische Ähnlichkeit zwischen umweltassoziierten Isolaten, pandemischen und nicht-pandemischen infektiösen Isolaten sowie den erwähnten umweltassoziierten Isolaten des CC3 gezeigt werden (ELLINGSEN *et al.*, 2013; TURNER *et al.*, 2013b). Dies hebt die potentielle Gefahr auch von umweltassoziierten Stämmen für die menschliche Gesundheit hervor. Eine Gruppierung von Stämmen hinsichtlich bestimmter Eigenschaften, wie z. B. Isolationszeit, Habitat oder geographischem Ursprung, ist wünschenswert, um Zusammenhänge zwischen diesen Eigenschaften und dem Genotyp – bzw. im Fall von MLST-Analysen dem Sequenztyp – eines Stammes zu erkennen. Allerdings war dies im Allgemeinen bei *V. parahaemolyticus* nicht möglich (GONZALEZ-ESCALONA *et al.*, 2008; JOHNSON *et al.*, 2009; YU *et al.*, 2011b). THEETHAKAEW *et al.* (2013) waren in der Lage, deutlich abgegrenzte Gruppen von Stämmen zu identifizieren, die entweder garnelenassoziiert oder klinisch waren. Wegen der hohen genetischen Diversität, insbesondere bei umweltassoziierten Stämmen, ist die Identifizierung von verwandten Stämmen aber nicht immer verlässlich (SPRATT und MAIDEN, 1999; THEETHAKAEW *et al.*, 2013). Daher wurde die Gruppierung von *V. parahaemolyticus*-Stämmen basierend auf den Aminosäure-Sequenzen der MLST-Loki durchgeführt (OSORIO *et al.*, 2012; THEETHAKAEW *et al.*, 2013).

Bisher wurden schon einige MLST-Studien zur Charakterisierung von *V. parahaemolyticus*-

Stämmen durchgeführt. Allerdings waren diese auf spezifische geographische Regionen begrenzt (z. B. Küsten der USA, Kanada, Norwegen, Thailand oder Peru), ausschließlich auf pandemische oder nicht-pandemische pathogene Isolate fokussiert oder basierten teilweise auf einer geringen Stamm-Anzahl (ANSARUZZAMAN *et al.*, 2008; BANERJEE *et al.*, 2014; CHAO *et al.*, 2011; CHOWDHURY *et al.*, 2004b; ELLINGSEN *et al.*, 2013; ELLIS *et al.*, 2012; GAVILAN *et al.*, 2013; HARTH *et al.*, 2009; JOHNSON *et al.*, 2009; THEETHAKAEW *et al.*, 2013; TURNER *et al.*, 2013b). Ob Stämme, die aus einem spezifischen Habitat, aber aus verschiedenen geographischen Regionen stammen, hinsichtlich ihrer genetischen Diversität ähnliche Eigenschaften besitzen, wurde bisher noch nicht untersucht.

### 1.8.2 Aminosäure-MLST

Wie schon im vorherigen Abschnitt erwähnt, sind die Analysen von MLST-Daten nur verlässlich, wenn die Allel-Profile eine hohe Ähnlichkeit aufweisen (SPRATT und MAIDEN, 1999). Bei sehr diversen Spezies können unter Umständen nur sehr wenige nah verwandte Sequenztypen und klonale Komplexe identifiziert werden (OSORIO *et al.*, 2012; THEETHAKAEW *et al.*, 2013). 1.1.1 Aminosäure-MLST (AA-MLST) beruht auf den gleichen Prinzipien wie MLST, nur dass die erhaltenen MLST-Nukleotidsequenzen anschließend im Leseraster kontinuierlich in die jeweiligen Peptid-Sequenzen translatiert werden. Dabei bleiben nur solche Sequenzunterschiede erhalten, die zu einer veränderten Aminosäure führen. Durch die degenerativen Eigenschaften des genetischen Codes (eine Aminosäure wird durch mehrere Codons codiert) werden daher nur nicht-synonyme Nukleotidsubstitutionen analysiert (BERNFELD und NIRENBERG, 1965; WOESE, 1965). Dadurch nimmt die Anzahl der Unterschiede im Vergleich zur Nukleotid-Ebene deutlich ab und alle Profile weisen eine höhere Ähnlichkeit auf. Die erhaltenen Peptid-Sequenzen dienen dann analog dazu, Allel-Profile auf Peptid-Ebene zu erstellen. Diese können wiederum mit Hilfe von MSTs und der Zuordnung zu klonalen Komplexen analysiert oder die Peptid-Sequenzen direkt mit UPGMA verglichen werden.

## 1.9 Ziel der Arbeit

*V. parahaemolyticus* ist ein in marinen Gewässern ubiquitär verbreitetes potentiell humanpathogenes Bakterium. Bei der Nahrungsaufnahme nehmen Krustentiere und Muscheln die Bakterien aus dem sie umgebenden Meerwasser auf. Der Verzehr von bzw. Kontakt zu Meerestieren, die *V. parahaemolyticus* enthalten, kann zu Gastroenteritiden und weiteren schwerwiegenden Erkrankungen führen.

Es sollte daher untersucht werden, wie hoch die Prävalenz von *Vibrio* spp. und insbesondere *V. parahaemolyticus* in Garnelen- und Krabbenerzeugnissen ist, die im deutschen Einzelhandel erstanden wurden und aus verschiedenen geographischen Regionen stammen. Um die Pathogenität der gewonnenen Isolate einschätzen zu können, sollten diese mittels PCR auf das Vorhandensein der Toxin-codierenden Gene *tdh* und *trh* hin untersucht werden.

Anschließend sollte die Diversität von *V. parahaemolyticus* untersucht werden. Dazu sollten u. a. Stämme verwendet werden, die zum Teil aus den zuvor untersuchten Lebensmittelproben isoliert wurden. Außerdem sollten Stämme analysiert werden, die direkt in Garnelenfarmen in Sri Lanka und Ecuador isoliert wurden, sowie Stämme, die aus Wasserproben der Nord- und Ostsee stammen. Dabei sollte auf globaler Ebene untersucht werden, ob die identifizierten Sequenztypen lokal oder global verbreitet sind und ob bestimmte Typen verschiedene Stamm-Gruppen dominieren. Auf



regionaler Ebene, also innerhalb der einzelnen geographischen Gruppen, sollte überprüft werden, ob sich die Diversität unterscheidet.

Doch nicht nur die genetische Ausstattung, die z. B. mittels MLST untersucht werden kann, bestimmt die Eigenschaften eines Bakteriums. Durch verschiedene Umweltbedingungen können unterschiedliche Gene induziert werden, die für die Überlebensfähigkeit und Pathogenität verantwortlich sein können. So werden rohe Meeresfrüchte in der Regel nach dem Fang bzw. der Ernte verschiedenen Prozessen unterzogen, wie z. B. dem Waschen und der Lagerung bei niedrigen Temperaturen. Während dieser Lagerung begegnet *V. parahaemolyticus* Kältestress, der drastisch die physisch-chemischen Eigenschaften der Zelle verändert. Durch die Ausbildung der Kältestress-Antwort sichert *V. parahaemolyticus* sein Überleben. Auch Hitzestress, z. B. bei einer unzureichenden Erhitzung beim Kochvorgang, kann zu einer veränderten Genexpression und somit angepassten zellulären Eigenschaften durch Ausbildung der Hitzestress-Antwort führen. Dadurch könnte eine Adaptation erfolgen, die ein Überleben bei nachfolgendem Stress ermöglicht, es könnten Kreuzprotektionen gegenüber anderen Stressoren ausgebildet werden sowie Mechanismen induziert werden, die die Pathogenität erhöhen. Um mögliche Auswirkungen von Temperaturveränderungen auf die globale Genexpression von *V. parahaemolyticus* zu untersuchen, wurden Expressions-Analysen bei 4 °C, 15 °C, 20 °C, 37 °C sowie 42 °C mittels Microarray durchgeführt. Diese Temperaturen sollen Bedingungen repräsentieren, die denen bei Gewinnung, Transport, Lagerung und Prozessierung von Meeresfrüchten entsprechen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte

Geldokumentation	AlphaImager, Alpha Innotech (San Leandro, USA) mit TV Zoom Lens H6Z0812M, Computar (Commack, USA)
Bioanalyser	Bioanalyser 2100, Agilent Technologies (Santa Clara, USA)
Brutschrank	Modell 700, Memmert (Schwabach, GER)
Gelkammern	Compact XS/S, M, L/XL mit Netzgerät PowerPack P25, Biometra Analytik Jena (Jena, GER)
Klimaschrank	Rumed, Rubarth Apparate GmbH (Laatzen, GER)
Photometer	Cecil CE 1011, 1000 Serie 5, Cecil Instruments (Cambridge, GBR)
Pipetten	Research Plus 0,1-2,5 µl/ 0,5-10 µl/ 10-100 µl/ 100-1000 µl, Eppendorf (Hamburg, GER) Transferpette-8 0,5-10 µl/ 10-100 µl, Brand (Wertheim, GER)
Pipettierhilfe	pipetus, Hirschmann Laborgeräte (Eberstadt, GER)
PCR-Cycler	C1000 und S1000, BioRad (Hercules, USA)
RT-qPCR Cycler	C1000 mit CFX96, BioRad (Hercules, USA)
Rotationsschüttler	Unimax 1010 und Inkubator 1000, Heidolph (Schwabach, GER)
Spektrophotometer	NanoDrop 2000, Thermo Scientific (Waltham, USA)
Stomacher	BagMixer, Interscience (Saint Nom, FRA)
Thermomixer	Thermomixer comfort, Eppendorf (Hamburg, GER)
Vortexer	IKA-Vortex-Mixer, IKA (Staufen, GER)
Magnetrührer	VWR (Radnor, USA)
Zentrifuge	5430R, Eppendorf (Hamburg, GER) und Rotoren A-2-MTP (Platten), F-35-6-30 (15 ml/50 ml) und FA-45-30-11 (1,5 ml/2 ml) Heraeus Biofuge, Thermo Scientific (Waltham, USA) PolyLabo (Straßburg, FRA)
Microarray Scanner	G2565CA Scanner, Agilent Technologies und G2505-60525 Slide-Holder (Santa Clara, USA)
Hybridisierungsöfen	Ofen G2545A und Rotoren G2530-60029, Agilent Technologies (Santa Clara, USA)
Hybridisationskammer	G2534A, Agilent Technologies (Santa Clara, USA)
Glasbehälter mit Slide-Einsatz	Shandon Complete Staining Assembly, Thermo Scientific (Waltham, USA)
Cycler	MJ Research Cycler pTC-225, MJ Research (St. Bruno, CAN)
QIACube	QIACube mit Rotor-Adaptern, Qiagen (Hilden, GER)

#### 2.1.2 Verbrauchsgüter

Serologische Pipetten	1 ml TPP Techno Plastic Products AG (Trasadingen, SUI) 2 ml, BD Biosciences (Franklin Lakes, USA) 5 ml/ 10 ml/ 25 ml, Sarstedt (Nümbrecht, GER)
Pipettenspitzen	ohne Filter: 10 µl/ 200 µl, Sarstedt (Nümbrecht, GER) 1000 µl np nerbe plus (Winsen/Luhe, GER) mit Filter: 10 µl/ 100 µl Safe Seal-Tips, Biozym (Wien, AUT) 1000 µl np nerbe plus (Winsen/Luhe, GER)
Reaktionsgefäße	0,65 ml, Peqlab (Erlangen, GER) 1,5 ml/ 2 ml, np nerbe plus (Winsen/Luhe, GER) Safe-Lock 1,5 ml/ 2 ml, Eppendorf (Hamburg, GER) Nuklease-freie 1,5 ml, Starlab (Hamburg, GER)

PCR-Tubes	ultra Amp 0,2 ml, Sorenson BioScience (Salt Lake City, USA) PCR Single Cap 8-erSoft Strips 0,2 ml, Biozym (Wien, AUT) Standard 96 Well PCR Plate mit Adhesive PCR Film, Peqlab (Erlangen, GER)
qPCR-Tubes	Multiplate PCR-Plates Low 96-well white mit Microseal 'B' seal, BioRad (Hercules, USA) real-time PCR Tube Stripes mit Masterclear Cap Stripes, Eppendorf (Hamburg, GER)
Falcon-Tubes	15 ml/ 50 ml BD Falcon Tubes, BD Biosciences (Franklin Lakes, USA)
Cryo-Röhrchen	Cryobank Mast Diagnostica (Bootle, England)
Küvetten	1,5 ml, np nerbe plus (Winsen/Luhe, GER)
Einmal-Impfösen	10 µl, VWR (Radnor, USA)
Hybridisations-Gasket -Slides	8 microarrays/slide, Agilent Technologies (Santa Clara, USA)
Microarrays	Custom Gene Expression, 8x15K, Agilent Technologies (Santa Clara, USA)

### 2.1.3 Chemikalien, Reagenzien und Puffer

Nährmedien	Hefeextrakt, Merck (Darmstadt, GER) NaCl, Merck (Darmstadt, GER) Pepton, Merck (Darmstadt, GER) Thiosulfat-Citrat-Gallensalz-Saccharose (TCBS), Merck (Darmstadt, GER)
DNA-Isolation	Chelex 100 Resin, BioRad (Hercules, USA) Tris HCl, Carl Roth (Karlsruhe, GER) EDTA, Carl Roth (Karlsruhe, GER)
RNA-Extraktion	RNase ZAP, Ambion (Carlsbad, USA) RNA-Protect, Qiagen (Hilden, GER) 100 %EtOH, VWR (Radnor, USA) Diethylpyrocarbonate (DEPC), Carl Roth (Karlsruhe, GER) DEPC-dH <sub>2</sub> O, Carl Roth (Karlsruhe, GER)
PCR	1.1x ReddyMix PCR Mastermix, Thermo Scientific (Waltham, USA) Primer, Metabion (Martinsried, GER) SsoFast Eva Green Supermix, BioRad (Hercules, USA) dNTPs (10 mM), Fermentas (Vilnius, LTU) Taq-DNA-Polymerase, Qiagen (Hilden, GER) MgCl <sub>2</sub> , Qiagen (Hilden, GER)
Gelelektrophorese	peqGold Universal-Agarose, Peqlab (Erlangen, GER) Formaldehyd, Merck (Darmstadt, GER) MOPS, Carl Roth (Karlsruhe, GER) Natriumacetat, Merck (Darmstadt, GER) Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), Carl Roth (Karlsruhe, GER) 10x TRIS-Borat-EDTA-(TBE)-Puffer, Carl Roth (Karlsruhe, GER) 6x DNA Loading Dye, Fermentas (Vilnius, LTU) GR Green, Labgene (Chatel-St-Denis, FRA) 1 %ige Ethidiumbromid (EtBr)-Lösung, Carl Roth (Karlsruhe, GER) Bromphenolblau, Carl Roth (Karlsruhe, GER) Formamid, Carl Roth (Karlsruhe, GER) Glycerin, Merck (Darmstadt, GER) Xylencyanol, Carl Roth (Karlsruhe, GER) GeneRuler 100bp Ladder, Fermentas (Vilnius, LTU) NaOH, Merck (Darmstadt, GER)
Microarray	Stabilization and Drying Solution, Agilent Technologies (Santa Clara, USA) Acetonitril, Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) Full Spectrum Multi Start Primer, Biocat (Heidelberg, GER)

## Material und Methoden

---

1x TE-Puffer	1 M 0,25 M ad 990 ml	Tris HCl EDTA dH <sub>2</sub> O
10x MOPS-Puffer	0,4 M 0,1 M 0,01 M	MOPS pH 7 Natriumacetat EDTA
RNA-Loading Dye	500 µl 400 µl 100 µl 100 µl	Formamid Glycerin 1 % Xylencyanol 1 % Bromphenolblau

Die 1 %igen Stock-Lösungen der Farbstoffe Xylencyanol und Bromphenolblau wurden zuvor in EtOH hergestellt.

### 2.1.4 Kits

PCR	GeneJET PCR Purification Kit, Fermentas (Vilnius, LTU)
RNA-Isolation	peqGold Bacterial RNA Kit, Peqlab (Erlangen, GER) DNase I, RNase-free, Fermentas (Vilnius, LTU) RiboLock RNase Inhibitor, Fermentas (Vilnius, LTU) RevertAid Premium First Strand cDNA Synthesis Kit, Fermentas (Vilnius, LTU) RNA 6000 Nano Kit, Agilent Technologies (Santa Clara, USA)
Microarray	Quick Amp Labeling Kit One Color, Agilent Technologies (Santa Clara, USA) RNA Spike-In Kit One Color, Agilent Technologies (Santa Clara, USA) RNeasy Mini Kit, Agilent Technologies (Santa Clara, USA) Gene Expression Hybridization Kit, Agilent Technologies (Santa Clara, USA) Wash Buffer Kit, Agilent Technologies (Santa Clara, USA)

### 2.1.5 Software, Datenbanken und Webservices

Primer-Design	Primer3 ( <a href="http://frodo.wi.mit.edu">http://frodo.wi.mit.edu</a> )
Gel-Dokumentation	Alpha Ease FC Software Version 6.0.0, Alpha Innotech (San Leandro, USA)
MLST-Analyse	Lasergene V7.0.0 - Editseq, DNASTAR Inc. (Madison, USA) PHYLOViZ - goeBURST ( <a href="http://www.phyloviz.net/wiki/">www.phyloviz.net/wiki/</a> ; FRANCISCO <i>et al.</i> (2009)) START2 ( <a href="http://pubmlst.org/software/analysis/start2/">http://pubmlst.org/software/analysis/start2/</a> ; JOLLEY <i>et al.</i> (2001)) <i>V. parahaemolyticus</i> pubMLST-Datenbank ( <a href="http://pubmlst.org/vparahaemolyticus/">http://pubmlst.org/vparahaemolyticus/</a> ; JOLLEY <i>et al.</i> (2004), GONZALEZ-ESCALONA <i>et al.</i> (2008))
Rarefaction	<a href="http://strata.uga.edu/software/index.html">http://strata.uga.edu/software/index.html</a>
Microarray-Analyse	eArray ( <a href="http://www.earray.chem.agilent.com/earray/">www.earray.chem.agilent.com/earray/</a> ) Agilent Technologies (Santa Clara, USA) Feature Extraction Software, Agilent Technologies (Santa Clara, USA) Bioconductor Package V 2.12 der Software R ( <a href="http://www.bioconductor.org/">http://www.bioconductor.org/</a> , <a href="http://www.r-project.org/">http://www.r-project.org/</a> ) Genesis V 1.7.6 (IBG-TUG, AUT; STURN <i>et al.</i> (2002)) Bio-Rad CFX Manager, Version 2.0, BioRad (Hercules, USA) DAVID V6.7 (HUANG DA <i>et al.</i> , 2009a, b) Gene Expression Omnibus ( <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/</a> ) Circos Plot (KRZYWINSKI <i>et al.</i> , 2009)
MLST- und Microarray-Analyse Gen-Annotation	Bionumerics V 6.01, AppliedMaths Inc. (Sint-Martens-Latem, BEL) NCBI ( <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene</a> )

KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/>)  
 Gene Ontology (GO) (<http://www.geneontology.org/>)  
 Auswertung, allg. Arbeiten Office 2010 (Word, Excel, PowerPoint), Microsoft (Redmond, USA)

### 2.1.6 Verwendete Stämme

Die 130 verwendeten Stämme und die beiden Referenzstämme sind in Tabelle A2 im Anhang aufgeführt.

Die analysierte Stammsammlung, im Folgenden als IFH-Stämme bezeichnet, kann in vier Gruppen eingeteilt werden, die auf dem geographischen Ursprung bzw. der Art der Probennahme basieren. Alle IFH-Stämme wurden mittels MLST analysiert. Die erste Gruppe besteht aus Stämmen (n = 43), die im Rahmen einer Studie in den Jahren 2010 bis 2012 von KORALAGE *et al.* (2012) isoliert wurden, bei der Garnelen-Farmen in Sri Lanka hinsichtlich der Prävalenz verschiedener *Vibrio* spp. untersucht wurden. Die Stämme der zweiten Gruppe (n = 27) wurden aus Garnelen in Ecuador im Rahmen einer Prävalenzstudie durch das Institut für Lebensmittelhygiene der FU Berlin in Kooperation mit dem chemischen Institut der Universidad de Cuenca im Jahr 2012 isoliert. Die Stämme der dritten Gruppe (n = 34) wurden aus Lebensmittel- und Wasserproben isoliert. Dabei wurden die Lebensmittel im deutschen Einzelhandel erstanden, aber in unterschiedlichen Ländern produziert, und die Wasserproben aus der Ostsee genommen. Als vierte Gruppe – im Folgenden als NB-Seas bezeichnet – wurden planktonische Stämme aus der Nord- und Ostsee (n = 26) analysiert, die an der Küste Schleswig-Holsteins bzw. auf einer Expeditionsfahrt in der Nordsee, Ostsee, im Kattegat und Skagerrak aus fünf Metern Wassertiefe isoliert wurden. Die beiden japanischen klinischen Stämme ATCC 17802 und RIMD 2210633 dienten als Referenzstämme und wurden zu Vergleichszwecken und zur Etablierung der MLST-PCR verwendet (FUJINO *et al.*, 1953; NASU *et al.*, 2000).

Der Stamm RIMD 2210633 wurde außerdem für die Microarray-Versuche verwendet.

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Bakterienkultur und Stammhaltung

Wurde *V. parahaemolyticus* in Flüssigkultur z. B. für Über-Nacht-Vorkulturen oder für die RNA-Isolierung kultiviert, so wurde alkalisches Peptonwasser (APW) als Medium verwendet. Die Kulturen wurden bei 37 °C und ca. 200 Umdrehungen pro Minute (rpm) im Rotationsschüttler inkubiert.

APW	
0,3 %	Hefe-Extrakt
1 %	Pepton
2 %	NaCl
pH	8,6

Für die mittelfristige Aufbewahrung und zur Quantifizierung wurde *V. parahaemolyticus* auf TCBS-Agar ausgestrichen, die Platten bei 37 °C über Nacht inkubiert und danach im Dunklen bei Raumtemperatur gelagert.

Langfristig bzw. zur Stammhaltung wurden Cryo-Röhrchen mit *V. parahaemolyticus* im Cryobank-System bei -80 °C gelagert.

## 2.2.2 Bestimmung der Zellzahl und optischen Dichte

Um die Zellzahl zu bestimmen, wurden serielle Verdünnungen in APW hergestellt und diese auf TCBS-Agar ausgestrichen. Nach Inkubation bei 37 °C über Nacht wurde die Koloniezahl ermittelt und daraus die Zellzahl der verschiedenen Verdünnungen berechnet. Die optische Dichte der Verdünnungen wurde im Spektrophotometer bei 600 nm bestimmt.

## 2.2.3 Isolation und Detektion von *V. parahaemolyticus* aus Lebensmittel- und Umweltproben

Insgesamt wurden 168 rohe oder gegarte Garnelen- und Krabbenerzeugnisse im Einzelhandel in Berlin gekauft, gekühlt ins Labor transportiert und innerhalb von drei Stunden hinsichtlich des Vorhandenseins von *Vibrio* spp. untersucht. Die untersuchte Spezies, die Art der Aufzucht (Wildfang bzw. Aquakultur) und das Herkunftsland bzw. die Herkunftsregion sind, sofern sie auf der Packung vermerkt waren, in Tabelle A3 im Anhang zusammengestellt. Die Schritte, an die sich die Isolation anlehnt sind in Abbildung 9 dargestellt.

Die Isolation von *V. parahaemolyticus* aus Lebensmittel- und Umweltproben wurde in Anlehnung an die ISO/TS 21872-1 („Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection of potentially enteropathogenic *Vibrio* spp. - Part 1: Detection of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio cholerae*“) der Internationalen Organisation für Normung (ISO) durchgeführt.

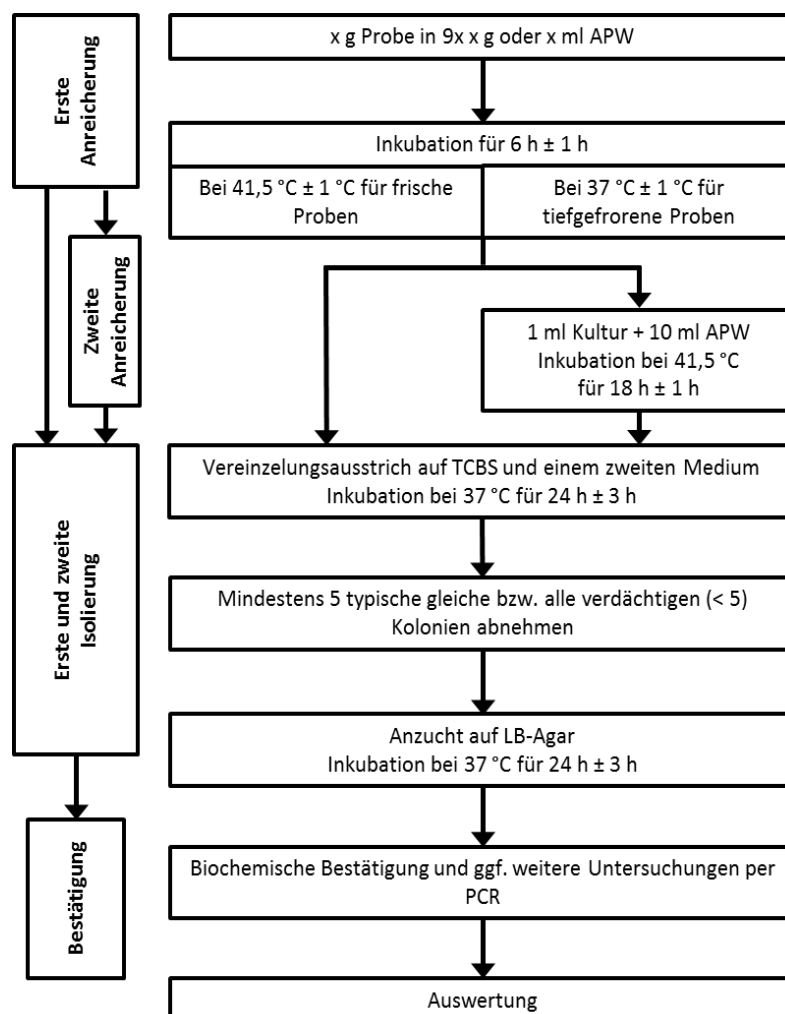


Abbildung 9: Fließschema zum Nachweis von *V. parahaemolyticus* nach ISO/TS21872-1

Dazu wurde die Probe 1:10 in APW verdünnt und für 2 min mit dem BagMixer (Stufe 3) gestomachert. Das Homogenat wurde für 24 h bei 37 °C inkubiert (Anreicherung) und ein fraktionierender Ausstrich auf TCBS-Platten durchgeführt. Nach einer Inkubation von 24 h bei 37 °C wurden mehrere vereinzelte typische Kolonien gepickt. Lagen keine vereinzelten Kolonien vor, wurden Reinigungsausstriche auf TCBS-Platten (Inkubation für 24 h bei 37 °C) hergestellt. Von diesen Platten wurde Koloniematerial für die PCR verwendet. Dafür wurde aus dem Zellmaterial mehrerer Kolonien die genomische DNA mit 5 % Chelex Resin in TE-Puffer als Isolationslösung nach Herstellerangaben isoliert. Die Detektion von *V. parahaemolyticus* und anderer *Vibrio* spp. erfolgte mittels PCR. Außerdem wurden PCRs zur Detektion der Virulenzgene von *V. parahaemolyticus* durchgeführt.

### 2.2.3.1 PCR zur Detektion von *Vibrio* spp.

Zur Detektion der Spezies *V. alginolyticus*, *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* und *V. vulnificus* wurden die PCR-Assays nach DI PINTO *et al.* (2005) und BAUER und RORVIK (2007) kombiniert. Die verwendeten Primer sind in Tabelle 5 aufgeführt. Dabei diente der Primer UtoxF jeweils als universeller forward-Primer in Kombination mit den speziesspezifischen reverse-Primern.

**Tabelle 5:** Genfragmente zur Detektion der *Vibrio* spp.

Angaben sind Name des Primers, Primersequenz, Spezies, Fragmentgröße und Quelle.

Name	Sequenz 5' nach 3'	Spezies <sup>1</sup>	Größe <sup>2</sup>	Referenz
UtoxF	GASTTTGTTTGGCGYGARCAAGGTT	<i>Vp</i> , <i>Vc</i> , <i>Vv</i>		BAUER und RORVIK (2007)
VptoxR	GGTTCAACGATTGCGTCAGAAG	<i>Vp</i>	297 bp	BAUER und RORVIK (2007)
VctoxR	GGTTAGCAACGATGCGTAAG	<i>Vc</i>	640 bp	BAUER und RORVIK (2007)
VvtoxR	AACGGAACTTAGACTCCGAC	<i>Vv</i>	435 bp	BAUER und RORVIK (2007)
VaF	CGAGTACAGTCACTTGAAAGCC	<i>Va</i>	737 bp	DI PINTO <i>et al.</i> (2005)
VaR	CACAACAGAACTCGCGTTACC	<i>Va</i>		DI PINTO <i>et al.</i> (2005)

<sup>1</sup> *Va*, *V. alginolyticus*; *Vc*, *V. cholerae*; *Vp*, *V. parahaemolyticus*; *Vv*, *V. vulnificus*

<sup>2</sup> bp, Basenpaare

Die PCR-Reaktion wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

1x	94 °C	4 min
30x	94 °C	30 s
	61 °C	30 s
	72 °C	30 s
	72 °C	7 min
	12 °C	∞

Der einfache PCR-Reaktionsansatz bestand aus:

MgCl <sub>2</sub> [25 mM]	1 µl
10x Puffer	2,5 µl
dNTPs [10 mM]	2,5 µl
UtoxF [50 pmol/µl]	0,2 µl
VptoxR [50 pmol/µl]	0,2 µl
VctoxR [50 pmol/µl]	0,2 µl
VvtoxR [50 pmol/µl]	0,2 µl
VaF [50 pmol/µl]	0,2 µl
VaR [50 pmol/µl]	0,2 µl
Taq-Polymerase [5 U/µl]	0,3 µl
DNA 1/100 verdünnt	2 µl
H <sub>2</sub> O ad	25 µl

### 2.2.3.3 PCR zur Detektion der Virulenzgene von *V. parahaemolyticus*

Zur Detektion der Toxingene *tdh* und *trh* von *V. parahaemolyticus* wurden die PCR-Assays nach BAUER und RORVIK (2007) und TADA *et al.* (1992) kombiniert. Die verwendeten Primer sind in Tabelle 6 aufgeführt.

**Tabelle 6:** Genfragmente zur Detektion der Toxingene von *V. parahaemolyticus*  
 Angegeben sind Name des Primers, Primersequenz, Fragmentgröße und Quelle.

Name	Sequenz 5' nach 3'	Größe <sup>1</sup>	Referenz
UtoxF	GATTTTGTGGCGYGARCAAGGTT	297 bp	BAUER und RORVIK (2007)
VptoxR	GGTTCAACGATTGCGTCAGAAG		BAUER und RORVIK (2007)
trh for	GGCTCAAAATGGTTAAGCG	251 bp	TADA <i>et al.</i> (1992)
trh rev	CATTTCCGCTCTCATATGC		TADA <i>et al.</i> (1992)
tdh (D3) for	CCACTACCACTCTCATATGC	425 bp	TADA <i>et al.</i> (1992)
tdh (D1) rev	CCATCTGTCCCTTTTCCTGC		TADA <i>et al.</i> (1992)

<sup>1</sup> bp, Basenpaare

Der einfache PCR-Reaktionsansatz bestand aus:

10x Puffer	2,5 µl
dNTP [10 mM]	2,5 µl
trh for [50 pmol/µl]	0,25 µl
trh rev [50 pmol/µl]	0,25 µl
tdh (D1) for [50 pmol/µl]	0,15 µl
tdh (D3) rev [50 pmol/µl]	0,15 µl
UtoxF [50 pmol/µl]	0,15 µl
VptoxR [50 pmol/µl]	0,15 µl
Taq-Polymerase [5 U/µl]	0,3 µl
DNA	2,5 µl
H <sub>2</sub> O ad	25 µl

Die PCR-Reaktion wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

1x	94 °C	4 min
30x	94 °C	30 s
	62 °C	1 min
	72 °C	1 min
	72 °C	7 min
	12 °C	∞

### 2.2.3.4 Kontrolle der PCR-Produkte

Die PCR-Produkte wurden zur Größenkontrolle in 2 %igem Agarose-Gel aufgetrennt (je nach verwendeter Größe des Gels bei 80 bis 120 V für 45 bis 60 min). Der im 6x Ladepuffer enthaltene Farbstoff GR-Green (1 µl pro 99 µl Ladepuffer) interkaliert in doppelsträngiger DNA (dsDNA) und wird durch Ultraviolette (UV) Strahlung angeregt. Die so entstehende Fluoreszenz wurde im Alphamager dokumentiert.

### 2.2.4 MLST-Analyse

Die in Abschnitt 2.1.6 und in Tabelle A2 (im Anhang) vorgestellten Stämme wurden mittels MLST analysiert. Die erhaltenen Daten wurden zusätzlich im Kontext der in der pubMLST-Datenbank hinterlegten Isolate (n = 1089) ausgewertet.



### 2.2.4.1 MLST-PCR

Um die Sequenzen der verschiedenen Genfragmente analysieren zu können, wurde die genomische DNA jedes Stammes isoliert, die jeweilige spezifische Sequenz mittels PCR amplifiziert und anschließend sequenziert.

Die genomische DNA wurde mittels 5 % Chelex Resin in TE-Puffer als Isolationslösung nach Herstellerangaben isoliert. Dazu wurden die Stämme zuvor über Nacht in APW bei 37 °C im Schüttelinkubator bei 200 rpm kultiviert. Bezüglich der Stämme aus Sri Lanka wurde direkt die aus Sri Lanka erhaltene DNA verwendet.

Die Primer und das PCR-Protokoll wurden nach GONZALEZ-ESCALONA *et al.* (2008) verwendet (Tabelle 7). Durch die Aufteilung der Fragmente der Gene *gyrB* und *recA* in je zwei Teilfragmente konnten diese Loci zuverlässig amplifiziert werden. Die Primer *gyrB*\_up, *gyrB*\_down, *recA*\_up und *recA*\_down wurden im Rahmen dieser Arbeit mit Hilfe der Software Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/>) designt. An jedem 5'-Ende der Primer befindet sich der jeweilige forward- bzw. reverse-M13-Sequenzierüberhang (Tabelle 7). Gleichzeitig dienen Primer dieser Sequenz zur Sequenzierung der Fragmente.

Der PCR-Reaktionsansatz bestand aus:

1,1x ReddyMix PCR Master Mix	31,5 µl
je Primer	0,5 mM
DNA ad	35 µl

Der verwendete 1,1x Mastermix enthält unter anderem 0,625 U ThermoPrime *Taq* DNA Polymerase und 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>.

Die PCR-Reaktion wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

1x	96 °C	3 min
30x	96 °C	1 min
	58 °C	1 min
	72 °C	1 min
	72 °C	10 min
	12 °C	∞

Die PCR-Produkte wurden zur Größenkontrolle in 2 %igem Agarose-Gel aufgetrennt (je nach verwendeter Größe des Gels 80 bis 120 V für 45 bis 60 min). Das Anfärben der DNA-Fragmente erfolgte mit GR-Green, das im 6x Ladepuffer enthalten war (1 µl pro 99 µl Ladepuffer). Die Produktgröße wurde im Alphalmager dokumentiert.

Wurden die PCR-Produkte nicht durch die Firma GATC aufgereinigt, erfolgte die Aufreinigung mit dem GeneJET PCR Purification Kit nach Angaben des Herstellers. Zur Sequenzierung wurden 10 bis 50 ng des PCR-Produkts in einem Volumen von 20 µl eingesetzt. Die Fragmente wurden in beide Richtungen sequenziert.

**Tabelle 7:** Genfragmente, die für die MLST-Analyse verwendet wurden

Angegeben sind Genname, Gensymbol, Sequenz und Fragmentgröße. M13-Sequenzierüberhänge befinden sich am 5'-Ende der Primer. Die forward-Sequenz (+) und reverse-Sequenz (#) dienen als Bindestelle für die Primer bei der Sequenzierung.

Gen/Fragment	Gensymbol	Sequenz 5' nach 3'	Größe <sup>1</sup>
M13-Sequenzüberhang/ -Sequenzierungsprimer <i>dnaE</i>	VP2303	+: TGTAACACGACGGCCAGT #: CAGGAAACAGCTATGACC +CGRATMACCGCTTTTCGCCG #GAKATGTGTGAGCTGTTTGC	596 bp
<i>gyrB</i>	VP0014	+GAAGGBGGTATTCAAGC #GAGTCACCCTCCACWATGTA	629 bp
<i>gyrB_up</i>	VP0014	+GAAGGBGGTATTCAAGC #CGATTCAACCGCTGATTTCACTTC	420 bp
<i>gyrB_down</i>	VP0014	+GCGGCACTAACACGTACGCTAAAC #GAGTCACCCTCCACWATGTA	440 bp
<i>recA</i>	VP2550	+GAAACCATTTC AACGGGTTTC #CCATTGTAGCTGTACCAAGCACCC	773 bp
<i>recA_up</i>	VP2550	+GAAACCATTTC AACGGGTTTC #ACGGATTTGGTTGATGAAGATACA	496 bp
<i>recA_down</i>	VP2550	+GGGTCTCCAAGCTCGTATGC #CCATTGTAGCTGTACCAAGCACCC	411 bp
<i>dtdS</i>	VPA1508	+TGGCCATAACGACATTCTGA #GAGCACCAACGTGTTTAGC	497 bp
<i>pntA</i>	VPA0922	+ACGGCTACGAAAAGAAATG #TTGAGGCTGAGCCGATACTT	470 bp
<i>pyrC</i>	VPA0408	+AGCAACCGGTAAAATTGTCTG #CAGTGTAAGAACCGGCACAA	533 bp
<i>tnaA</i>	VPA0192	+TGACGAAATTGCCACCAAA #AATATTTTCGCCGCATCAAC	463 bp

<sup>1</sup> bp, Basenpaare

### 2.2.4.2 Zuweisung der Allele und Sequenztypen

Die erhaltenen Sequenzen wurden visuell mit Bionumerics hinsichtlich ihrer Qualität begutachtet, bündig angeordnet und mit Hilfe der publizierten Schneidemuster, den sogenannten Trim-Patterns, zurechtgeschnitten. Die erhaltenen Sequenzen wurden mit allen bereits bei pubMLST hinterlegten Sequenzen verglichen. War die entsprechende Sequenz schon hinterlegt, so erhielt das Allel die jeweilige Nummer. War die Sequenz neu, so wurde ihr – nach der Überprüfung durch den Kurator der Datenbank – ein neuer numerischer Identifikator zugewiesen. Wurde jedem Allel eine Nummer zugeordnet, wurde überprüft, ob die entsprechende Kombination, d. h. der jeweilige Sequenztyp (ST), schon in der Datenbank hinterlegt war. Für den Fall, dass die Allelkombination bereits hinterlegt war, bekam das Isolat deren numerischen Identifikator, andernfalls wurde ein neuer Sequenztyp mit der entsprechenden Allelkombination definiert und der neu vergebene numerische Identifikator bzw. der Sequenztyp dem Isolat zugewiesen. Diese Zuweisung erfolgte zum einen direkt über die Abfrage bei der pubMLST-Datenbank (<http://pubmlst.org/vparahaemolyticus/>). Zum anderen wurden die Isolat-Informationen und die dazugehörigen Sequenzen in einer lokalen Bionumerics-Datenbank gespeichert. Über das installierte MLST-Plugin konnten die Sequenzvergleiche und die Zuweisung der Identifikatoren von bereits definierten Allelen und Sequenztypen automatisiert durchgeführt werden.

### 2.2.4.3 Aminosäure-MLST

Die in-frame Nukleotidsequenzen wurden mit dem Programm Editseq (Lasergene 7) in die entsprechenden Peptidsequenzen übersetzt. Wie den Nukleotid-Sequenzen wurde jeder einzigartigen Peptidsequenz ein numerischer Identifikator zugewiesen. Diese definierten das Allel-Profil auf Peptid-Ebene. Jedes einzigartige Profil definierte wiederum den Peptid-Sequenztyp (pST).

Für alle Sequenzen, zu denen ein Isolat in der pubMLST-Datenbank bis März 2013 hinterlegt war, wurden Allel-Profile auf Peptid-Ebene erstellt bzw. werden diese weiterhin für neu eingetragene Isolate hinzugefügt und ggf. neue Peptid-Sequenztypen definiert. Dabei erhielten Sequenzen, die häufiger auftraten, kleinere Nummern als Identifikator, während eine neu in der Datenbank hinterlegte Sequenz den nächst höheren noch nicht zugewiesenen Identifikator erhält.

Die resultierenden Peptidsequenzen und -profile wurden an die pubMLST-Datenbank übermittelt und dort als zusätzliches Typisierungsschema „AA-MLST“ implementiert. Die jeweiligen Loki wurden durch ein vorangestelltes „p\_“ markiert. Zu jedem Isolat wurde das entsprechende AA-MLST Allel-Profil hinterlegt.

### 2.2.4.4 Analyse der Daten

Um die gesammelte Stamm-Diversität zu evaluieren, wurden Rarefaction-Kurven für die drei geographischen Gruppen (Sri Lanka, Ecuador, NB-Seas), für die IFH-Stämme sowie die pubMLST-Stämme erstellt. Dazu wurden die neu auftretenden Sequenztypen gegen die Summe aller Sequenztypen aufgetragen.

Die Anzahl der polymorphen Stellen der Nukleotid- und Peptidsequenzen wurde mit Hilfe eines Web-tools auf der pubMLST-Webseite bestimmt. Dabei wurden getrennt voneinander die Anzahl der Stellen aller in der Datenbank hinterlegten Sequenzen und die Anzahl der Stellen, die bei den hier untersuchten Isolaten auftraten, bestimmt.

Sowohl die Auswertung hinsichtlich der Anzahl und der Häufigkeiten der verschiedenen Allele auf Nukleotid- und Peptid-Ebene, der Sequenztypen sowie Peptid-Sequenztypen als auch die Zuweisung der Identifikatoren auf Peptid-Ebene wurde mit Hilfe von Excel durchgeführt.

Mit Bionumerics wurden UPGMAs auf Basis der sich im Leseraster befindenden Nukleotid- bzw. Peptidsequenzen erstellt. Dabei wurde der „standard algorithm“ beim „pairwise alignment“ verwendet. Um Gruppen ähnlicher Stämme zu identifizieren, wurden Cluster mit 99 % (Nukleotid-Ebene) bzw. 99,95 % (Peptid-Ebene) Sequenzübereinstimmung gebildet.

Minimum Spanning Trees (MST), Population Snapshots und fullMSTs, die alle auf den Allel-Profilen basieren, wurden mit dem Programm PHYLOViZ erstellt. In MSTs werden die Stämme entsprechend ihrer Genotypen in Gruppen eingeteilt. Stämme, die zu 100 % in sechs der sieben untersuchten Loki mit mindestens einem weiteren Gruppenmitglied übereinstimmten, sogenannte Einzel-Lokus-Varianten (SLVs), wurden einem klonalen Komplex (CC) zugeordnet. Durch den Algorithmus wird außerdem der wahrscheinlichste Gründer des klonalen Komplexes ermittelt sowie mögliche aus dem klonalen Komplex entstandene Doppel-Lokus-Varianten (DLVs) identifiziert. Beim Population Snapshot wird die Gruppendifinition auf null von sieben gemeinsamen Allelen gesetzt, dadurch kann eine Abbildung erzeugt werden, die alle Sequenztypen bzw. Peptid-Sequenztypen gleichzeitig darstellt. Im fullMST werden nicht nur Verbindungen auf SLV-Ebene gezogen, sondern alle Sequenztypen bzw. Peptid-Sequenztypen ihrer vermutlichen Entstehung nach miteinander

verbunden. Außerdem kann mit PHYLOViZ der Diversitätsindex nach Simpson ( $D$ ) für jedes Allel auf Nukleotid- und Peptid-Ebene ermittelt werden (FRANCISCO *et al.*, 2009). Dieser Index gibt an, wie hoch die Fähigkeit eines Typisierungsschemas ist, zwischen unverwandten Typen zu differenzieren.

Sowohl die  $d_N/d_S$ - als auch die  $I_A^S$ -Werte wurden mit START2 berechnet (JOLLEY *et al.*, 2001). Dabei wurde der  $d_N/d_S$  nach NEI und GOJOBORI (1986) auf Nukleotid-Ebene bestimmt. Der Wert dient als Indikator für die Art der Selektion, die auf ein bestimmtes Gen einer Population wirkt. Ein Wert kleiner eins zeigt reinigende Selektion (auch als negative Selektion bezeichnet), ein Wert von null zeigt neutrale Selektion und ein Wert größer eins zeigt positive Selektion an. Die Populationsstruktur wurde mit Hilfe des standardisierten Index der Assoziation ( $I_A^S$ ) ermittelt. Dabei gibt ein Wert von null an, dass sich die untersuchten Allele im linkage equilibrium befinden, d.h. zufällig verteilt sind. Die Berechnung wurde auf Grundlage der verschiedenen Stamm-Gruppen (IFH-Stämme, geographische Gruppen, pubMLST-Stämme und je ein Eintrag pro Sequenztyp) durchgeführt.

## 2.2.5 Genexpressionsanalyse

### 2.2.5.1 Vorkultur

Der Stamm *V. parahaemolyticus* RIMD 2210633 wurde für langfristige Lagerung in Cryo-Röhrchen bei  $-80\text{ °C}$  aufbewahrt. Eine Übernachtskultur wurde in APW bei  $37\text{ °C}$  in einem Rotationsschüttler angezogen. Die entstandene Kultur wurde in 25 ml APW verdünnt. Aliquots aus  $10^8$  bis  $10^9$  Zellen (entsprechen 2 ml Kultur mit einer optischen Dichte bei 600 nm ( $OD_{600}$ ) von 0,6 bzw. 4 ml bei  $OD_{600}$ : 0,3) wurden in 15 ml Falcon-Gefäße überführt.

### 2.2.5.2 Stressbedingungen

Die Aliquots jeder Kultur wurden im Thermomixer bei verschiedenen Temperaturen ( $42\text{ °C}$ ,  $37\text{ °C}$  und  $20\text{ °C}$ ) für 30 min inkubiert. Für die Inkubation bei  $4\text{ °C}$  und  $15\text{ °C}$  wurde die gesamte Inkubationseinheit in einen Klimaschrank gestellt, der auf die entsprechende Temperatur eingestellt war.

### 2.2.5.3 Isolierung der RNA

Die Kultur wurde pelletiert (2 min,  $8000 \times g$ ) und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in 1,5 ml RNA-Protect resuspendiert, durch vortexen gemischt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, um einem Abbau der RNA vorzubeugen.

Die Gesamt-RNA wurde mit Hilfe des peqGold Bacterial RNA Kits nach Angaben des Herstellers isoliert. Abweichend dazu wurde die RNA mit 43  $\mu\text{l}$  DEPC-behandeltem DNase- und RNase-freiem Wasser eluiert.

Die Konzentration der Nukleinsäure wurde mittels Spektrophotometer bestimmt. Die verbleibenden 42  $\mu\text{l}$  wurden mit DNase I und einem RNase-Inhibitor nach Angaben des Herstellers behandelt, um noch vorhandene genomische DNA zu entfernen.

Nach dem DNase-Verdau wurde die RNA-Konzentration und Reinheit der Probe mit Hilfe des Spektrophotometers bestimmt.

Die Lagerung der isolierten RNA erfolgte bei  $-80\text{ °C}$ .

#### 2.2.5.4 Qualitätskontrolle der RNA

Die Reinheit der RNA wurde nach dem DNase-Verdau mit dem NanoDrop 2000 bestimmt. Dabei wird die Absorption bei verschiedenen Wellenlängen gemessen. Ist das Verhältnis der Absorption 260 nm/280 nm bei einem Verhältnis von ca. 2, handelt es sich um eine RNA ohne Verunreinigungen durch Proteine oder Phenol.

Die Integrität der einzelnen Proben wurde in denaturierendem und nativem Agarose-Gel mit entsprechendem Lauf- und Ladepuffersystem überprüft.

Für denaturierende Agarose-Gele wurde die verwendete Gelkammer mit 0,1 M NaOH in DEPC-dH<sub>2</sub>O gefüllt und 10 min inkubiert. Es wurde entweder fertiges DEPC-dH<sub>2</sub>O verwendet oder dieses selbst hergestellt. Dazu wurden 1000 ml dH<sub>2</sub>O mit 1 ml 0,1 % Diethylpyrocarbonat (DEPC) gemischt und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Das DEPC-dH<sub>2</sub>O wurde autoklaviert und nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur verwendet. Die Gelkammer wurde anschließend dreimal mit DEPC-dH<sub>2</sub>O ausgespült. Für die Herstellung des Gels wurden 0,6 g Agarose in 44,4 ml DEPC-dH<sub>2</sub>O und 6 ml 10x MOPS-Puffer gelöst. Nach dem Abkühlen der Agarose auf ca. 60 °C wurden 9,6 ml 37 %iges Formaldehyd zugegeben und die Agarose in die Gelkammer gegossen. Für die Auftrennung im Gel wurden 1,5 µg jeder RNA-Probe mit 5 µl RNA-Loading Dye gemischt und das Volumen wurde mit DEPC-dH<sub>2</sub>O auf 15 µl eingestellt. Zur Denaturierung von Sekundärstrukturen in der RNA wurden die Proben 10 min bei 70 °C inkubiert und anschließend 5 min auf Eis abgekühlt. Das Gel wurde mit den Proben beladen und die Fragmente bei 80 V für ca. 45 min aufgetrennt. Als Elektrophorese-Puffer diente 1x MOPS-Puffer. Die Gele wurden anschließend für 5 min im Ethidiumbromid-(EtBr)-Bad (1 %ige EtBr-Stocklösung, 50 µl/l) gefärbt und 15 min im Wasserbad entfärbt. Durch UV-Licht wurde das in der RNA interkalierte EtBr angeregt und mit Hilfe des Alphalmagers die Fluoreszenz dokumentiert.

In nativen Agarose-Gelen wurden 2 % Agarose in TBE-Puffer gelöst. Der 6x DNA Loading Dye wurde mit 1 % v/v GR-Green versetzt. Jeweils 1,5 µg der RNA-Proben wurden mit 5 µl GR-Green versetztem Ladepuffer gemischt, das Volumen wurde mit DEPC-dH<sub>2</sub>O auf 15 µl eingestellt und die Proben wurden in die Geltaschen pipettiert. Als Elektrophorese-Puffer diente 1x TBE-Puffer. Die Auftrennung im Gel erfolgte bei 80 V für ca. 45 min. Das interkalierte GR-green wurde mittels UV-Licht angeregt und die Lichtemission im Alphalmager dokumentiert.

Zusätzlich wurden ausgewählte Proben mit Hilfe des Agilent RNA 6000 Nano Kits im 2100 Bioanalyzer (Agilent) nach Herstellerangaben analysiert. Vor jedem Analyselauf wurden die Elektroden des Geräts dekontaminiert.

Ein Aliquot von 1,5 µg RNA wurde auf Trockeneis zur Firma Source BioScience gebracht. Dort wurden die RNA-Proben zur RNA-Analyse vorbereitet und mit den Microarrays hybridisiert.

#### 2.2.5.5 Microarray

Die im Folgenden beschriebenen Methoden zur Präparation der komplementären RNA (cRNA), Hybridisierung und Generierung der Roh-Daten wurden in Zusammenarbeit mit Source BioScience (Berlin) durchgeführt. Die Datenauswertung erfolgte in Zusammenarbeit mit der Tampere University of Technology (Finnland).

Mit Hilfe von Microarrays können Genexpressionsstudien gleichzeitig von mehreren Tausend Genen durchgeführt werden. Bei der Herstellung der Microarrays werden auf einem Glasträger Spots,

bestehend aus mehreren Millionen identischer Oligonukleotide mit definierter Sequenz, synthetisiert. Diese Spots dienen als Sonde zur Detektion von Fluoreszenz-markierten Nukleinsäuren.

### 2.2.5.5.1 Array-Design

Jeder der verwendeten 8x15k Glas-Slides besaß acht identische Array-Felder, die jeweils mehrere Positiv- und Negativkontrollen sowie Sonden für insgesamt 4820 Gene enthielten (insgesamt codiert *V. parahaemolyticus* RIMD 2210633 4832 Gene). Dabei waren 3073 von 3080 Genen von Chromosom 1 und 1747 von 1752 Genen von Chromosom 2 auf dem Array vertreten. Jedes Gen war durch 1 bis 10 Sonden (im Durchschnitt 3,15 Sonden/Gen) repräsentiert. Dabei bestand jede Sonde aus einem 60mer, das bevorzugt am 3'-Terminus des entsprechenden Gens lokalisiert war. Das Sondendesign wurde mittels der eArray-Software, einer webbasierten Agilent-Applikation, und der Genomsequenz von *V. parahaemolyticus* RIMD 2210633 durchgeführt. Die verwendeten Agilent Custom Arrays wurden zunächst oberflächlich beschichtet, um eine feste Verbindung zwischen dem Glas-Slide und den Nukleinsäure-Sonden zu gewährleisten. Die Sonden wurden anschließend mit Hilfe der Agilent „Sure Print“-Technologie auf die Glas-Slides aufgebracht.

Die Annotation der Gene wurde von YANG *et al.* (2009) übernommen und mit Hilfe aktueller Einträge bei NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>), KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/>) und Gene Ontology (<http://www.geneontology.org/>) ergänzt.

Die Position und Sequenz der Sonden sowie die Annotation der Gene sind in den Tabellen S1 und S2 zusammengestellt, die auf dem Server des Instituts für Lebensmittelhygiene hinterlegt wurden.

### 2.2.5.5.2 cRNA-Präparation

Die Herstellung der cRNA aus der isolierten gesamt RNA erfolgte in mehreren Schritten mit dem Quick Amp Labeling Kit (Agilent) und dem RNA Spike-In Kit (Agilent) nach Angaben des Herstellers. Grundsätzlich wurde mit der Hälfte des vorgegebenen Probenvolumens gearbeitet. Die RNA dient als Vorlage bei der Erststrang-Synthese der komplementären DNA (cDNA). Dazu wurden 200 ng der gesamt RNA mit Full Spectrum MultiStart Primern (Biotac) und der Reversen Transkriptase des Moloney Murines Leukämievirus (Agilent) transkribiert und linear amplifiziert. Da in diesem Schritt der Einbau von Cyanin-3 (Cy-3) markierten Cytidintriphosphaten erfolgte, musste in allen folgenden Schritten auf Lichtschutz geachtet werden.

Anschließend wurde die linear amplifizierte cRNA nach Herstellerangaben mit dem RNeasy Mini Kit (Agilent) im QIAcube (Qiagen) aufgereinigt. Abweichend zum Herstellerprotokoll erfolgte eine zweite Elution. Dazu wurde das Eluat per Hand ein zweites Mal auf den Filter pipettiert. Nach einer 1-minütigen Inkubationszeit wurde es in dasselbe Reaktionsgefäß eluiert.

Die Qualitätskontrolle erfolgte mit dem Spektrophotometer, um die Ausbeute und die Farbstoff-Einbauraten der cRNA zu bestimmen. Nur Proben mit mindestens einer Ausbeute von 1,65 µg und einer Cy-3-Einbauraten von 9,0 pmol/µg wurden sie für die Hybridisierung verwendet.

### 2.2.5.5.3 Hybridisierung

Für die Fragmentierung und Hybridisierung wurde das Gene Expression Hybridization Kit (Agilent) nach Angaben des Herstellers verwendet. 480 ng der Cy-3 markierten und fragmentierten cRNA wurden randomisiert in jedes Feld des 8-plex Gasket-Slides pipettiert. Anschließend wurde das 8x15k-Microarray-Glas-Slide auf die Gasket-Slides gesetzt und im Hybridisierungssofen hybridisiert (65 °C,

17 h, 10 rpm). Die nachfolgenden Waschschr tte und die Trocknung der Arrays erfolgten mit vorgeheizten Triton X-102-haltigen Waschpuffern unterschiedlicher Stringenz bzw. mit Acetonitril nach Angaben des Herstellers.

#### 2.2.5.5.4 Scannen

Die trockenen Arrays sind empfindlich gegenüber Licht und Ozon. Daher wurden sie direkt nach der Hybridisierung im Agilent G2565CA Scanner mit einer Auflösung von 5  $\mu\text{m}$  gescannt. Die Stärke des detektierten Signals ist dabei abhängig von der Spezifität und Menge der an der Sonde gebundenen cRNA und kann so zur Bestimmung des Transkriptionslevels verwendet werden. Die Scans wurden im tagged image file format (tif-Format) gespeichert. Rein optisch können die gescannten Microarrays hinsichtlich einer gleichmäßigen Fluoreszenz untersucht werden. Bereiche, die z. B. durch Staub oder Luftblasen abweichend starke oder schwache Fluoreszenz zeigen, könnten daraufhin manuell für die Datenauswertung angepasst werden bzw. es könnte überprüft werden, ob solche Bereiche bei der automatisierten Datenextraktion korrekt angepasst wurden.

#### 2.2.5.5.5 Datengenerierung und Analyse

Aus den erstellten tif-Dateien wurden mittels der Feature Extraction Software (Agilent) die Rohdaten extrahiert. Die folgende Vor-Prozessierung wurde mit Hilfe des Bioconductor Package der Software R (Version 2.12) durchgeführt. Dabei wurden u. a. Spots von schlechter Qualität mit Hilfe der „outlier detection flags“ des Agilent-Protokolls herausgefiltert. Alle Spots von guter Qualität wurden mit Bioconductor normalisiert. Mit Hilfe dieser Quantile-Normalisierung wurden die Daten von den verschiedenen Microarrays vergleichbar gemacht und  $\log_2$ -transformiert (BOLSTAD *et al.*, 2003). Mit der Limma-Analyse wurde für jede Sonde ein lineares Modell angepasst (SMYTH, 2004). Dabei wurden auch die biologischen Replikate zusammengefasst. Zur Überprüfung der Ähnlichkeit der Replikate und Bedingungen wurde die hierarchische Clusteranalyse (*K*-means) mit Genesis durchgeführt (STURN *et al.*, 2002). Die Daten jeder einzelnen Temperatur wurden zur Normalisierung verwendet, um die Anzahl differentiell exprimierter Gene bei den anderen Temperaturen zu ermitteln und damit die optimale Kontrollbedingung zu bestimmen. In diesem Schritt wurde 37  $^\circ\text{C}$  als passendste Kontrollbedingung identifiziert. Nach der Normalisierung gegen die Kontrollbedingung (37  $^\circ\text{C}$ ) wurde von den multiplen Sonden eines Gens diejenige als repräsentativ ausgewählt, deren p-Wert (angepasst nach BENJAMINI und HOCHBERG (1995)) am kleinsten war. Als signifikant differentiell exprimiert galten diejenigen Gene, deren zur Basis zwei logarithmierte x-fache Veränderung ( $\log_2\text{FC}$ )  $\geq 1,5$  und deren angepasster p-Wert  $< 0,05$  war. Die Gen-Annotationen sowie funktionale Gen-Kategorien (DAVID) wurden nach Kategorien durchsucht, in denen signifikant mehr Gene bei der jeweiligen Bedingung signifikant (Fisher exact test,  $p < 0,05$ ) differentiell exprimiert waren (HUANG DA *et al.*, 2009a, b). Heat-Maps wurden mit Hilfe von Bionumerics mittels UPGMAs erstellt. Volcano Plots wurden mit Excel generiert. Zur graphischen Darstellung der Genexpression wurden Kreishierarchie-Diagramme mit Hilfe von Circos Plot generiert (KRZYWINSKI *et al.*, 2009).

Die Transkriptom-Daten wurden entsprechend der MIAME-Regularien in der Gene Expression Omnibus-Datenbank als Experiment GSE60815 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) hinterlegt (BARRETT *et al.*, 2005; BRAZMA *et al.*, 2001). Die differentielle Expression jedes Gens ist in Tabelle S2 zusammengestellt, die auf dem Server des Instituts für Lebensmittelhygiene hinterlegt wurde.

## 2.2.5.6 Reverse Transkriptase quantitative PCR (RT-qPCR)

### 2.2.5.6.1 Reverse Transkription der RNA für die RT-qPCR

Von jeder RNA wurde 1 µg zur cDNA-Synthese verwendet. Die Synthese erfolgte mit dem ReverdAid Premium First Strand cDNA Synthesis Kit unter Verwendung von random Hexamer-Primern nach Angaben des Herstellers. Zusätzlich wurden Negativkontrollen ohne Zusatz des Enzyms hergestellt. Die erhaltenen cDNAs und RT-Negativkontrollen wurden 1:50 mit DNase- und RNase-freiem Wasser verdünnt und je 1 µl wurde für die RT-qPCR verwendet.

### 2.2.5.6.2 RT-qPCR

Das Prinzip der verwendeten Technik beruht auf der Verbindung einer Standard-PCR mit dem fluoreszierenden Farbstoff Sybr-Green. Sybr-Green interkaliert in die amplifizierten ds-cDNA-Fragmente, dabei nimmt die Fluoreszenz der Probe mit steigender Menge gebildeter ds-cDNA-Fragmente zu. Je früher die Fluoreszenz exponentiell ansteigt, desto mehr Template war für die jeweilige Reaktion im Ursprungsansatz vorhanden. Der Threshold Cycle (ct) bezeichnet den Zyklus, bei dem der Anstieg der Fluoreszenz signifikant vom Hintergrund-Level abhebt, und wurde mittels der „Regression Analysis“ durch die CFX manager software 2.0 (BioRad) bestimmt. Die Validierung der spezifischen Produkte erfolgte mittels Schmelzkurven-Analyse. Die Identifizierung und Analyse der differentiell exprimierten Gene fand mittels der Option „Genstudie“ der CFX manager software 2.0 statt. Die Gene *pvuA*, *dnaE*, *recA* und ein Locus der 16S-23S Spacer-Region (1623S) dienten zur Normalisierung mittels  $\Delta\Delta C(q)$ -Methode.

Für die RT-qPCR wurden spezifische Oligonukleotid-Primerpaare verwendet (Tabelle 8). Neue Primer und Primerpaare wurden mit Hilfe der Software Primer3 designt.

Der Reaktionsansatz wurde aus Supermixmix, Primern und cDNA wie folgt vorbereitet und in weiße 96-well-Platten pipettiert, die mit optischer Folie verschlossen wurden:

2x SsoFast Eva Green Supermix	6,25 µl
je Primer	0,5 µM
cDNA	1 µl
dH <sub>2</sub> O ad	12,5 µl

Die Reaktion fand nach folgendem Protokoll in einem PCR-Cycler (BioRad C-1000) mit optischem Kopf (BioRad CFX96) statt:

1x	95 °C	3 min
45x	95 °C	10 s
	57 °C	15 s
1x	95 °C	10 s
Schmelzkurve von		
68 °C bis 88 °C Inkrement	0,2 °C	5 s

### 2.2.5.7 Korrelation Genexpression Microarray und RT-qPCR

Um die Ergebnisse, die mittels Microarray und RT-qPCR erzielt wurden, zu überprüfen, wurden die log<sub>2</sub>-transformierten und gegen 37 °C normalisierten Expressions-Werte in Excel gegeneinander aufgetragen. Es wurde jeweils für die verschiedenen Gene einzeln und alle untersuchten Gene gemeinsam eine Ausgleichsgerade erstellt und deren Bestimmtheitsmaß (R<sup>2</sup>) angegeben.



**Tabelle 8:** Genfragmente, die für die RT-qPCR verwendet wurden  
 Angegeben sind Genname, Gen-ID, Sequenz, Fragmentgröße und Quelle.

Gen	ID	Sequenz 5' nach 3'	Größe <sup>1</sup>	Quelle der Primer
1623S	*	GCTGACAAAACAACAATTTATTGTT GGAGTTTCGAGTTGATGAAC	170 bp	KONG <i>et al.</i> (2002) KONG <i>et al.</i> (2002)
<i>groES</i>	VP2852	TATTCAACGATCGCCATGAT TGGTGACACCGTTATCTTCG	108 bp	Diese Arbeit Diese Arbeit
<i>cspA</i>	VPA1289	TATCGTTGCTGACGGTTTCA TCAGTCGCTTGAGGACCTTT	90 bp	Diese Arbeit Diese Arbeit
<i>pvsA</i>	VPA1658	GGACCTCCACGTCGTTCTTA GGGATTGAAGACATCGCACT	112 bp	Diese Arbeit Diese Arbeit
<i>pvuA</i>	VPA1656	GCTGTGATGCTTGATCGTA GTGGAATCGGTTTGGTCACT	107 bp	Diese Arbeit Diese Arbeit
<i>recA</i>	VP2550	GAAACCATTTCAACGGGTTT GTGCAGCAGCGATAAGCTC	139 bp	GONZALEZ-ESCALONA <i>et al.</i> (2008) Diese Arbeit
<i>dnaE</i>	VP2303	GATTACCGCTTTCGCCG GTGTATCCATGCCCGATTTT	140 bp	GONZALEZ-ESCALONA <i>et al.</i> (2008) Diese Arbeit
<i>dtdS</i>	VPA1509	TGGCCATAACGACATTCTGA TTCGTGACCGACAACCATAG	124 bp	GONZALEZ-ESCALONA <i>et al.</i> (2008) Diese Arbeit
<i>pyrC</i>	VPA0408	AGCAACCGGTAAAATTGTCG TCCATGAACCAAAAAGCAACA	142 bp	GONZALEZ-ESCALONA <i>et al.</i> (2008) Diese Arbeit
<i>tnaA</i>	VPA0192	TGTACGAAATTGCCACCAAA TCAGCGTAACCTTCTTCACG	103 bp	GONZALEZ-ESCALONA <i>et al.</i> (2008) Diese Arbeit

\* Sequenz eines Lokus der 16S-23S Spacer-Region auf Chromosom 2 (zwischen bp 134385 und bp 135166).

<sup>1</sup> bp, Basenpaare

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 *Vibrio* spp. und *V. parahaemolyticus* in Lebensmitteln

Insgesamt wurden 168 Garnelen- und Krabbenerzeugnisse im Einzelhandel gekauft und hinsichtlich ihrer Belastung mit verschiedenen *Vibrio* spp. untersucht. Eine Zusammenstellung der analysierten Proben befindet sich im Anhang in Tabelle A3.

Bei 47 (28,0 %) Proben konnten entweder eine oder mehrere *Vibrio* spp. nachgewiesen werden (Tabelle 9). Dabei wurden in 30 Proben aus dem asiatischen Raum, in vier aus dem Atlantik, in drei aus dem Pazifik sowie in drei Proben aus Südamerika *Vibrio* spp. nachgewiesen. Die Herkunft der restlichen sieben *Vibrio* spp.-positiven Proben war nicht bekannt.

**Tabelle 9:** Belastung der *Vibrio* spp.-positiven Proben mit einer oder mehreren *Vibrio* spp

	Anzahl (Anteil) der <i>Vibrio</i> spp.-positiven Proben	
Eine <i>Vibrio</i> sp.	18	(38,3 %)
Zwei <i>Vibrio</i> spp.	19	(40,4 %)
Drei <i>Vibrio</i> spp.	8	(17,0 %)
Vier <i>Vibrio</i> spp.	2	(4,3 %)

In den *Vibrio* spp.-positiven Proben konnte zu 46,8 % (n = 22) *V. parahaemolyticus* nachgewiesen werden, entweder als alleinige Spezies oder neben anderen *Vibrio* spp. Insgesamt konnten aus diesen 22 Proben 62 *V. parahaemolyticus*-Isolate gewonnen und in die Stammsammlung des Instituts für Lebensmittelhygiene integriert werden. Die Prävalenzen aller detektierten *Vibrio* spp. sind in Tabelle 10 aufgeführt.

**Tabelle 10:** Prävalenz der verschiedenen *Vibrio* spp. und Anteil an den positiv getesteten und allen untersuchten Proben

<i>Vibrio</i> spp.	Anzahl der positiv getesteten Proben (Anteil an den positiv getesteten bzw. allen Proben)	
<i>V. alginolyticus</i>	16	(34,0 %; 9,5 %)
<i>V. cholerae</i>	15	(31,9 %; 8,9 %)
<i>V. metschnikovii</i>	10	(21,3 %; 6,0 %)
<i>V. parahaemolyticus</i>	22	(46,8 %; 13,1 %)
<i>V. vulnificus</i>	25	(53,2 %; 14,9 %)

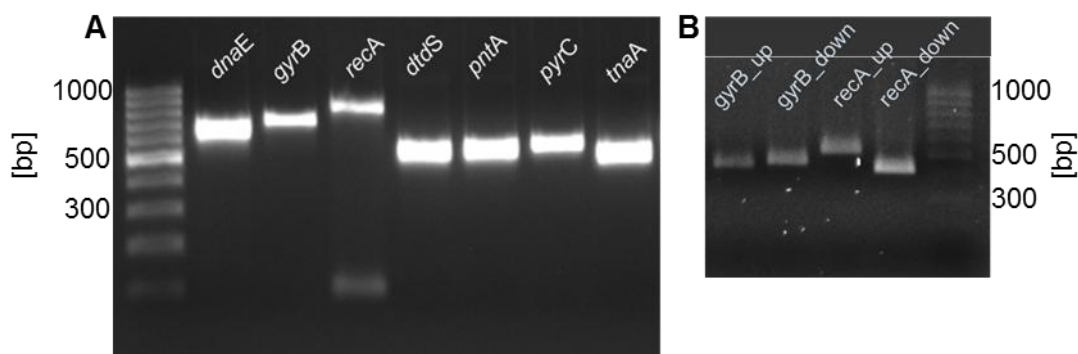
Die 62 identifizierten *V. parahaemolyticus*-Isolate wurden zusätzlich hinsichtlich des Besitzes der Toxin-codierenden Gene *tdh* und *trh* untersucht. Dabei konnte bei 30 (48,4 %) der *V. parahaemolyticus*-Isolate *trh* und bei einem (1,6 %) *tdh/trh* nachgewiesen werden. Bezogen auf die *Vibrio* spp.-positiven Proben waren zehn (45,5 %) positiv für *trh* und eine (4,5 %) positiv für *tdh/trh*. Demnach enthielten 6,5 % aller untersuchten Proben (n = 168) Toxin-codierende *V. parahaemolyticus*.

## 3.2 MLST-Analyse

Die mittels MLST analysierten Stämme sind in Tabelle A2 im Anhang aufgeführt.

Für einige Stämme konnten mit den ursprünglichen Primerpaaren keine vollständigen Allelprofile generiert werden. Vor allem bei den Loki *gyrB* und *recA* konnten häufig keine PCR-Produkte erzeugt werden oder die Sequenzierungsreaktion brach nach wenigen Basenpaaren ab. Durch die mittels primer walking erzeugte Aufteilung der *gyrB*- und *recA*-Fragmente in jeweils zwei Teilfragmente (*gyrB*\_up, *gyrB*\_down, *recA*\_up, *recA*\_down) konnte auch für diese Stämme ein vollständiges Profil erstellt werden (Abbildung 10 B). Dabei waren die zusätzlichen Primer so gewählt, dass die PCR-Reaktionen in Kombination mit den Primern und dem Protokoll nach GONZALEZ-ESCALONA *et al.* (2008) durchgeführt werden konnten.

Die mittels PCR amplifizierten Genfragmente zeigten bei der Überprüfung im Agarose-Gel die erwarteten Größen (Abbildung 10 und vgl.2.2.4.1).



**Abbildung 10:** MLST-PCR von *V. parahaemolyticus*

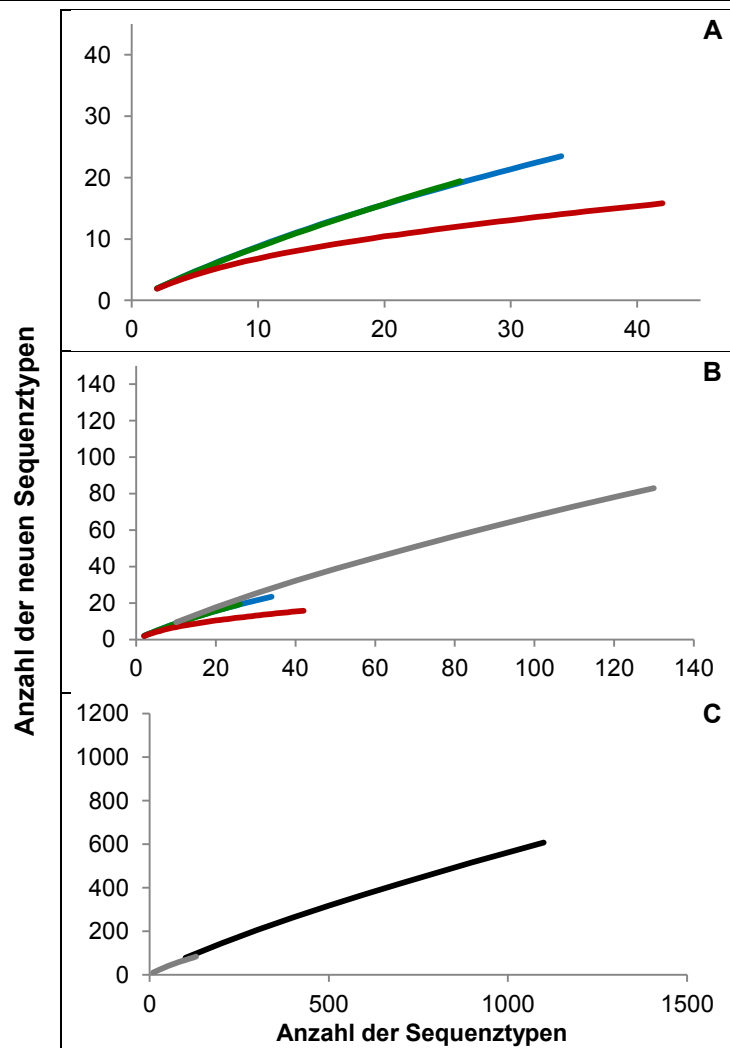
**A** MLST-PCR nach GONZALEZ-ESCALONA *et al.* (2008) und **B** PCR der *gyrB*- und *recA*-Teilfragmente.

### 3.2.1 Diversität der Stammsammlung

Um die Vollständigkeit der gesammelten Diversität der Stämme innerhalb der verschiedenen geographischen Regionen zu beurteilen, wurden Rarefaction-Kurven für die verschiedenen Stamm-Gruppen (Sri Lanka, Ecuador, NB-Seas, IFH-Stämme sowie pubMLST-Stämme) berechnet. Keine der erhaltenen Rarefaction-Kurven erreichte die Plateauphase (Abbildung 11). Dies ist ein Indiz dafür, dass ein Teil der natürlichen Diversität nicht in den jeweiligen Stamm-Gruppen enthalten war. Einzig die Kurve der Stämme aus Sri Lanka nähert sich dem Plateau an (Abbildung 11 A).

### 3.2.2 Genotypische Stammdiversität und Populationsanalyse

Nach der Sequenzierung und dem Vergleich der Sequenzen mit den bereits in der pubMLST-Datenbank hinterlegten Sequenzen wurden den Stämmen die entsprechenden bekannten oder neuen Sequenztypen zugewiesen. Die erhaltenen Allel-Profile auf Nukleotid-Ebene sowie die Sequenztypen bzw. Peptid-Sequenztypen sind mit den Herkunftsinformationen in Tabelle A2 im Anhang aufgeführt. Außerdem sind Anzahl und Anteil der identifizierten Sequenztypen und der Allele auf Nukleotid-Ebene in Tabelle A4 bzw. der Peptid-Sequenztypen und der Allele auf Peptid-Ebene in Tabelle A5 im Anhang zusammengefasst. Alle Beobachtungen, die die Diversität der Sequenztypen, Peptid-Sequenztypen, Allele, polymorphen Stellen,  $d_N/d_S$ -Werte und  $D$ -Werte betreffen, stimmen mit den auf den pubMLST-Stämmen basierenden Resultaten überein (vgl. Tabelle 12).



**Abbildung 11:** Rarefaction-Kurven der verschiedenen Stamm-Gruppen.

Aufgetragen ist die Anzahl der neuen Sequenztypen gegen die Anzahl der verschiedenen identifizierten Sequenztypen pro Gruppe. **A** Stämme aus Sri Lanka - rot, Ecuador - grün und NB-Seas - blau. **B** IFH-Stämme - grau, Stämme aus Sri Lanka - rot, Ecuador - grün und NB-Seas - blau. **C** IFH-Stämme - grau und pubMLST-Stämme - schwarz.

### 3.2.2.1 Diversität der Sequenztypen

Mittels MLST-Analyse konnten bei den 130 analysierten Stämmen 82 einzigartige Sequenztypen identifiziert werden, von diesen waren 68 (82,9 %) noch nicht in der pubMLST-Datenbank hinterlegt (Tabelle 11). Auch nach der Unterteilung der Stammsammlung in die geographischen Gruppen blieb die Anzahl der verschiedenen und neuen Sequenztypen hoch.

Die meisten Sequenztypen ( $n = 64$ ) wurden nur einmal (je 0,8 %) bei den untersuchten Stämmen identifiziert, allerdings wurden gerade für Stämme aus Sri Lanka einzelne Sequenztypen häufiger nachgewiesen (vgl. Tabelle A4 im Anhang). Dabei war der häufigste ST394, der bei 10 Stämmen (7,7 %) identifiziert wurde, gefolgt von ST395 und ST397 bei je sieben Stämmen (5,4 %) und ST722 bei fünf Stämmen (3,8 %). Insgesamt wurden 372 verschiedene Allele identifiziert, von denen 125 (33,6 %) noch nicht in der Datenbank hinterlegt waren. Die einzelnen Loci besaßen zwischen 41 (*pntA*) und 65 (*gyrB*) einzigartige Allele, von denen 23,6 % (*dnaE*) bis 43,1 % (*gyrB*) neu waren. Das häufigste Allel war *pntA*26, das 19-mal, d. h. bei 14,6 % der untersuchten Stämme, auftrat. 19 (*pntA*) bis 26 (*recA*) Allele eines Locus wurden in zwei bis 19 Sequenztypen identifiziert, dabei waren bis zu 40,9 % (*tnaA*) der einzelnen Allele in mehr als einem Sequenztyp vertreten. Die am weitesten

verbreiteten Allele waren *pntA26* in zehn Sequenztypen, *dtdS19* in acht Sequenztypen und *tnaA1* in sieben Sequenztypen.

**Tabelle 11:** Eigenschaften der analysierten *V. parahaemolyticus* Populationen

	Anzahl der Isolate	Anzahl der Sequenztypen (neue Sequenztypen)	Anzahl der Peptid-Sequenztypen (neue Peptid-Sequenztypen)
Sri Lanka	43	16 (15)	9 (4)
Chillaw	11	6 (6)	6 (1)
Puttalam	21	12 (11)	7 (3)
Madurankuliya	11	6 (5)	4 (1)
Ecuador	27	21 (19)	13 (8)
Markt	9	8 (8)	6 (4)
Machala	10	8 (6)	6 (2)
Balao	2	2 (2)	2 (1)
Guayaquil	6	5 (5)	3 (1)
Nord- und Ostsee	26	19 (16)	13 (6)
Nordsee	8	4 (4)	4 (2)
Ostsee	14	11 (8)	8 (2)
Kattegat und Skagerrak	4	4 (4)	4 (2)
Deutscher Einzelhandel	34	29 (21)	10 (3)
IFH-Stämme	130	82 (68)	31 (19)

Die Anteile der verschiedenen Allele am jeweiligen Locus waren bei den IFH-Stämmen und den pubMLST-Stämmen vergleichbar (Tabelle 12). Den niedrigsten Anteil an der Gesamt-Diversität besaß der Locus *pntA* mit 11 % und am diversesten war *gyrB* mit 17,5 %.

Die einzigartigen Allele sind durch verschiedene Anzahlen und Positionen von polymorphen Mutationen der Nukleinsäuresequenz charakterisiert. 22,1 % der bei den pubMLST-Stämmen ( $n = 1089$ ) beobachteten polymorphen Stellen der in-frame zusammengefügt Fragmente waren bei den hier analysierten Stämmen vorhanden. Die Anzahl der polymorphen Stellen reichte für die einzelnen Loci von 41 für *pntA* (9,6 %) und *tnaA* (9,7 %) bis 66 für *recA* (9,1 %), wobei der höchste Anteil polymorpher Stellen bei *dtdS* (11,0 %) vorlag. Diese Verteilung ist vergleichbar zu der, die bei den pubMLST-Stämmen auftrat. Der diverseste Locus *gyrB* besaß übereinstimmend mit der pubMLST-Datenbank nur 47 (8 %) variable Stellen. Die größere Anzahl von Kombinationen der verschiedenen polymorphen Stellen führte zu einer größeren Anzahl einzigartiger Allele.

Die  $d_N/d_S$ -Werte für alle Loci waren nahe an null, deuten somit auf reinigende Selektion hin und waren vergleichbar zu denen, die für die pubMLST-Stämme berechnet wurden.

Die Trennschärfe eines Typisierungsschemas wird durch den Diversitätsindex nach Simpson ( $D$ ) angegeben, dieser Wert zeigt für alle Loci eine große Fähigkeit an, zwischen unterschiedlichen Stämmen zu unterscheiden. Dabei war *pntA* (0,965) der am wenigsten und *gyrB* (0,992) der am stärksten differenzierende Locus. Die beobachteten Werte sind vergleichbar zu denen, die auf Grundlage der pubMLST-Stämme berechnet wurden.

### 3.2.2.2 Diversität der Peptid-Sequenztypen

Nach der Translation der in-frame Nukleotid-Sequenzen in ihre Peptid-Sequenzen wurden bei den analysierten Stämmen 31 verschiedene Peptid-Sequenztypen identifiziert, von denen 19 (61,3 %) neu waren (vgl. Tabelle A5 im Anhang). Die Peptid-Sequenztypen traten mit einer Häufigkeit von 0,8 % bis 28,5 % auf. Insgesamt wurden 39 und bei den einzelnen Loci ein ( $p_{gyrB}$ ) bis 14 ( $p_{pyrC}$ ) verschiedene Allele gefunden (Tabelle 12).

**Tabelle 12:** Eigenschaften und Diversität der MLST- und AA-MLST-Loki

Lokus	Fragmentgröße <sup>A</sup>		Anzahl und Anteil der Allele <sup>B</sup>		Anzahl und Anteil neuer Allele		Anzahl und Anteil variabler Stellen <sup>B</sup>		Diversitätsindex nach Simpson <sup>B</sup>		$d_N/d_S$ <sup>B, C</sup>
	MLST	AA-MLST	MLST	AA-MLST	MLST	AA-MLST	MLST	AA-MLST	MLST	AA-MLST	MLST
<i>dnaE</i>	555 bp	185 aa	55; 14,8 % (195; 13,7 %)	5; 12,8 % (15; 10,6 %)	13; 23,6 %	2; 40,0 %	55; 9,9 % (115; 20,7 %)	3; 1,6 % (11; 5,9 %)	0,988 (0,985)	0,630 (0,614)	0,026 (0,025)
<i>gyrB</i>	591 bp	197 aa	65; 17,5 % (274; 19,2 %)	1; 2,6 % (7; 4,9 %)	28 43,1 %	0; 0,0 %	47; 8,0 % (100; 16,9 %)	*; - (6; 3,0 %)	0,992 (0,989)	0,000 (0,094)	0,000 (0,002)
<i>recA</i>	726 bp	242 aa	57; 15,3 % (201; 14,1 %)	1; 2,6 % (9; 6,3 %)	21 36,8 %	0; 0,0 %	66; 9,1 % (216; 29,8 %)	*; - (24; 9,9 %)	0,987 (0,985)	0,000 (0,106)	0,006 (0,015)
<i>dtdS</i>	456 bp	152 aa	55; 14,8 % (237; 16,6 %)	3; 7,7 % (9; 6,3 %)	17; 36,4 %	1; 33,3 %	50; 11,0 % (100; 21,9 %)	2; 1,3 % (8; 5,3 %)	0,983 (0,987)	0,127 (0,117)	0,002 (0,002)
<i>pntA</i>	429 bp	143 aa	41; 11,0 % (146; 10,3 %)	7; 17,9 % (36; 25,4 %)	11; 26,8 %	4; 57,1 %	41; 9,6 % (85; 19,8 %)	6; 4,2 % (29; 20,8 %)	0,965 (0,966)	0,404 (0,525)	0,018 (0,042)
<i>pyrC</i>	489 bp	163 aa	55; 14,8 % (219; 15,4 %)	14; 35,9 % (41; 28,9 %)	20; 38,2 %	3; 21,4 %	48; 9,8 % (107; 21,8 %)	11; 6,8 % (31; 19,0 %)	0,986 (0,981)	0,791 (0,753)	0,045 (0,049)
<i>tnaA</i>	423 bp	141 aa	44; 11,8 % (152; 10,7 %)	8; 20,5 % (25; 17,6 %)	15; 34,1 %	4; 50,0 %	41; 9,7 % (89; 21,0%)	6; 4,3 % (22; 15,6 %)	0,974 (0,97)	0,355 (0,440)	0,019 (0,023)
gesamt	3669 bp	1223 aa	372; 100 % (1424; 100 %)	39; 100 % (142; 100 %)	125; 33,6 %	15; 29,9 %	348; 9,5 % (812; 22,1 %)	28; 2,3 % (131; 10,7 %)			

<sup>A</sup> in-frame Fragment-Größe

<sup>B</sup> Werte in Klammern wurden auf Grundlage der pubMLST-Stämme berechnet.

<sup>C</sup> Der  $d_N/d_S$ -Wert gibt das Verhältnis von nicht-synonymen zu synonymen Mutationen an. Ein Wert <1 ist ein Indiz für reinigende Selektion.

\* Für das einzige aufgetretene Allel können keine variablen Stellen bestimmt werden.

Bei den meisten Loki dominiert ein Allel mit über 90 %, dagegen waren bei *p\_dnaE* zwei (*p\_dnaE1* 63,1 % und *p\_dnaE2* 33,1 %) und bei *p\_pyrC* vier Allele (*p\_pyrC1* 63,9 %, *p\_pyrC2* 13,1 %, *p\_pyrC3* 9,2 % und *p\_pyrC4* 43,1 %) vorherrschend (vgl. Tabelle A5 im Anhang). Die *p\_pyrC* Allele trugen zu 35,9 % zur gesamten Allel-Anzahl bei. Verglichen mit den pubMLST-Stämmen war die Größenordnung der Anteile der verschiedenen Allele vergleichbar. Für alle Loki außer *p\_gyrB* und *p\_recA* konnten neue Allele ( $n = 15$ ; 29,9 %) identifiziert werden (Tabelle 12). Die Anzahl der neuen Allele reichte von eins (*p\_dtdS*) bis vier (*p\_pntA* und *p\_tnaA*). Obwohl die Anzahl einzigartiger Allele für *p\_dnaE* niedrig war ( $n = 5$ ), waren 40 % dieser neu ( $n = 2$ ). Insgesamt waren 28 der 131 (21,37 %) variablen Stellen, die bei allen Loki der pubMLST-Stämme identifiziert wurden, auch bei den IFH-Stämmen vorhanden. Die Anzahl der variablen Stellen reichte von zwei für *p\_dtdS* bis 11 für *p\_pyrC*. Der Diversitätsindex nach Simpson war heterogen (Tabelle 12). Die Werte waren niedrig für *p\_gyrB*, *p\_recA* und *p\_tnaA* (0,000; 0,000 und 0,127), dies deutet auf eine geringe Trennschärfe dieser Loki hin. Für *p\_dnaE* und *p\_pyrC* (0,630 und 0,791) wurden dagegen höhere Werte ermittelt. Verglichen mit den Werten, die auf Grundlage der pubMLST-Stämme berechnet wurden, zeigten sich vergleichbare Größenordnungen.

Für die geographischen Gruppen wurden weniger verschiedene Peptid-Sequenztypen mit einem geringeren Anteil neuer Typen beobachtet. Für verschiedene Regionen blieben die Peptid-Sequenztypen divers, z. B. besitzt jeder einzigartige Sequenztyp der Stämme aus Chillaw in Sri Lanka einen einzigartigen korrespondierenden Peptid-Sequenztyp (vgl. Tabelle 11 in Abschnitt 3.2.2.1).

### 3.2.2.3 Peptid-Sequenztypen der pubMLST-Stämme

Insgesamt waren 584 Sequenztypen mit mindestens einem Isolat in der pubMLST-Datenbank hinterlegt. Diese Sequenztypen waren durch einzigartige Kombinationen von 195 *dnaE*-, 274 *gyrB*-, 201 *recA*-, 237 *dtdS*-, 146 *pntA*-, 219 *pyrC*- und 152 *tnaA*-Allelen definiert. Die Translation der in-frame Sequenzen lieferte 166 Peptid-Sequenztypen, die aus einzigartigen Kombinationen der 15 *p\_dnaE*-, 7 *p\_gyrB*-, 9 *p\_recA*-, 9 *p\_dtdS*-, 36 *p\_pntA*-, 41 *p\_pyrC*- und 25 *p\_tnaA*-Allele bestanden (vgl. Tabelle A6 im Anhang). Die Sequenzen und Häufigkeiten der einzelnen Allele auf Peptid-Ebene sind in Tabelle A7 im Anhang zusammengefasst.

### 3.2.2.4 Vergleich des MLST- und AA-MLST-Schemas

Insgesamt wurden 372 einzigartige MLST- und 39 AA-MLST-Allele in den IFH-Stämmen identifiziert. Der größte Anteil dieser Reduktion der Allel-Diversität (Mittelwert 95,85 %) war auf wobble-Basen zurückzuführen. Exemplarisch wurde diese Reduktion für das häufigste Allel eines jeden Locus der pubMLST-Stämme berechnet (Tabelle 13). Dabei war in 91,3 % der Fälle die erste Base des Leucin codierenden Triplets und in je einem Fall die erste Base von Serin sowie Arginin verändert.

Der Anteil der Allele eines Locus an der Gesamtzahl aller Allele veränderte sich von der Nukleotid- zur Peptid-Ebene. Diese Beobachtungen werden vom  $d_N/d_S$ -Wert reflektiert und spiegeln die unterschiedlichen Einflüsse eines Locus auf die beiden Typisierungsschemata wider. Zum Beispiel gibt es auf Nukleotid-Ebene 65 verschiedene *gyrB*-Allele, die zu einem einzigen *p\_gyrB*-Allel zusammengefasst werden. Dies entspricht ausschließlich synonymen Substitutionen, die von einem  $d_N/d_S$ -Wert von null reflektiert werden (vgl. Tabelle 12 in Abschnitt 3.2.2.2). Im Gegensatz dazu

wurden die 55 *pyrC*-Allele in 14 *p\_pyrC* transformiert, dies entspricht deutlich mehr nicht-synonymen Substitutionen ( $d_N/d_S$ -Wert von 0,045). Der Anteil der Allele des *pyrC*-Lokus an der Gesamtzahl der Allele stieg von der Nukleotid- (15,4 %) zur Peptid-Ebene (28,9 %) an. Für *pntA* unterschied sich die Größenordnung des  $d_N/d_S$ -Wertes: Die IFH-Stämme besaßen einen  $d_N/d_S$ -Wert von 0,018 im Gegensatz zu einem Wert von 0,042 für die pubMLST-Stämme. Demnach wiesen die hier untersuchten IFH-Stämme weniger nicht-synonyme Substitutionen auf und besaßen somit einen stärker konservierten *pntA*-Lokus.

**Tabelle 13:** Anteil der wobble-Base am beobachteten Diversitätsverlust

Allel	Anzahl der polymorphen Stellen	Anzahl und Anteil der wobble-Basen
<i>p_dnaE1</i>	82	79; 96,3 %
<i>p_gyrB1</i>	93	88; 94,6 %
<i>p_recA1</i>	106	100; 94,3 %
<i>p_dtdS1</i>	91	89; 97,8 %
<i>p_pntA1</i>	48	45; 93,7 %
<i>p_pyrC1</i>	68	66; 97,1 %
<i>p_tnaA1</i>	66	65; 98,5 %

### 3.2.3 Klonale Beziehungen zwischen den IFH-Stämmen und innerhalb der geographischen Stamm-Gruppen

Um die Populationsstruktur der analysierten Stämme zu identifizieren, wurde der standardisierte Index der Assoziation ( $I_A^S$ ) berechnet (Tabelle 14). Dabei wurde der  $I_A^S$  für die verschiedenen geographischen Stamm-Gruppen, die IFH-Stämme und die pubMLST-Stämme sowie für jeweils ein Isolat pro Sequenztyp ermittelt. Für die IFH-Stämme und die pubMLST-Stämme war der  $I_A^S$  signifikant unterschiedlich zu null. D. h., die Allele befinden sich im linkage disequilibrium bzw. sind nicht zufällig verteilt. Ein  $I_A^S$  von null kennzeichnet dagegen linkage equilibrium, bei dem Rekombination häufig auftritt und die Allele unabhängig voneinander verteilt sind. Wurde nur ein Isolat pro Sequenztyp betrachtet, fiel der  $I_A^S$ -Wert ab, blieb aber weiterhin ungleich null und kennzeichnet die Tendenz zum linkage disequilibrium. Für die verschiedenen geographischen Stamm-Gruppen wurde ein  $I_A^S$  ermittelt, der in der gleichen Größenordnung war (d. h. deutlich ungleich null), wie der der IFH-Stämme.

**Tabelle 14:** Rekombination innerhalb verschiedener *V. parahaemolyticus*-Gruppen

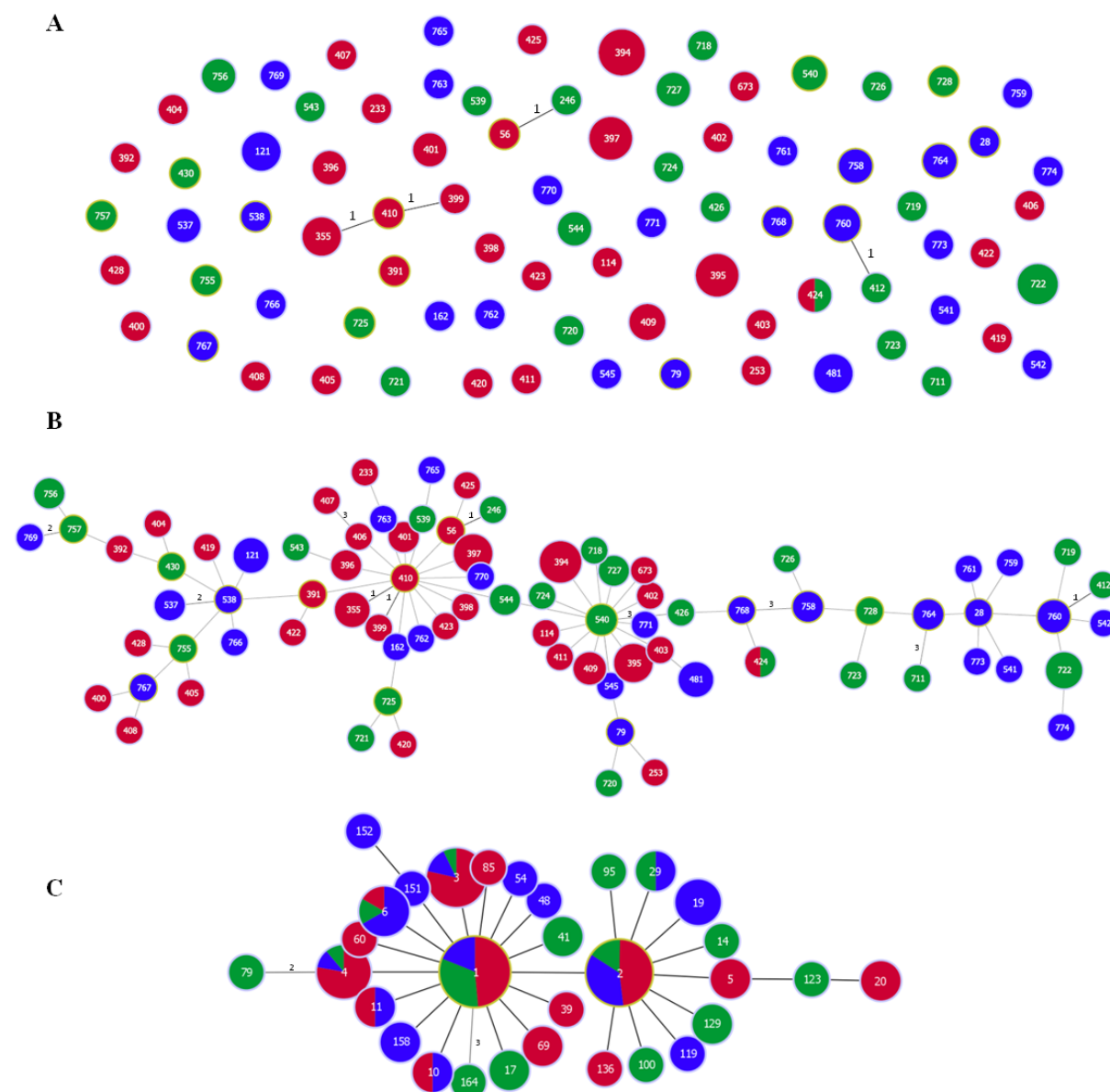
	Anzahl der Isolate	$I_A^S$
Stämme aus Sri Lanka	43	0,8043 (sld)
Stämme aus Ecuador	30	0,6277 (sld)
Stämme aus NB-Seas	36	0,6482 (sld)
IFH-Stämme	130	0,4922 (sld)
pubMLST-Stämme	1089	0,6291 (sld)
Ein Isolate/ Sequenztyp	584	0,0841 (sld)

$I_A^S$ , standardisierter Index der Assoziation; sld, signifikantes linkage disequilibrium



### 3.2.3.1 Analyse der IFH-Stämme

Um einen Überblick über klonale Beziehungen innerhalb der analysierten IFH-Stämme zu erhalten, wurde ein Population Snapshot mittels goeBURST-Analyse erstellt, bei dem nur SLVs verbunden wurden (Abbildung 12 A). Die Stämme wurden einem Triplet (ST355-ST410-ST399) und zwei Doubletten (ST246-ST56 und ST760-ST412) zugewiesen. Die verbleibenden 75 Sequenztypen unterschieden sich in mindestens zwei Loci von allen anderen Sequenztypen. Wenn zusätzlich DLVs betrachtet wurden, konnten zwei weitere Doubletten (ST537-ST538 und ST757-ST769) identifiziert werden (Abbildung 12 B, Ebene 2). Durch Betrachtung von Tripel-Lokus-Varianten (TLVs) wurden vier weitere Doubletten (ST406-ST407, ST758-ST768, ST711-ST764 und ST540-ST426) identifiziert



**Abbildung 12:** MSTs basierend auf den Allel-Profilen von *V. parahaemolyticus*

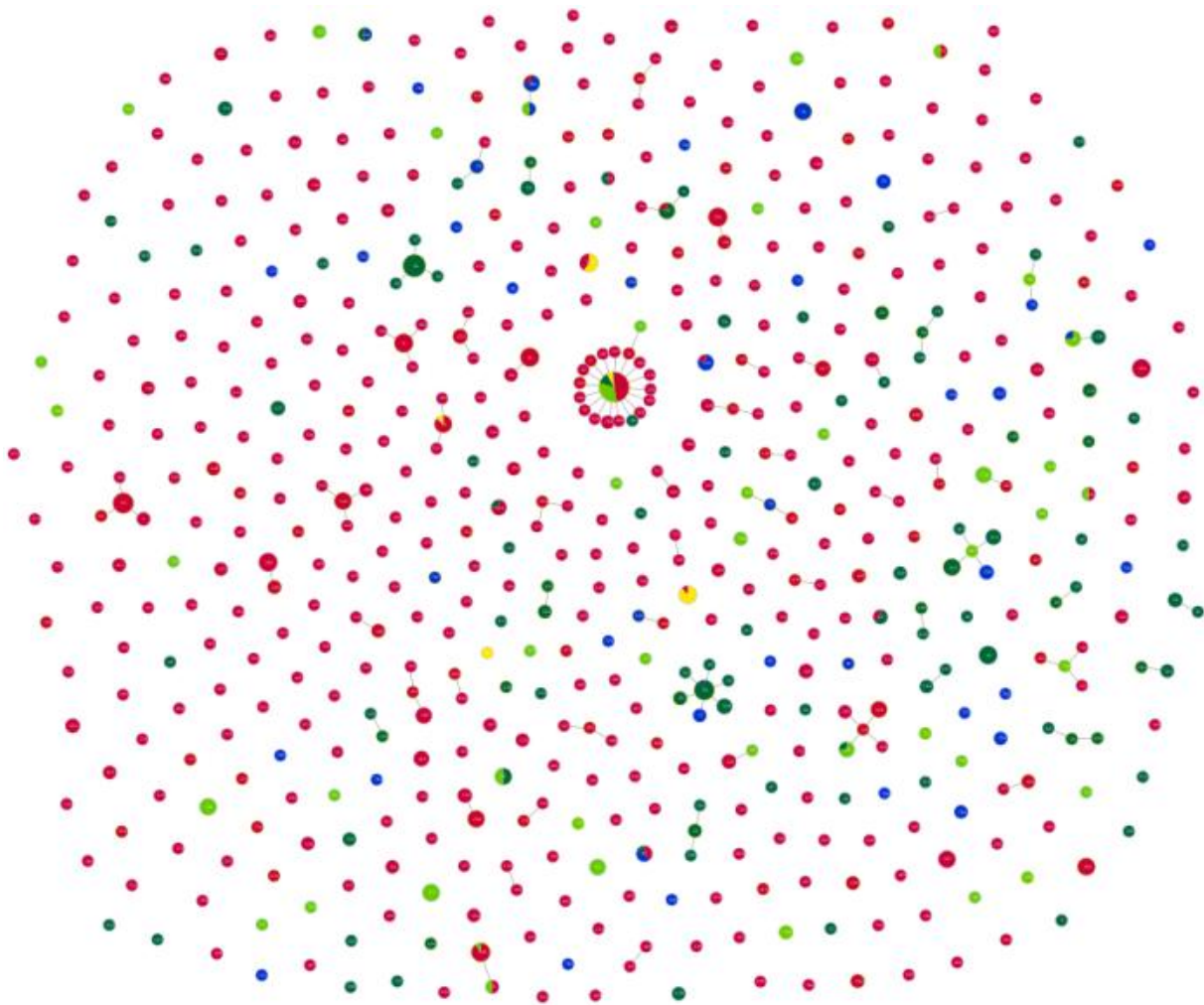
Die Einfärbung markiert die geographische Herkunft der Stämme: rot - Asien, grün - Südamerika, blau - Europa. Die Größe der Kreise repräsentiert die Anzahl der Stämme mit dem korrespondierenden Sequenztyp bzw. Peptid-Sequenztyp. Kreise mit hellgrüner Umrandung sind (Teil-)Gruppen-Gründer. **A** Population Snapshot basierend auf den MLST-Profilen. SLVs sind durch eine schwarze Linie (markiert mit „1“) verbunden. **B** FullMST basierend auf den MLST-Profilen. Alle Verbindungen wurden gezogen. SLVs sind durch eine schwarze Linie (markiert mit „1“), DLVs durch eine dunkelgraue („2“), TLVs durch eine graue („3“) und Sequenztypen mit mehr als drei unterschiedlichen Allelen durch eine hellgraue Linie verbunden. **C** FullMST basierend auf den AA-MLST-Profilen. Alle Verbindungen wurden gezogen. SLVs sind durch eine schwarze Linie, DLVs durch eine dunkelgraue (markiert mit „2“), TLVs durch eine graue Linie („3“) verbunden.

(Abbildung 12 B, Ebene 3). Die Stämme dieser Gruppen wurden in zwei Fällen aus Proben eines und in einem Fall aus Proben zweier Kontinente isoliert und zeigen somit eine mögliche globale Ausbreitung von klonalen Komplexen. Wurden auch Sequenztypen verbunden, die sich in allen Loci unterscheiden, erhielt man den in Abbildung 12 B dargestellten fullMST.

Um klonale Beziehungen zu zeigen, wurde das AA-MLST-Schema implementiert. Bei der Analyse des Population Snapshots auf Peptid-Ebene unterschieden sich nur pST79 und pST164 in mehr als einem Allel von den anderen Peptid-Sequenztypen. Dies führte zu der Bildung eines einzigen Komplexes, der vermutlich von den beiden prognostizierten Vorfahren pST1 und pST2 gegründet wurde (Abbildung 12 C). Die genotypische Verwandtschaft auf Peptid-Ebene war somit deutlicher zu erkennen. Es konnte kein Clustern der Stämme hinsichtlich ihres geographischen Ursprungs beobachtet werden. Die häufigen Peptid-Sequenztypen konnten auf allen Kontinenten identifiziert werden, wohingegen andere nur bei Stämmen von einem Kontinent identifiziert wurden. Allerdings konnte eine Abstammungslinie von nordeuropäischen Peptid-Sequenztypen ausgemacht werden: pST151 und pST152 unterschieden sich in nur einem Allel und wurden beide ausschließlich bei Stämmen gefunden, die aus Proben der NB-Seas stammten.

Wurden diese Stämme im Kontext aller pubMLST-Stämme analysiert, konnten drei klonale Komplexe, sechs Triplets und zehn Doubletten identifiziert werden, die IFH-Stämme enthielten (Abbildung 13). Dabei konnte die Bildung eines neuen klonalen Komplexes beobachtet werden, der vermutlich von ST412 gegründet wurde. ST412 wurde zum ersten Mal bei einem garnelensoziierten Umweltstamm aus Ecuador identifiziert, der im Rahmen der Prävalenzstudie isoliert wurde. Drei weitere Sequenztypen dieses klonalen Komplexes wurden bei potentiell pathogenen US-amerikanischen Umweltstämmen identifiziert (ST313, ST314 und ST315), ein weiterer Sequenztyp (ST760) bei einem Stamm, der auf der Expeditionsfahrt in der deutschen Nordsee isoliert wurde. Wurden zusätzlich DLVs betrachtet, wurden zwei weitere Sequenztypen diesem klonalen Komplex zugeordnet: ST43, identifiziert bei US-amerikanischen Umweltstämmen und klinischen Stämmen, sowie ST44, der ausschließlich bei klinischen US-amerikanischen Stämmen identifiziert wurde.

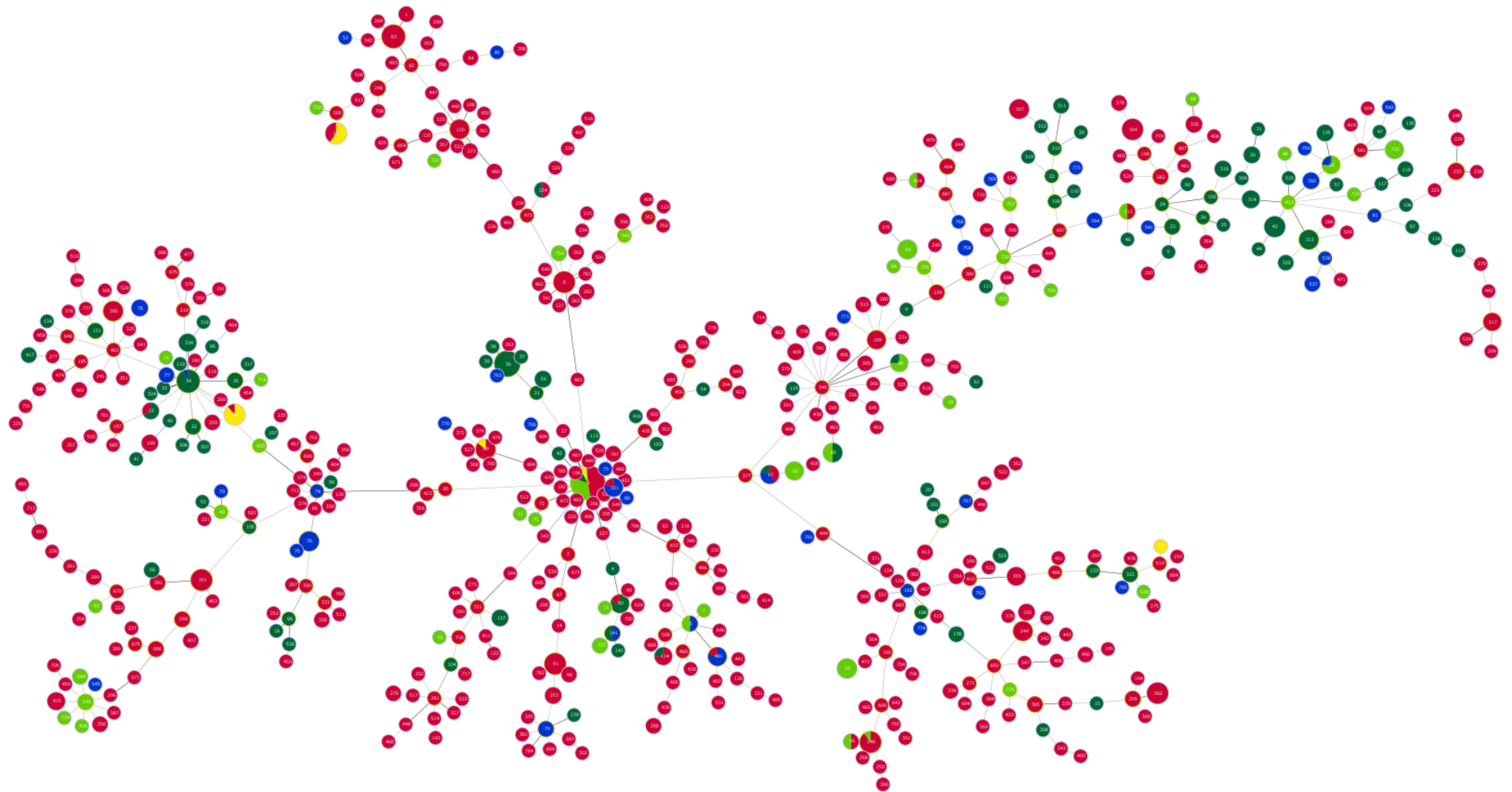
Im korrespondierenden fullMST waren keine klaren Gruppen erkennbar (Abbildung 14). Da die Datenbank zu ca. 60 % aus asiatischen Isolaten besteht, existiert ein Bias bezüglich dieser Region. Die Verlässlichkeit des fullMST war teilweise schwach, da viele Verbindungen zwischen Stämmen mit mehr als drei unterschiedlichen Allelen bestehen (Ebene 3 oder höher), wobei diese häufig Gruppen von Stämmen mit verlässlicher Beziehung (SLVs und DLVs) verbinden.



**Abbildung 13:** Population Snapshot basierend auf den MLST-Profilen der pubMLST-Stämme von *V. parahaemolyticus*

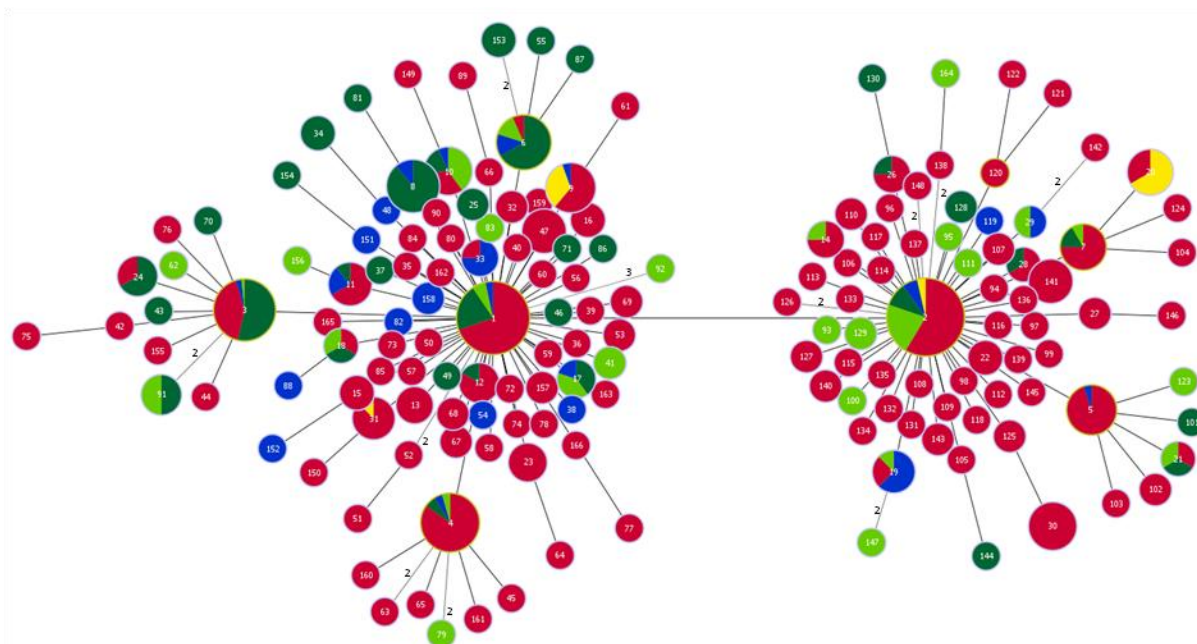
Die Einfärbung markiert die geographische Herkunft der Stämme: rot - Asien, dunkelgrün – Nordamerika, hellgrün - Südamerika, gelb - Afrika und blau - Europa. Die Größe repräsentiert die Anzahl der Stämme mit dem korrespondierenden Sequenztyp. Sequenztypen, die sich in einem Allel unterscheiden, sind durch eine Linie verbunden.

Auf Peptid-Ebene (Abbildung 15) konnten keine eindeutigen Gruppen identifiziert werden. Allerdings waren Abstammungslinien sichtbar, die überwiegend von Peptid-Sequenztypen gebildet wurden, die bei Stämmen eines Kontinentes identifiziert wurden (z. B. pST120-pST121-pST122 mit asiatischen Peptid-Sequenztypen). Auch konnten Linien identifiziert werden, die vergleichsweise weniger asiatische Peptid-Sequenztypen enthielten (z. B. pST3, pST6 und pST8 mit ihren Abkömmlingen). Die Peptid-Sequenztypen, die häufig bei unseren Stämmen identifiziert wurden, waren auch die häufigsten in der pubMLST-Datenbank (z. B. pST1, pST2, pST3 und pST4). Diese häufigen Peptid-Sequenztypen repräsentieren viele Stämme mit unterschiedlicher geographischer Herkunft und viele verschiedene Sequenztypen, z. B. entspricht pST1 142 Sequenztypen und pST2 127 Sequenztypen (Abbildung 15 und vgl. Tabelle A6 im Anhang).



**Abbildung 14:** FullMST basierend auf den MLST-Profilen der pubMLST-Stämme von *V. parahaemolyticus*

Die Einfärbung markiert die geographische Herkunft der Stämme: rot - Asien, dunkelgrün - Nordamerika, hellgrün - Südamerika, gelb - Afrika und blau - Europa. Die Größe repräsentiert die Anzahl der Stämme mit dem korrespondierenden Sequenztyp dargestellt: SLVs sind durch eine schwarze, DLVs durch eine dunkelgraue und alle höheren Verbindungen sind durch eine hellgraue Linie verbunden. . Alle Verbindungen sind



**Abbildung 15:** FullMST basierend auf den AA-MLST-Profilen der pubMLST-Stämme von *V. parahaemolyticus*. Die Einfärbung markiert die geographische Herkunft der Stämme: rot - Asien, dunkelgrün - Nordamerika, hellgrün - Südamerika, gelb - Afrika und blau - Europa. Die Größe repräsentiert die Anzahl der Stämme mit dem korrespondierenden Peptid-Sequenztyp. Alle Verbindungen sind dargestellt: SLVs sind durch eine schwarze, DLVs durch eine dunkelgraue (mit „2“ markiert) und die TLV durch eine graue Linie („3“) verbunden.

### 3.2.3.2 Stämme der geographischen Gruppen

Für alle Stämme der geographischen Gruppen (Sri Lanka, Ecuador, NB-Seas) wurden fullMSTs basierend auf den MLST- und AA-MLST-Allelen erstellt, die die regionale Verteilung der Sequenztypen und Peptid-Sequenztypen zeigen (Abbildung 16).

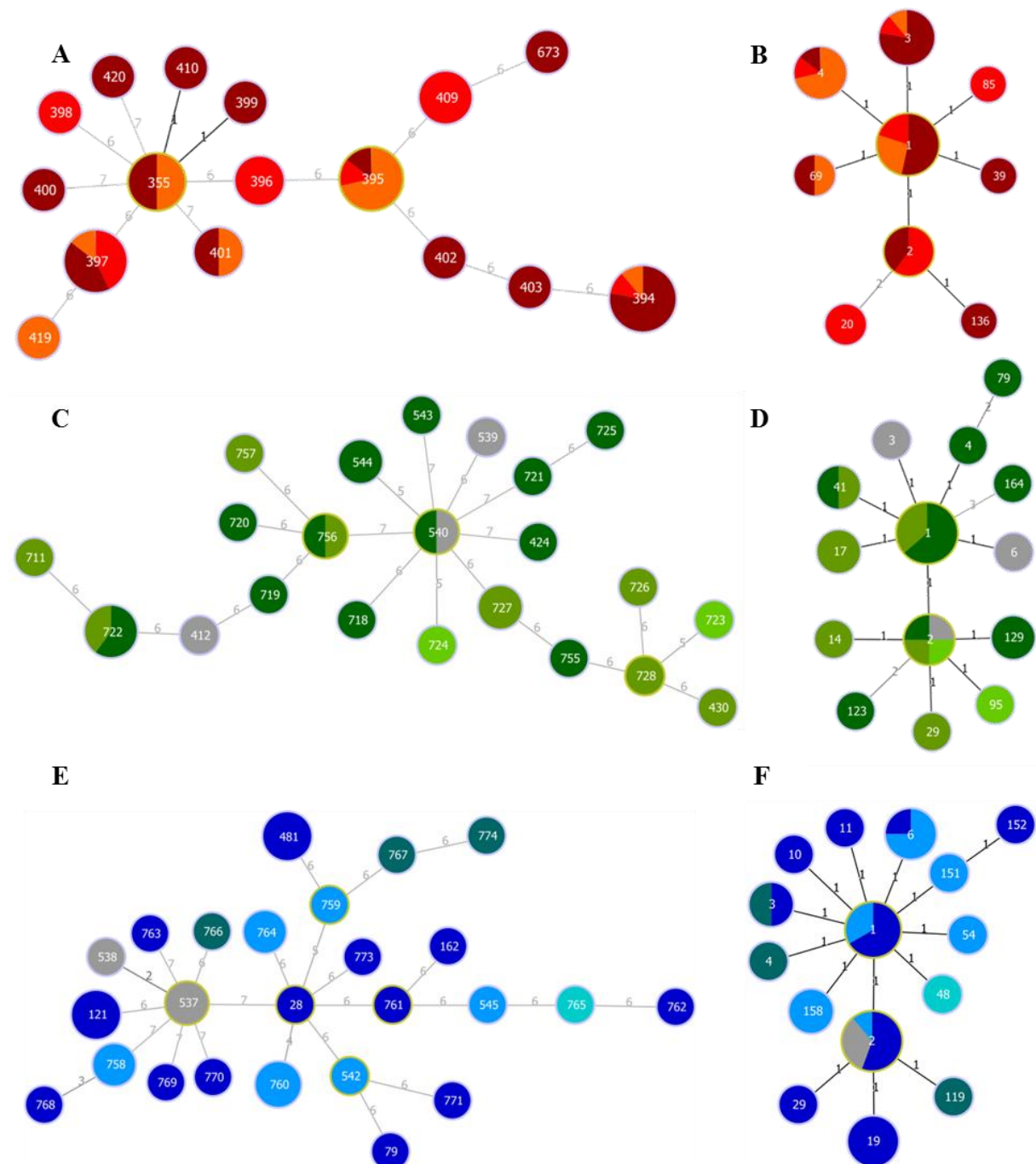
Das einzige identifizierte Triplet wurde von sri-lankischen Sequenztypen gebildet (Abbildung 16 A). In den Stämmen aus Ecuador und NB-Seas konnten keine SLVs identifiziert werden. Die Sequenztypen, die mehrfach identifiziert wurden, waren entweder nur in einer Teilregion vorhanden, wie die meisten Sequenztypen in Ecuador und NB-Seas (z. B. ST760, ST758, ST727), oder waren, vor allem wie in Sri Lanka, in mehr als einer Teilregion zu finden (ST394, ST395, ST397). Es konnte kein vorherrschender Sequenztyp identifiziert werden, der entweder in einer Gruppe dominierte oder in allen geographischen Gruppen zu finden war. Kein Sequenztyp (außer ST424) wurde in mehr als einer Gruppe gefunden, sodass die meisten Sequenztypen keine globale Verbreitung zeigten.

Verbreitete Peptid-Sequenztypen (niedrig nummerierte Peptid-Sequenztypen wie pST1 bis pST4) konnten in allen drei geographischen Gruppen gefunden werden. Zwei der weniger verbreiteten Peptid-Sequenztypen (pST6 und pST29) wurden in Ecuador und NB-Seas identifiziert, wohingegen die meisten der seltenen Peptid-Sequenztypen ausschließlich in einer Region vorhanden waren. Verglichen mit den Stämmen aus Ecuador und aus NB-Seas war bei den Stämmen aus Sri Lanka ein höherer Anteil der Peptid-Sequenztypen in mehr als einer Teilregion verbreitet (Abbildung 16 B, D und F).

Bei Stämmen der NB-Seas konnten Sequenztypen, die mehrmals identifiziert wurden, entweder bei Stämmen aus der Nordsee (ST758, ST760 und ST764) oder der Ostsee (ST481) detektiert werden, aber nicht aus beiden Meeren (Abbildung 16 E).



Zwei der Sequenztypen aus den geographischen Gruppen konnten auch in den Einzelhandelsproben identifiziert werden. So war ST394 in einer Probe von einer sri-lankischen Garnelenfarm und einer Probe aus dem deutschen Einzelhandel, die aus dem Indischen Ozean stammte, vorhanden. ST540 konnte in ecuadorianischen Garnelen sowohl im Erzeugerland als auch im deutschen Einzelhandel identifiziert werden. Dies zeigt, dass spezifische Sequenztypen entlang der globalen Handelsrouten verfolgt werden können: von Meeresfrüchte-produzierenden Ländern wie



**Abbildung 16:** FullIMSTs der geographischen Gruppen von *V. parahaemolyticus*

**A** und **B** Sri Lanka (Puttalam - dunkelrot, Chillaw - rot, Madurankuliya - hellrot), **C** und **D** Ecuador (Machala - dunkelgrün, Guayaquil - grün, Balao - hellgrün), **E** und **F** NB-Seas (Ostsee - dunkelblau, Nordsee - hellblau, Kattegat - dunkeltürkis, Skagerrak - helltürkis). **A**, **C** und **E** FullIMSTs basierend auf den MLST-Profilen, **B**, **D** und **F** FullIMSTs basierend auf den AA-MLST-Profilen. Für alle Gruppen gilt: Graue Kreise repräsentieren Sequenztypen bzw. Peptid-Sequenztypen mit unbekannter regionaler Herkunft. Schwarze Linien (markiert mit „1“) verbinden SLVs, dunkelgraue Linien („2“) verbinden DLVs, graue Linien („3“) verbinden TLVs und hellgraue Linien („4“ bis „7“) stehen für Verbindungen auf höherer Ebene. (Teil-)Gruppen-Gründer sind durch eine hellgrüne Umrandung markiert.

Sri Lanka und Ecuador bis zur Ebene des Einzelhandels in Meeresfrüchte-importierenden Ländern.

Von den Sequenztypen, die in Garnelen-Farmen in Sri Lanka vorhanden waren, wurden zwei Sequenztypen (ST394, ST397) in zwei bzw. ein Sequenztyp (ST395) in drei aufeinanderfolgenden Jahren identifiziert.

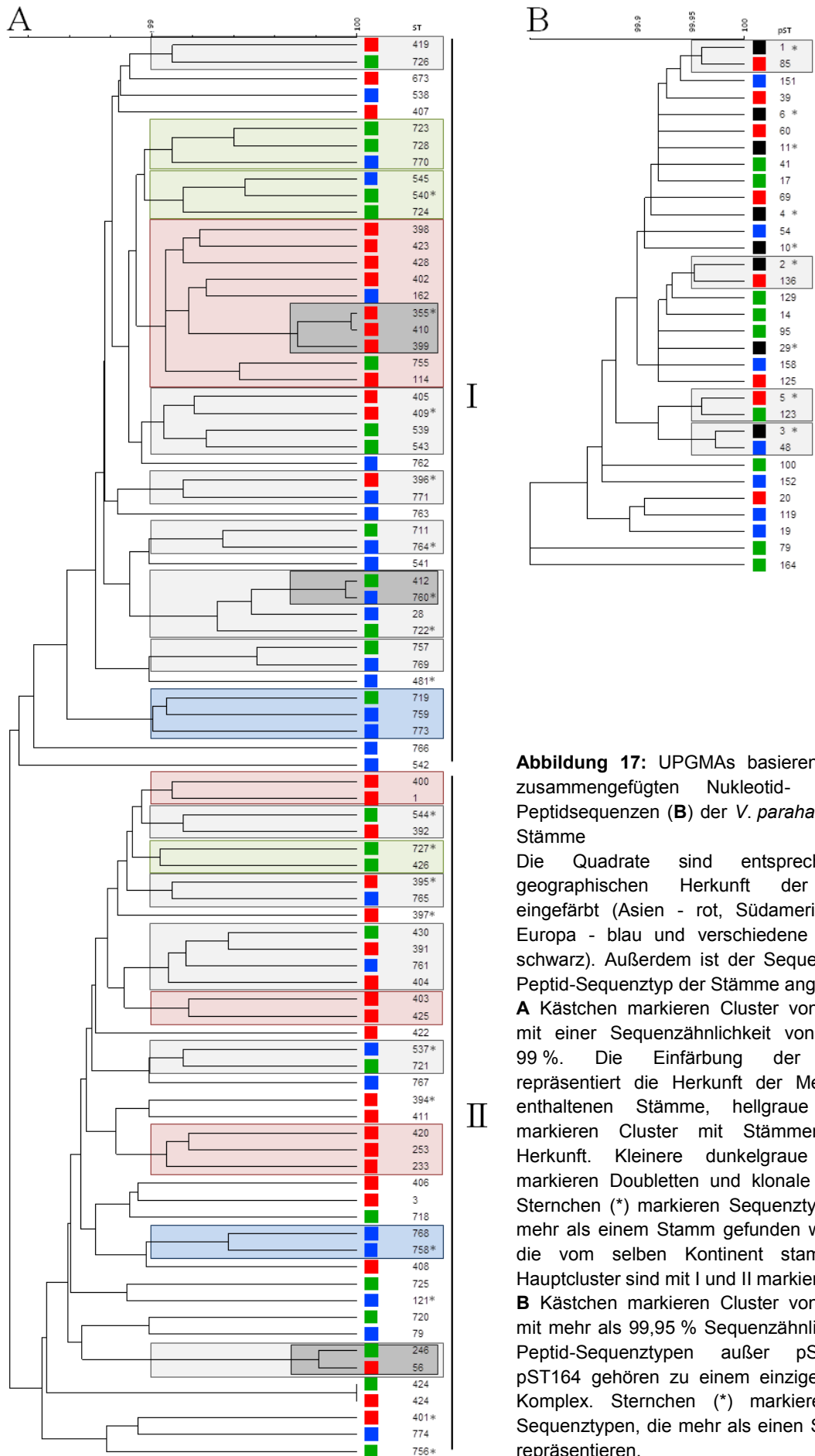
### 3.2.4 Phylogenetische Analyse

Die UPGMA-Analyse, basierend auf den zusammengeführten Nukleotid-Sequenzen, ergab eine hohe genetische Diversität der untersuchten Stämme (Abbildung 17 A). Dennoch konnten Gruppen von Sequenztypen, die im UPGMA Cluster bilden, identifiziert werden. Diese Cluster enthalten Stämme mit mehr als 99,0 % Übereinstimmung der zusammengeführten Nukleotid-Sequenzen.

Die beiden Hauptcluster (mit I und II in Abbildung 17 A gekennzeichnet) zeigten eine unterschiedliche Zusammensetzung hinsichtlich der geographischen Herkunft der Stämme. Das Cluster I wurde durch einen höheren Anteil südamerikanischer (54 %) und europäischer (65 %) Stämme gebildet, wohingegen in Cluster II ein höherer Anteil asiatischer Stämme (60 %) enthalten war. Neun der 20 Cluster bestanden überwiegend aus Isolaten eines Kontinents (in Abbildung 17 A mit Kästchen markiert). Die klonalen Komplexe, die durch goeBURST im MST identifiziert wurden, clusterten auch im UPGMA (Abbildung 17 A dunkelgraue Kästchen) und DLVs und TLVs waren im UPGMA benachbart. Insgesamt konnten mehrere Cluster pro Kontinent identifiziert werden und die Verteilung der Sequenztypen war unabhängig von der geographischen Herkunft, so waren z. B. Sequenztypen aller Kontinente über den ganzen Baum verteilt.

Im Gegensatz dazu wurden fast alle Peptid-Sequenztypen in ein Hauptcluster gruppiert (Abbildung 17 B). Nur pST79 und pST164 aus Ecuador waren DLVs bzw. TLVs. Dies entspricht der goeBURST-Analyse: Bis auf pST79 und pST164 gehören alle Peptid-Sequenztypen einem einzigen klonalen Komplex an. Der AA-UPGMA konnte kein Clustering abhängig von der geographischen Herkunft der Stämme zeigen. Die Zusammensetzung der einzelnen Peptid-Sequenztypen wird in Abbildung 17 B ersichtlich: Die häufigen Peptid-Sequenztypen wurden verschiedenen Sequenztypen zugeordnet und stammen von unterschiedlichen Kontinenten (markiert durch schwarze Quadrate). Daher konnte aus der Peptid-Sequenztyp-Zugehörigkeit kein Rückschluss auf die geographische Herkunft gezogen und kein herkunftsbasiertes Clustering beobachtet werden, was ein Hinweis auf eine gleichmäßige globale Verteilung von Peptid-Sequenztypen sein könnte.

Vergleicht man die Resultate der UPGMA-Analysen basierend auf Nukleotid- bzw. Peptidsequenzen, so wurden nicht alle Cluster der Nukleotid-Ebene auch auf Peptid-Ebene gebildet (Abbildung 17 A und B). Alle Sequenztypen, die einen klonalen Komplex oder eine Doublette bilden, wurden aber durch denselben Peptid-Sequenztyp charakterisiert (CC410 und Doublette ST246-ST56 waren pST1; Doublette ST760-ST412 war pST6).



**Abbildung 17:** UPGMAs basierend auf den zusammengeführten Nukleotid- (A) bzw. Peptidsequenzen (B) der *V. parahaemolyticus*-Stämme

Die Quadrate sind entsprechend der geographischen Herkunft der Stämme eingefärbt (Asien - rot, Südamerika - grün, Europa - blau und verschiedene Herkunft - schwarz). Außerdem ist der Sequenztyp bzw. Peptid-Sequenztyp der Stämme angegeben.

**A** Kästchen markieren Cluster von Stämmen mit einer Sequenzähnlichkeit von mehr als 99 %. Die Einfärbung der Kästchen repräsentiert die Herkunft der Mehrheit der enthaltenen Stämme, hellgraue Kästchen markieren Cluster mit Stämmen diverser Herkunft. Kleinere dunkelgraue Kästchen markieren Doubletten und klonale Komplexe. Sternchen (\*) markieren Sequenztypen, die in mehr als einem Stamm gefunden wurden und die vom selben Kontinent stammen. Die Hauptcluster sind mit I und II markiert.

**B** Kästchen markieren Cluster von Stämmen mit mehr als 99,95 % Sequenzähnlichkeit. Alle Peptid-Sequenztypen außer pST79 und pST164 gehören zu einem einzigen klonalen Komplex. Sternchen (\*) markieren Peptid-Sequenztypen, die mehr als einen Sequenztyp repräsentieren.

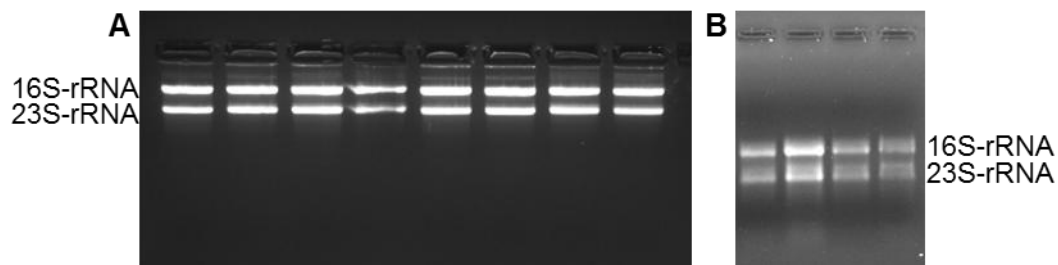


### 3.3 Genexpression

#### 3.3.1 Ausbeute und Qualität der RNA

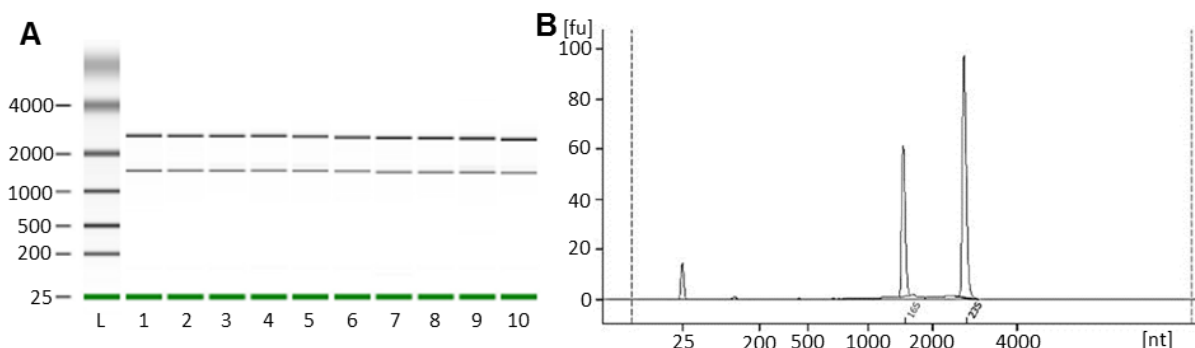
Die Konzentrationen der isolierten Nukleinsäuren vor und nach dem DNase-Verdau sowie nach der Umschrift in cDNA sind in Tabelle A8 im Anhang dargestellt. Außerdem sind das Verhältnis aus der Absorption bei 260 nm zu der bei 280 nm und die Einbaurate von Cy-3 angegeben. Bei allen cRNA-Proben wurde sowohl die erforderliche Ausbeute (1,65 µg) als auch die Einbaurate von Cy-3 (9,0 pmol/µg) erreicht.

Die Integrität der einzelnen Proben (150 ng) wurde anhand der Klarheit und Intensität der Banden der 16S- und 23S-rRNA in nativen und denaturierenden Agarose-Gelen überprüft (Abbildung 18). Nachdem sich mit beiden Gel-Arten ähnliche Ergebnisse erzielen ließen bzw. das Erscheinungsbild guter RNA-Qualität im nativen Gel bekannt war, wurden die folgenden Proben nur noch im nativen Gel untersucht.



**Abbildung 18:** Kontrolle der RNA-Qualität im nativen Agarose-Gel (A) und denaturierendem Agarose-Gel (B). Die Banden entsprechen der 16S- und 23S-rRNA.

Bei der Analyse im Bioanalyzer wird zur Visualisierung eine Gel-ähnliche Darstellung erzeugt, bei der die Integrität der Banden der 16S- und 23S-rRNA überprüft werden kann (Abbildung 19 A). Außerdem wird für jede Probe ein Diagramm erzeugt, in dem die gemessene Intensität der Fluoreszenz bei der jeweiligen Nukleotid-Anzahl aufgetragen wird (Abbildung 19 B). Neben den beiden möglichst schmalen Hauptpeaks der 16S- und 23S-rRNA und dem Peak des Markers sollten sich möglichst keine weiteren Peaks zeigen, die für abgebaute Anteile der ribosomalen rRNAs stehen würden.

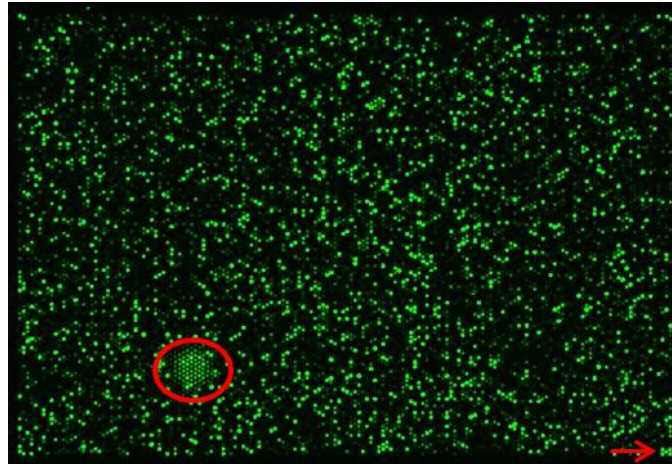


**Abbildung 19:** Gel-like Image (A) und Peak-Report (B) des Bioanalyzers

**A** Dargestellt sind der Größenstandard (Spur L) sowie 10 Proben (Spuren 1-10). Die Banden entsprechen der Größe der 16S- und 23S-rRNA. **B** Im Peak-Report entspricht die Fläche unter dem Peak der Menge der RNA mit der entsprechenden Größe. Auf der x-Achse ist die Anzahl der Nukleotide (nt) angegeben. Die Intensität des Signals ist in Fluoreszenz-Einheiten (fu) auf der y-Achse angegeben. Der Peak bei 25 Nukleotiden entspricht dem zugesetzten Größen-Marker, das Peak zwischen 1000 nt und 2000 nt der RNA der 16S-rRNA und das Peak über 2000 nt der 23S-rRNA.

### 3.3.2 Qualität der Microarrays und Ähnlichkeit der Replikate

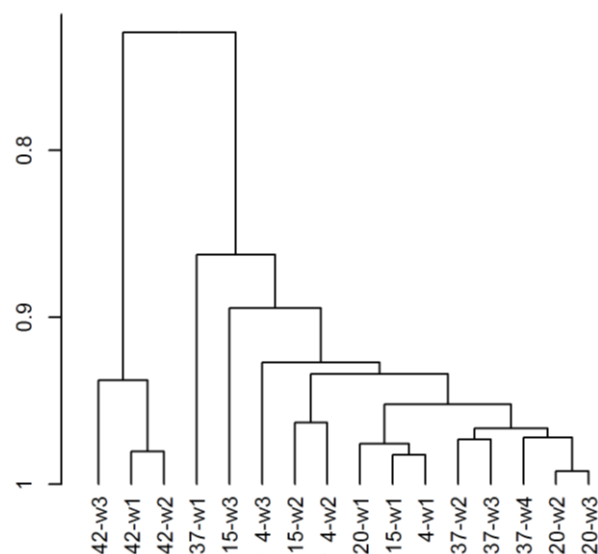
Bei den hier erzeugten Microarrays waren keine manuellen Anpassungen nötig, da die Extraktionssoftware auch bei abweichenden Intensitäten selbständig das Raster über die Spots legte, Abweichungen anpasste und die Intensitäten pro Spot extrahieren konnte. Zur Veranschaulichung ist beispielhaft ein eingescannter Array in Abbildung 20 dargestellt. Die Rohdaten wurden entsprechend der MIAME-Regularien in der Gene Expression Omnibus-Datenbank als Experiment GSE60815 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) hinterlegt.



**Abbildung 20:** Scan eines Microarrays

Der rote Pfeil markiert einen Bereich von Positiv-Kontrollen umgeben von Negativ-Kontrollen. Dieser dient auch dazu, die richtige Orientierung des Arrays zu erkennen. Rot eingekreist ist ein Bereich, der eine zu hohe Fluoreszenz aufweist. Die Extraktionssoftware kann solche Bereiche selbständig anpassen, solange das Raster der Spots, wie in diesem Fall, erkennbar bleibt.

Um zu überprüfen, ob die verschiedenen Replikate zu ähnlichen Ergebnissen führen, wurde eine hierarchische Clusteranalyse durchgeführt (Abbildung 21). Dabei werden die Ergebnisse anhand ihrer Ähnlichkeit gruppiert, wobei die Korrelation als Entfernungsmesser dient. Die einzelnen Replikate der Bedingung 42 °C bilden das am stärksten abgegrenzte Cluster mit einer Korrelation von unter 0,8 zu den restlichen Bedingungen. Auch die anderen Proben clustern entsprechend der Testbedingung,



**Abbildung 21:** Hierarchische Clusteranalyse der Replikate

Die Korrelation dient als Entfernungsmesser. Die erste Zahl steht für die Temperatur [°C] und die zweite Zahl für die Nummer des Replikates bei der jeweiligen Temperatur.

allerdings sind die verschiedenen Bedingungen ähnlicher und das Clustering ist nicht so stark. Die Bedingungen 20 °C und 37 °C haben – abgesehen von je einem Replikat bei 20 °C und 37 °C (20w-1, 37-w1) – eine Korrelation von über 0,975. Die Proben der Bedingungen 4 °C und 15 °C zeigen eine größere Ähnlichkeit zueinander als zu den Clustern der Bedingungen 42 °C sowie 20 °C und 37 °C.

### 3.3.3 Korrelation RT-qPCR und Microarray

Die Ergebnisse der Microarray-Versuche wurden verifiziert, indem die Expression in RT-qPCR-Assays anhand ausgewählter Gene überprüft wurde. Dazu wurde ein Aliquot der RNA, die für die Microarray-Versuche verwendet wurde, in cDNA umgeschrieben und der logarithmierte Expressionswert mittels Genestudy-Option der Software CFX Manager ermittelt. Zur Normalisierung wurden die Gene *pvuA*, *dnaE* und *recA* sowie ein Locus der 16S-23S Spacer-Region (1623S) auf Chromosom 2 verwendet. Die so erhaltenen Expressionswerte aus Microarray und RT-qPCR wurden gegeneinander aufgetragen, eine Ausgleichsgerade ermittelt und der Korrelationskoeffizient  $R^2$  bestimmt. Dieser Wert sagt aus, wie gut die Ergebnisse beider Experimente übereinstimmen. Die so aufgetragenen Ergebnisse sind in Abbildung 22 dargestellt. Wurden alle mit beiden Methoden untersuchten Genexpressionen gegeneinander aufgetragen, konnte ein Wert von 0,7825 für  $R^2$  bestimmt werden (Abbildung 22 A). Bei der getrennten Betrachtung der einzelnen Gene ergaben sich folgende Werte für  $R^2$ : 0,9792 für *groES*, 0,9693 für *cspA*, 0,8816 für *pyrC*, 0,8402 für *pvsA*, 0,7773 für *tnaA* und 0,5001 für *dtdS* (Abbildung 22 B-G). Je näher der Wert des Korrelationskoeffizienten an eins liegt, desto besser korrelieren beide Methoden miteinander.

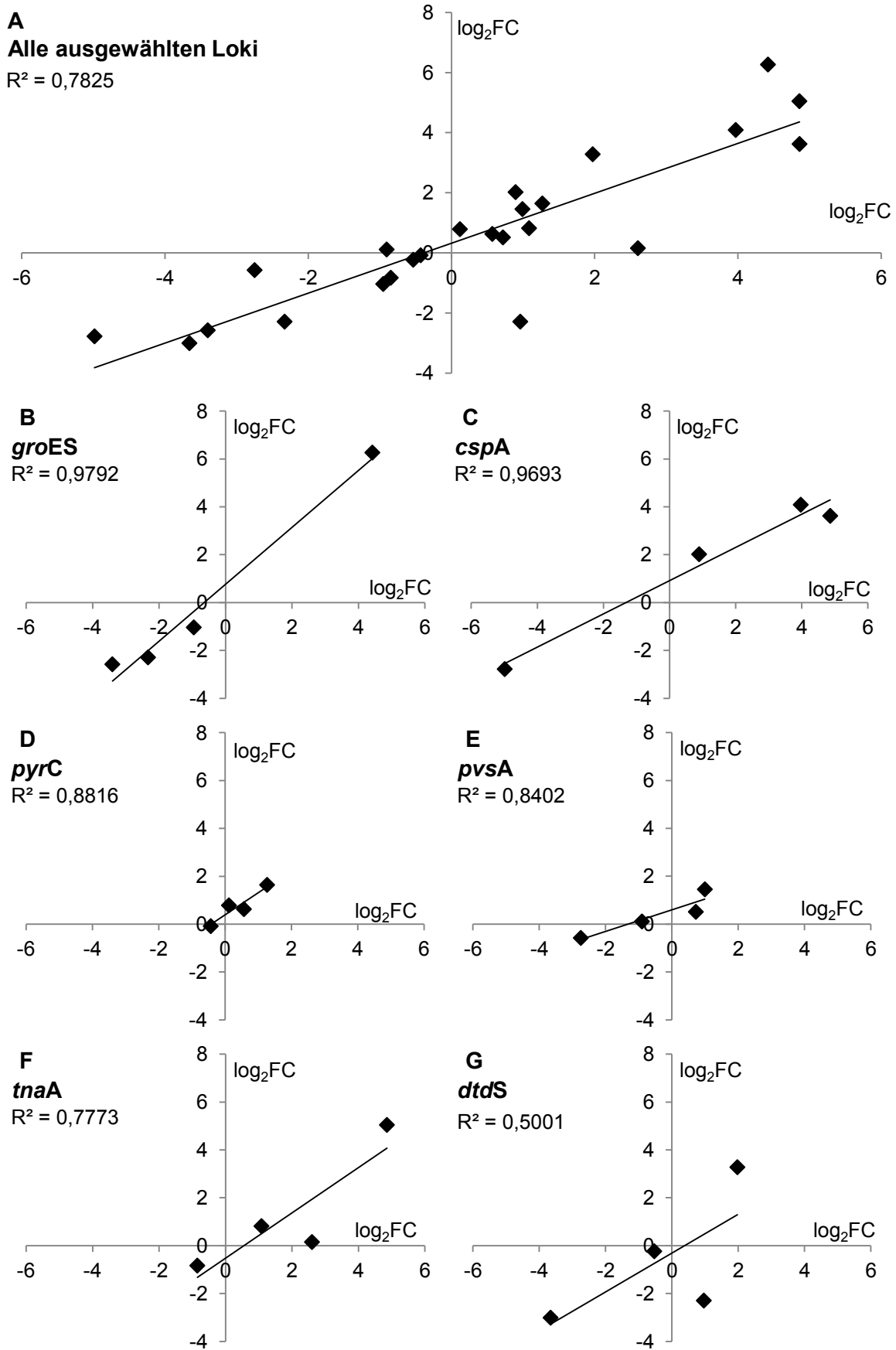
### 3.3.4 Auswahl der Referenztemperatur

Um die optimale Kontrollbedingung zu bestimmen, wurde die Anzahl differentiell exprimierter Gene bei jeder Temperatur ermittelt. Dabei wurden die Daten jeder einzelnen Temperatur zur Normalisierung verwendet. Die Ergebnisse sind in der Kreuztabelle (Tabelle 15) dargestellt.

**Tabelle 15:** Anzahl der differentiell exprimierten Gene je nach Kombination der Test- und Kontrolltemperatur

Kontrolltemperatur	Anzahl der differentiell exprimierten Gene pro Temperaturvergleich					Gesamtzahl der differentiell exprimierten Gene pro Kontrolltemperatur
	4 °C	15 °C	20 °C	37 °C	42 °C	
4 °C		11	331	194	1687	2223
15 °C	11		283	660	2068	3022
20 °C	331	283		19	1226	1859
37 °C	194	660	19		641	1514
42 °C	1687	2068	1226	641		5622

Die niedrigste Anzahl differentiell exprimierter Gene wurde bei der Normalisierung gegen 37 °C mit insgesamt 1514 Genen identifiziert. Bei der Normalisierung gegen 20 °C wurden mit 1859 ebenfalls vergleichsweise wenige Gene differentiell exprimiert. Im Folgenden wurde die differentielle Expression der Gene bestimmt, indem die Expression bei 37 °C als Referenzwert verwendet wurde.



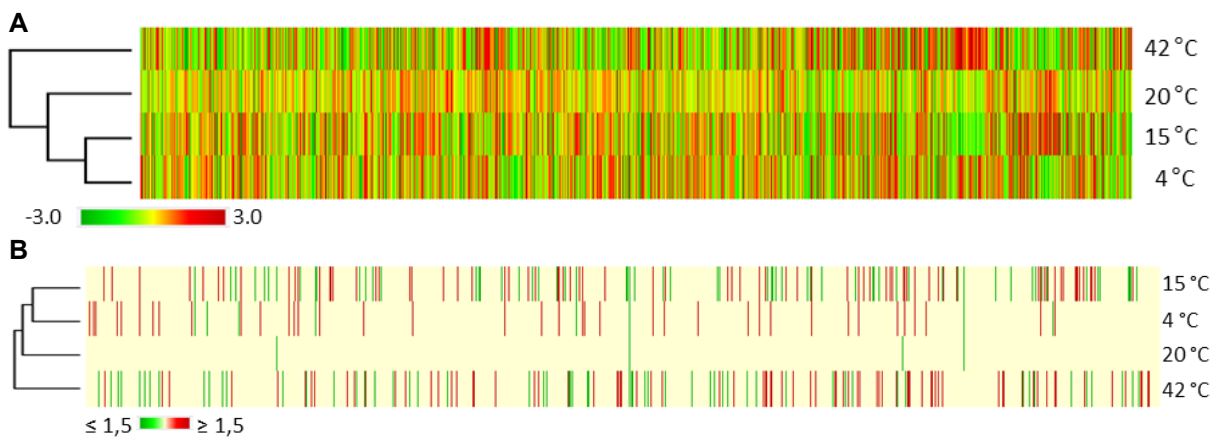
**Abbildung 22:** Korrelation der  $\log_2FC$ -Werte von Microarray- und RT-qPCR-Analysen  
**A** Alle ausgewählten Gene und das Bestimmtheitsmaß ( $R^2$ ) der Ausgleichsgeraden. **B – G** Die Gene einzeln und das jeweilige Bestimmtheitsmaß: **B** *groES*, **C** *cspA*, **D** *pyrC*, **E** *pvsA*, **F** *tnaA* und **G** *dtdS*.

### 3.3.5 Daten der normalisierten Expressionsunterschiede

Die gegen 37 °C normalisierte differentielle Expression der analysierten Gene ist in Tabelle S2 zusammengestellt, die auf dem Server des Instituts für Lebensmittelhygiene hinterlegt wurde. Alle weiteren Analysen basieren auf diesen Daten.

### 3.3.6 Temperaturinduzierte Expressionsunterschiede

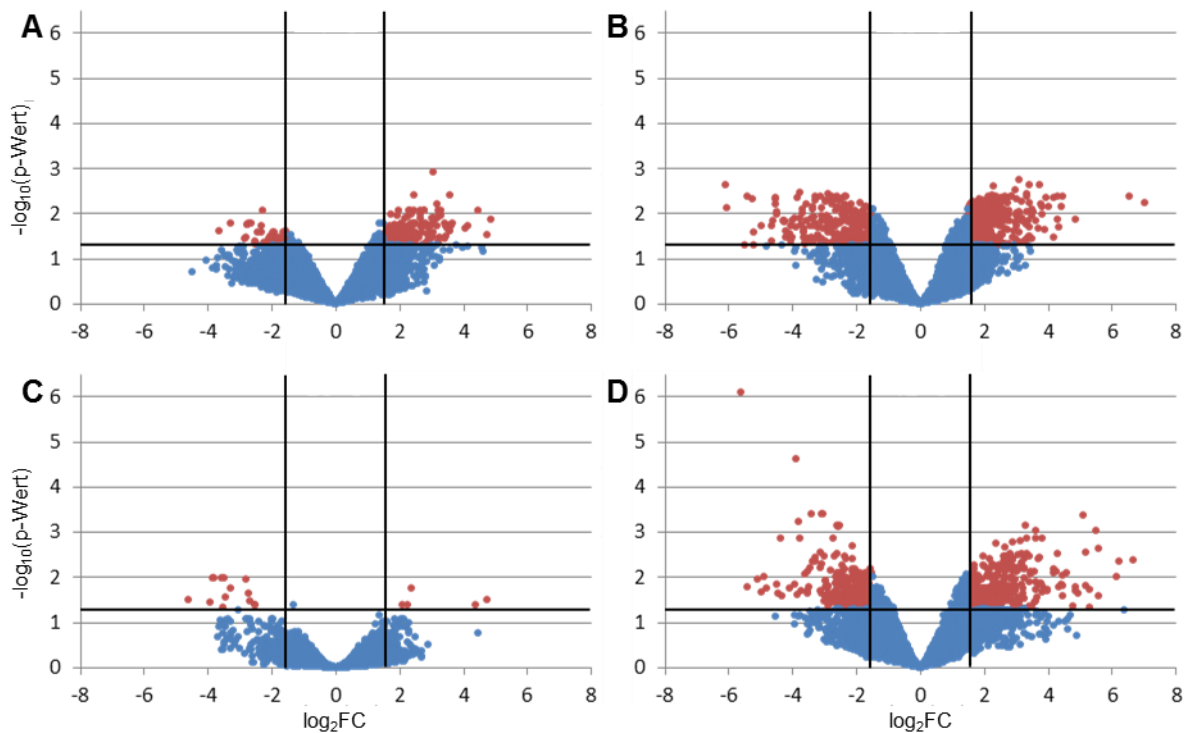
Um die globalen Expressionsveränderungen von *V. parahaemolyticus* bei verschiedenen Temperaturen zu vergleichen, wurden die Expressionsdaten bei 4 °C, 15 °C, 20 °C, 37 °C (als Referenzbedingung) und 42 °C generiert. Um temperaturabhängige Unterschiede der Expressionsveränderungen zu visualisieren, wurden die Experimente ihrer Ähnlichkeit nach gruppiert (Abbildung 23 A). Dabei war ein abgegrenztes Cluster der Experimente bei niedrigen Temperaturen (4 °C, 15 °C, 20 °C) zu erkennen. Innerhalb dieser Gruppe zeigten die Expressionsprofile bei 4 °C und 15 °C die größte Ähnlichkeit. Betrachtet man nur die Gene, die signifikant differentiell exprimiert sind ( $\log_2\text{FC} \geq 1,5$  und  $p\text{-Wert} < 0,05$ ), bleibt die temperaturabhängige Gruppierung der Experimente erhalten (Abbildung 23 B).



**Abbildung 23:** Differenzielle (A) und signifikant differentielle (B) Expression jedes Gens bei 4 °C, 15 °C, 20 °C und 42 °C

Die Reihenfolge der Gene entspricht der Position auf den Chromosomen. **A** Induzierte Gene sind rot, reprimierte Gene grün und nicht differentiell regulierte Gene gelb dargestellt. **B** Signifikant induzierte Gene sind rot ( $\log_2\text{FC} \geq 1,5$  und  $p\text{-Wert} < 0,05$ ), signifikant reprimierte Gene grün ( $\log_2\text{FC} \leq -1,5$  und  $p\text{-Wert} < 0,05$ ) und nicht differentiell regulierte Gene gelb dargestellt.

Volcano Plots wurden erstellt, um die Verteilung der differentiell exprimierten Gene bei den verschiedenen Temperaturen darzustellen (Abbildung 24). Außerdem ermöglicht diese Darstellung die schnelle Identifikation von Expressionsänderungen innerhalb eines Gensatzes durch Kombination des statistischen Tests (angepasster  $p\text{-Wert}$ ) mit der  $\log_2\text{FC}$ . Nur Gene, die eine signifikante differentielle Expression ( $p < 0,05$  und  $\log_2\text{FC} \geq 1,5$ ) zeigten, wurden im Volcano Plot rot dargestellt. Alle Gene, die entweder nicht signifikant und/oder nicht differentiell exprimiert wurden, wurden im Volcano Plot blau dargestellt. Die Anzahl und der Anteil der differentiell regulierten sowie davon induzierten und reprimierten Gene sind in Tabelle 16 zusammengefasst. Bei 20 °C waren 0,4 % ( $n = 19$ ) der Gene signifikant differentiell exprimiert. Bei 4 °C zeigten 4,0 % ( $n = 193$ ) und bei 42 °C 13,0 % ( $n = 625$ ) der Gene eine signifikante Expressionsveränderung gegenüber 37 °C. Der höchste Anteil an regulierten Genen wurde bei 15 °C mit 13,3 % ( $n = 639$ ) beobachtet. Die Inkubation bei 15 °C und 42 °C führte zu annähernd ausgeglichenen Expressionsmustern in Hinblick auf die Anzahl induzierter und reprimierter



**Abbildung 24:** Volcano Plots der normalisierten Genexpression

Aufgetragen sind die normalisierten  $\log_2FC$  aller Gene (x-Achse) bei den Temperaturen 4 °C (A), 15 °C (B), 20 °C (C) und 42 °C (D) gegen die  $-\log_{10}$  des p-Wertes (y-Achse). Rot dargestellt sind Gene mit signifikanter und  $\geq 1,5$  bzw.  $\leq -1,5$   $\log_2FC$ . Alle nicht-signifikant exprimierten Gene und/oder Gene mit geringerer differentieller Expression sind blau dargestellt.

Gene (Abbildung 24 B und D und vgl. Abbildung 27 B und Abbildung 29 in den Abschnitten 3.3.8.1 und 3.3.8.3). Dagegen waren bei 20 °C 73,7 % der regulierten Gene ( $n = 14$ ) signifikant reprimiert (Abbildung 24 C und vgl. Abbildung 28 in Abschnitt 3.3.8.2), wohingegen bei 4 °C 78,2 % der Gene ( $n = 151$ ) signifikant induziert waren (Abbildung 24 A und vgl. Abbildung 27 A in Abschnitt 3.3.8.1).

**Tabelle 16:** Anzahl und Anteil der differentiell exprimierten Gene insgesamt und der davon reprimierten bzw. induzierten Gene

Berücksichtigt sind Gene mit  $\log_2FC \geq 1,5$  bzw.  $\leq -1,5$  und  $p < 0,05$ . Der Anteil bezieht sich auf die Anzahl der auf dem Microarray vertretenen Gene ( $n = 4820$ ).

Inkubations- temperatur	differentiell reguliert		davon induziert		davon reprimiert	
4 °C	193	4,0 %	151	78,2 %	42	21,8 %
15 °C	639	13,3 %	361	56,5 %	278	43,5 %
20 °C	19	0,4 %	5	26,3 %	14	73,7 %
42 °C	625	13,0 %	333	53,3 %	292	46,7 %

Ordnet man die differentiell exprimierten Gene nach dem Chromosom, auf dem sie codiert sind, ergibt sich ein höherer Anteil regulierter Gene für das kleine Chromosom (Chromosom 2) bei den Inkubationstemperaturen 15 °C und 42 °C (Tabelle 17). Bei 4 °C war ein höherer Anteil auf Chromosom 1 differentiell reguliert, wohingegen bei 20 °C ein nahezu gleicher Anteil auf beiden Chromosomen differentiell exprimiert war. Das Verhältnis von Induktion und Repression ist i. d. R. für beide Chromosomen gleich. Nur bei 42 °C ist der Anteil induzierter Gene auf Chromosom 1 niedriger als auf Chromosom 2.

**Tabelle 17:** Anzahl und Anteil der differentiell exprimierten Gene je Chromosom

Berücksichtigt sind Gene mit  $\log_2FC \geq 1,5$  bzw.  $\leq -1,5$  und  $p < 0,05$ . Der Anteil bezieht sich auf die jeweilige Anzahl der auf dem Microarray vertretenen Gene pro Chromosom (3073 von 3080 Genen von Chromosom 1 und 1747 von 1752 Genen von Chromosom 2).

Inkubations- temperatur	Chromosom 1						Chromosom 2					
	reguliert		induziert		reprimiert		reguliert		induziert		reprimiert	
4 °C	142	4,6 %	116	3,8 %	26	0,8 %	51	2,9 %	35	2,0 %	16	0,9 %
15 °C	385	12,5 %	214	7,0 %	171	5,6 %	254	14,5 %	147	8,4 %	107	6,1 %
20 °C	12	0,4 %	3	0,1 %	9	0,3 %	7	0,4%	2	0,1 %	5	0,3 %
42 °C	350	11,4 %	146	4,8 %	204	6,6 %	275	15,7 %	187	10,7 %	88	5,0 %

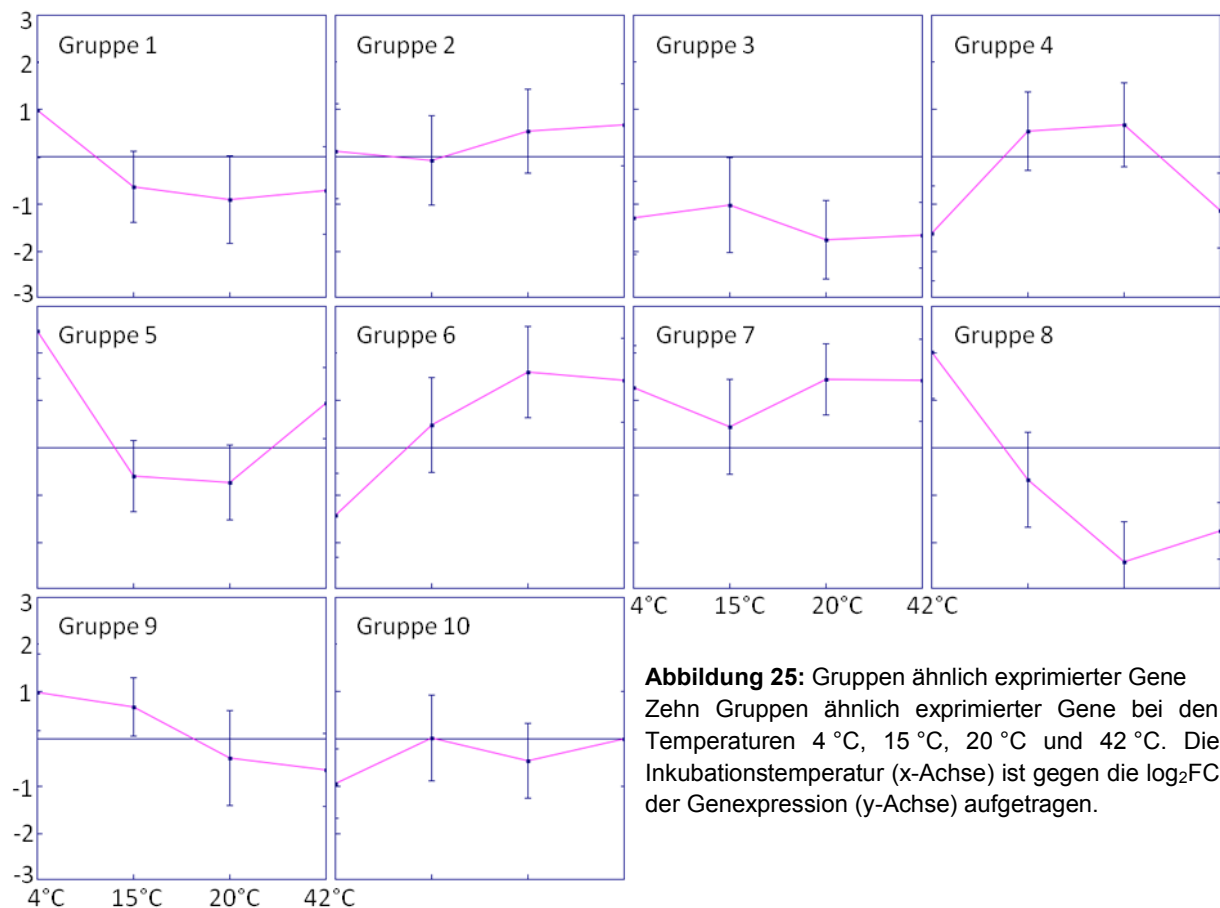
### 3.3.7 Vergleich der Genexpression bei 4 °C, 15 °C, 20 °C und 42 °C

Vergleicht man die Gene hinsichtlich der Art ihrer Regulation bei allen Temperaturen, konnten verschiedene Gruppen mit ähnlicher Regulation identifiziert werden (Abbildung 25).

In einer Gruppe waren die Gene bei niedrigen Temperaturen reprimiert und bei hohen Temperaturen induziert (Abbildung 25, Gruppe 6). Darin enthalten waren z. B. Gene, die für die klassischen Hitzeschock-Proteine (HSP) GroEL und GroES codieren.

Gegensätzlich dazu waren die Gene der klassischen Kälteschock-Proteine (CSP) in einer Gruppe enthalten, die bei niedrigen Temperaturen induziert und bei hohen Temperaturen reprimiert war (Abbildung 25, Gruppen 1, 8 und 9).

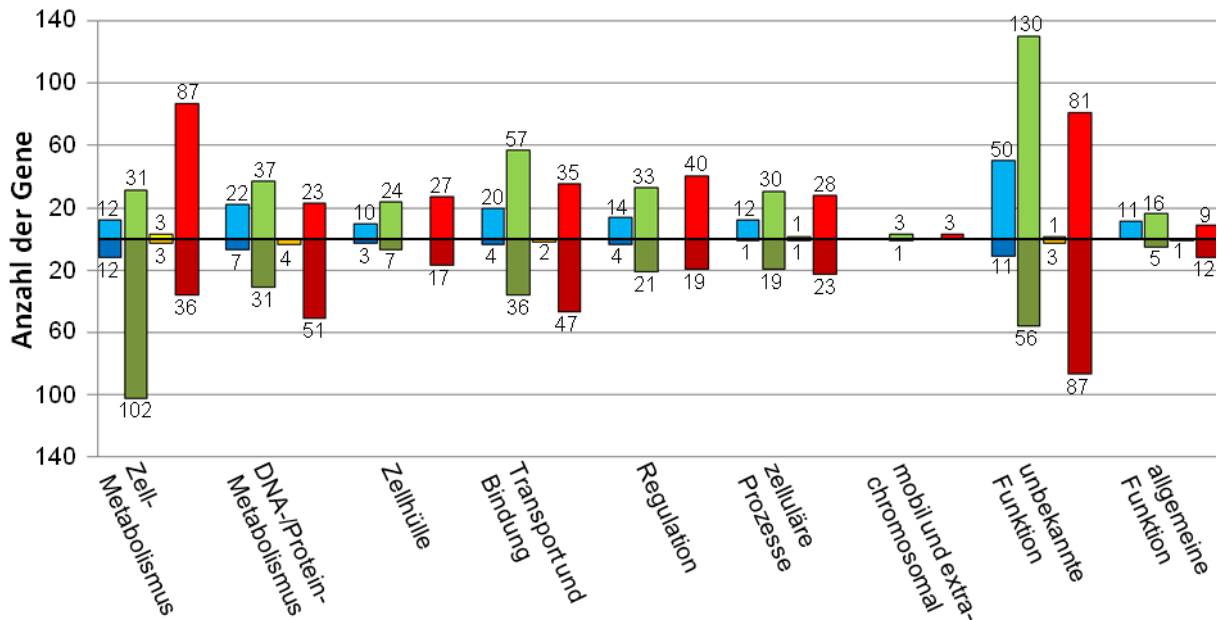
Gegensätzliche Muster zeigen auch die Gene der Gruppen 4 und 5: Diese waren bei den extremen Temperaturen 4 °C und 42 °C reprimiert und bei 15 °C und 20 °C induziert (Abbildung 25, Gruppe 4) bzw. bei den Temperaturen 4 °C und 42 °C induziert und bei 15 °C und 20 °C reprimiert (Abbildung 25, Gruppe 5).



**Abbildung 25:** Gruppen ähnlich exprimierter Gene  
Zehn Gruppen ähnlich exprimierter Gene bei den Temperaturen 4 °C, 15 °C, 20 °C und 42 °C. Die Inkubationstemperatur (x-Achse) ist gegen die  $\log_2FC$  der Genexpression (y-Achse) aufgetragen.

### 3.3.8 Genexpression bei den verschiedenen Temperaturen

Die Gene wurden ihrer Funktion entsprechend neun verschiedenen Kategorien zugeordnet: „Zell-Metabolismus“, „DNA-/Protein-Metabolismus“, „Zellhülle“, „Transport und Bindung“, „Regulation“, „zelluläre Prozesse“, „mobil und extrachromosomal“, „unbekannte Funktion“ und „allgemeine Funktion“ (vgl. Tabelle S2 hinterlegt auf dem Server des Instituts für Lebensmittelhygiene). Die Anzahl der Gene, geordnet nach Kategorien, die bei den untersuchten Temperaturen signifikant differentiell exprimiert waren, ist in Abbildung 26 und Tabelle 18 dargestellt.



**Abbildung 26:** Analyse der Genexpression nach funktionaler Annotation

Die Gene sind nach ihrer Funktion und der Inkubationstemperatur sortiert. Nur signifikant ( $p < 0,05$ ) regulierte Gene mit einer  $\geq 1,5$ -fachen differentiellen Expression sind dargestellt. Einfärbung nach Temperatur, dabei markiert der helle Ton induzierte und der dunkle Ton reprimierte Gene: 4 °C blau, 15 °C grün, 20 °C gelb und 42 °C rot.

**Tabelle 18:** Anzahl der Gene pro Kategorie mit signifikant differentieller Expression

Kategorie	4 °C		15 °C		20 °C		42 °C	
	↑	↓	↑	↓	↑	↓	↑	↓
Zell-Metabolismus	12	12	31	102	3	3	87	36
DNA-/Protein-Metabolismus	22	7	37	31	0	4	23	51
Zellhülle	10	3	24	7	0	0	27	17
Transport und Bindung	20	4	57	36	0	2	35	47
Regulation	14	4	33	21	0	0	40	19
zelluläre Prozesse	12	1	30	19	1	1	28	23
mobil und extrachromosomal	0	0	3	1	0	0	3	0
unbekannte Funktion	50	11	130	56	1	3	81	87
allgemeine Funktion	11	0	16	5	0	1	9	12

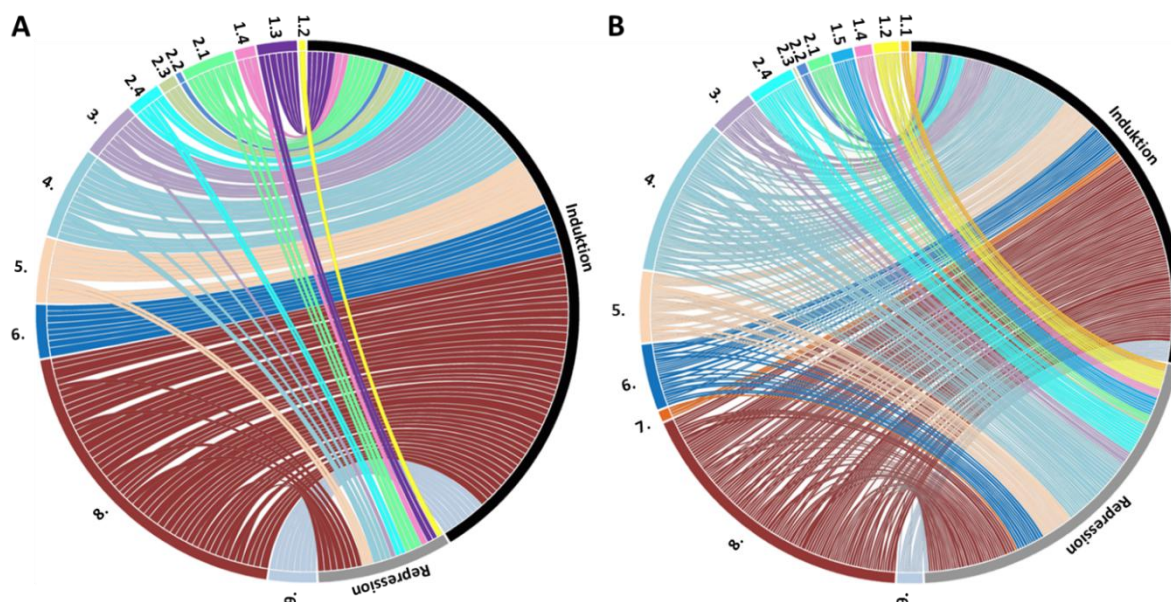
↑ induziert, ↓ reprimiert

#### 3.3.8.1 Genexpression bei 4 °C und 15 °C

Die Induktion und Repression der Gene bei 4 °C ist in Abbildung 27 A graphisch dargestellt.

Rund 32 % ( $n = 61$ ) der 193 durch Kälte (4 °C) induzierten Gene waren der Kategorie „unbekannte Funktion“ zugeordnet. Bei 4 °C waren Gene der folgenden funktionalen Kategorien induziert: „allgemeine Funktion“ ( $n = 11$ ), „zelluläre Prozesse“ ( $n = 12$ ), „Regulation“ ( $n = 14$ ), „Transport und Bindung“ ( $n = 20$ ), „Zellhülle“ ( $n = 10$ ), „DNA-/Protein-Metabolismus“ ( $n = 22$ ) und „Zell-Metabolismus“





**Abbildung 27:** Circos Plots der signifikant differentiell exprimierten Gene bei 4 °C (A) und 15 °C (B) von *V. parahaemolyticus*

Die Verbindungen zeigen die Richtung der Regulation in jeder funktionalen Gruppe. Zahlen stehen für funktionalen Gruppen (1.1 Aminosäure-Biosynthese, 1.2 Zentraler intermediärer Metabolismus, 1.3 Energie-Metabolismus, 1.4 Fettsäure und Phospholipid-Metabolismus, 1.5 Purine, Pyrimidine, Nukleoside und Nukleotide, 2.1 DNA-Metabolismus, 2.2 Transkription, 2.3 Protein-Synthese, 2.4 Protein-Abbau, 3. Zellhülle, 4. Transport und Bindung, 5. Regulation, 6. zelluläre Prozesse, 7. mobil und extrachromosomal, 8. unbekannte Funktion, 9. allgemeine Funktion). Gengruppen sind entsprechend ihrer funktionalen Gruppe eingefärbt. Der schwarze Balken markiert induzierte Gene und der graue Balken reprimierte Gene.

(n = 12). Sieben (58 %) der induzierten Gene der Kategorie „Zell-Metabolismus“ waren dem Energie-Metabolismus zugeordnet.

Eine Repression wurde bei Genen folgender Kategorien beobachtet: „unbekannte Funktion“ (n = 11, entspricht 26 %), „zelluläre Prozesse“ (n = 1), „Regulation“ (n = 4), „Transport und Bindung“ (n = 4), „Zellhülle“ (n = 3), „DNA-/Protein-Metabolismus“ (n = 7) und „Zell-Metabolismus“ (n = 12). Von diesen reprimierten und dem „Zell-Metabolismus“ zugeordneten Genen waren 5 (42 %) dem Energie-Metabolismus zugeordnet. Die fünf am stärksten induzierten und reprimierten Gene bei 4 °C sind in Tabelle 19 gezeigt.

Bei 15 °C waren insgesamt 639 Gene differentiell exprimiert, deren Induktion und Repression ist in Abbildung 27 B graphisch dargestellt.

Rund 36 % (n = 130) der 361 kälteinduzierten Gene waren der Kategorie „unbekannte Funktion“ zugeordnet. Induktion konnte bei Genen der folgenden Kategorien beobachtet werden: „allgemeine Funktion“ (n = 16), „mobil und extrachromosomal“ (n = 3), „zelluläre Prozesse“ (n = 30), „Regulation“ (n = 33), „Transport und Bindung“ (n = 57), „Zellhülle“ (n = 24), „DNA-/Protein-Metabolismus“ (n = 37) und „Zell-Metabolismus“ (n = 31). Von diesen induzierten Genen der Kategorie „Zell-Metabolismus“ gehörten 10 (32 %) dem Energie-Metabolismus an.

Reprimiert waren Gene der folgenden Kategorien: „unbekannte Funktion“ (n = 56, entspricht 20 %), „allgemeine Funktion“ (n = 5), „mobil und extrachromosomal“ (n = 1), „zelluläre Prozesse“ (n = 19), „Regulation“ (n = 21), „Transport und Bindung“ (n = 36), „Zellhülle“ (n = 7), „DNA-/Protein-Metabolismus“ (n = 31) und „Zell-Metabolismus“ (n = 102). 64 (63 %) reprimierte Gene der Kategorie „Zell-Metabolismus“ waren dem Energie-Metabolismus zugeordnet. Tabelle 19 zeigt die fünf Gene mit der stärksten Induktion und Repression bei 15 °C.

**Tabelle 19:** Fünf Gene mit der stärksten Repression und Induktion bei 4 °C und 15 °C  
Gefärbte Boxen markieren  $\geq 1,5$ -fache differenzielle Expressionsraten (rot Induktion, grün Repression).

Temperatur	Gen ID	Gen	Produkt	Log <sub>2</sub> FC
4 °C	VP1717		ABC-Typ multidrug	-3,66
	VP2024		hypothetisches Protein	-3,27
	VP0502		hypothetisches Protein	-2,83
	VP2264		hypothetisches Protein	-2,80
	VP2445		put. Fett-Transportprotein	-2,78
	VP1889	<i>cspA</i>	Kälteschock transkr. Reg.	4,06
	VP2889		hypothetisches Protein	4,15
	VP3030		hypothetisches Protein	4,46
	VPA1291		hypothetisches Protein	4,74
	VP1888		hypothetisches Protein	4,86
15 °C	VP2362	<i>ompK</i>	OmpK Vorläufer	-6,10
	VPA0230		put. Zucker- Phosphotransferase	-6,05
	VPA1084	<i>rbsB</i>	D-Ribose Transporter Untereinheit	-5,48
	VPA0231		Phosphotransferase	-5,42
	VPA0229	<i>ulaA</i>	Ascorbat-spezifisches PTS	-5,25
	VP1889	<i>cspA</i>	Kälteschock transkr. Reg.	4,41
	VPA1413		hypothetisches Protein	4,44
	VPA1289	<i>cspA</i>	Kälteschock transkr. Reg.	4,86
	VP1888		hypothetisches Protein	6,55
	VP1890	<i>vacB</i>	VacB/RNase R	7,01

put., putative(s); transkr. Reg., transkriptioneller Regulator; PTS, Phosphotransferase-System

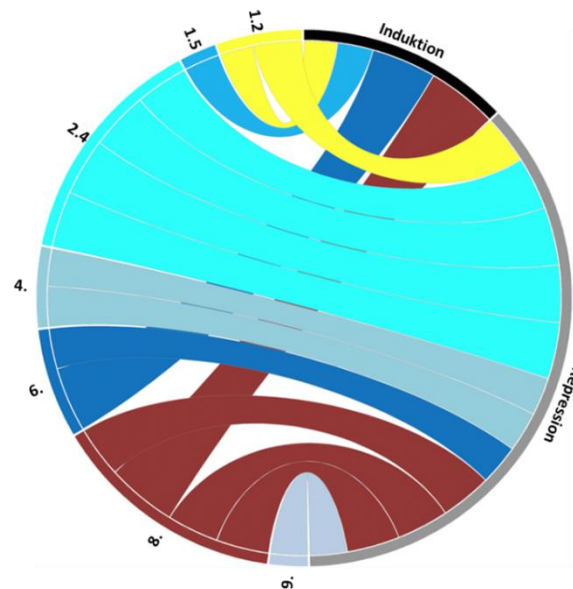
Bei 4 °C und/oder 15 °C waren viele Gene gemäß ihrer Funktion – der Adaptation an atypische Umweltbedingungen – induziert. Die transkriptionellen Regulatoren VP0034, VP0059, VP0713, VP1391, VP1676, VP1765, VPA0214, VPA1219 und VPA1289 waren bei beiden Temperaturen induziert. Außerdem waren Gene zur DNA-Reparatur, wie z. B. ein DNA-Mismatch-Repair-Protein (VP0518), das durch Schäden an der DNA induzierte Protein F (VP2943), die DNA-Polymerase II (VP1946), die DNA-Integrase (VP1071) und DNA-Helikasen (VP1052, VPA1393, VPA1699), induziert. Die RNase R war bei 15 °C induziert. Des Weiteren zeigten Gene der Gencluster VP2232-61 und VP0770-86, die mit der Produktion und dem Erhalt der polaren Flagelle assoziiert sind, eine Induktion bei niedrigen Temperaturen. Zusätzlich war das Cobalamin-Synthese-Cluster *cobTSUC* (VP1304-07) induziert. Dagegen waren Gene eines Ribose-Transporters (VPA1082-87) und einer Fumarat-Reduktase (VP2840-43) bei 15 °C reprimiert.

### 3.3.8.2 Genexpression bei 20 °C

Bei 20 °C waren insgesamt 19 Gene reguliert. Die Induktion und Repression der Gene bei 20 °C ist in Abbildung 28 graphisch dargestellt.

Induktion konnte bei fünf Genen der folgenden Kategorien beobachtet werden: „zelluläre Prozesse“ (n = 1), „Zell-Metabolismus“ (n = 3) und „unbekannte Funktion“ (n = 1).

Reprimiert waren Gene der folgenden Kategorien: „allgemeine Funktion“ (n = 1), „zelluläre Prozesse“ (n = 1), „Transport und Bindung“ (n = 2), „DNA-/Protein-Metabolismus“ (n = 4), „Zell-Metabolismus“ (n = 3) und „unbekannte Funktion“ (n = 3). Die fünf am stärksten induzierten und reprimierten Gene sind in Tabelle 20 gezeigt.



**Abbildung 28:** Circos Plot der signifikant differentiell exprimierten Gene bei 20 °C von *V. parahaemolyticus*. Die Verbindungen zeigen die Richtung der Regulation in jeder funktionalen Gruppe. Zahlen stehen für funktionalen Gruppen (1.2 Zentraler intermediärer Metabolismus, 1.5 Purine, Pyrimidine, Nucleoside und Nucleotide, 2.4 Protein-Abbau, 4. Transport und Bindung, 6. zelluläre Prozesse, 8. unbekannte Funktion, 9. allgemeine Funktion). Gengruppen sind entsprechend ihrer funktionalen Gruppe eingefärbt. Der schwarze Balken markiert induzierte Gene und der graue Balken reprimierte Gene.

**Tabelle 20:** Fünf Gene mit der stärksten Repression und Induktion bei 20 °C. Gefärbte Boxen markieren  $\geq 1,5$ -fache differenzielle Expressionsraten (rot Induktion, grün Repression).

Gen ID	Gen	Produkt	Log <sub>2</sub> FC
VPA0611	<i>ackA</i>	Acetat-Kinase	-4,60
VPA1193	<i>pepT</i>	Peptidase T	-3,92
VP2448		put. Protease	-3,85
VP2447		put. Protease	-3,81
VP0990		hypothetisches Protein	-3,56
VPA0071		put. Alkohol-Dehydrogenase	2,08
VP1721		Aminotransferase	2,25
VPA1159	<i>guaC</i>	Guanosion-Oxidoreductase	2,39
VP1889	<i>cspA</i>	Kälteschock transkr. Reg.	4,38
VP1888		hypothetisches Protein	4,75

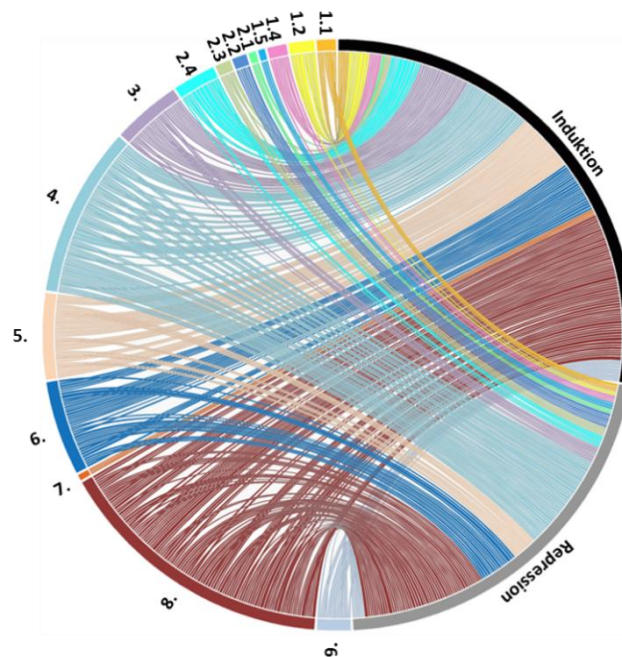
put., putative; transkr. Reg., transkriptioneller Regulator

### 3.3.8.3 Genexpression bei 42 °C

Die Induktion und Repression der 625 differentiell regulierten Gene bei 42 °C ist in Abbildung 29 graphisch dargestellt.

Zusätzlich zu Genen der Kategorie „unbekannte Funktion“ reagierten Gene der Kategorie „Zell-Metabolismus“ besonders auf den Temperaturanstieg. Induziert waren Gene der folgenden Kategorien: „allgemeine Funktion“ (n = 9), „mobil und extrachromosomal“ (n = 3), „zelluläre Prozesse“ (n = 28), „Regulation“ (n = 40), „Transport und Bindung“ (n = 35), „Zellhülle“ (n = 27), „DNA-/Protein-Metabolismus“ (n = 23) und „Zell-Metabolismus“ (n = 87). 56 % der induzierten Gene (n = 49) der Kategorie „Zell-Metabolismus“ waren dem Energie-Metabolismus zugeordnet. Rund 24 % (n = 81) der 333 induzierten Gene gehörten zur Kategorie „unbekannte Funktion“.

Eine Repression zeigten Gene der folgenden Kategorien: „allgemeine Funktion“ (n = 12), „zelluläre



**Abbildung 29:** Circos Plot der signifikant differentiell exprimierten Gene bei 42 °C von *V. parahaemolyticus*

Die Verbindungen zeigen die Richtung der Regulation in jeder funktionalen Gruppe. Zahlen stehen für funktionalen Gruppen (1.1 Aminosäure-Biosynthese, 1.2 Zentraler intermediärer Metabolismus, 1.4 Fettsäure und Phospholipid-Metabolismus, 1.5 Purine, Pyrimidine, Nucleoside und Nucleotide, 2.1 DNA-Metabolismus, 2.2 Transkription, 2.3 Protein-Synthese, 2.4 Protein-Abbau, 3. Zellhülle, 4. Transport und Bindung, 5. Regulation, 6. zelluläre Prozesse, 7. mobil und extrachromosomal, 8. unbekannte Funktion, 9. allgemeine Funktion). Gengruppen sind entsprechend ihrer funktionalen Gruppe eingefärbt. Der schwarze Balken markiert induzierte Gene und der graue Balken reprimierte Gene.

Prozesse“ (n = 23), „Regulation“ (n = 19), „Transport und Bindung“ (n = 47), „Zellhülle“ (n = 17), „DNA-/Protein-Metabolismus“ (n = 51), „Zell-Metabolismus“ (n = 36) und „unbekannte Funktion“ (n = 87, entspricht 30 %). Von den reprimierten und dem „Zell-Metabolismus“ zugehörigen Genen waren sechs (17 %) am Energie-Metabolismus beteiligt.

Durch die Temperaturerhöhung waren Gene induziert, die an vielfältigen Prozessen beteiligt sind, z. B. an der Synthese und dem Metabolismus von Aminosäuren und Aminen, am Elektronen-Transfer, an der Chemotaxis, am Transport und Metabolismus von Kohlenhydraten, an der Biosynthese und dem Abbau von Fettsäuren sowie an der Fermentation. Zusätzlich waren besonders Gene induziert, die am Zucker-Metabolismus beteiligt sind, wie z. B. die Gene zum Metabolismus und Transport von Arabinose (VPA1671-78) sowie Mannose und Glucoronat (VPA1702-09). Auch waren die Gencluster *ga*/MKTE (VP2397-400) und *glp*QTFKD (VP2381-88) induziert, die mit dem Zucker- bzw. Energie-Metabolismus assoziiert sind. Gene der Biosynthese von Aminosäuren der Pyruvat-Familie *ilv*BNEDA (VP3058-62) und *leu*DCBA (VP0342-46) sowie Peptid-ABC-Transporter (VP2381-88) waren ebenfalls induziert. Außerdem zeigten Gene, die für Schutzproteine codieren, wie z. B. *gro*ES (VPA0286, VP2851) und *gro*EL (VPA0287, VP2852), eine Induktion. Eine Gruppe von Genen auf dem Chromosom 2 (VPA0915-1042) mit unterschiedlichen Funktionen wie „zelluläre Prozesse“ (n = 23), „Energie-Metabolismus“ (n = 18), „Transport und Bindung“ (n = 14), „Regulation“ (n = 14) und „unbekannte Funktion“ (n = 36) zeigte eine Induktion bei 42 °C. In Tabelle 21 sind die fünf Gene mit der stärksten Induktion und Repression bei 42 °C gezeigt.



**Tabelle 21:** Fünf Gene mit der stärksten Repression und Induktion bei 42 °C

Gefärbte Boxen markieren  $\geq 1,5$ -fache differenzielle Expressionsraten (rot Induktion, grün Repression).

Gen ID	Gen	Produkt	Log <sub>2</sub> FC
VP0712		hypothetisches Protein	-5,64
VPA1424		PTS	-5,42
VP0053		hypothetisches Protein	-5,10
VPA1289	<i>cspA</i>	Kälteschock transkr. Reg.	-4,98
VPA1425	<i>manA</i>	Mannose-6-phosphat-isomerase	-4,89
VP0084		hypothetisches Protein	5,57
VP2479		Peptid ABC Transporter	5,57
VPA0505		put. Hydrolase	6,13
VPA0286	<i>groES</i>	Co-Chaperonin GroES	6,24
VPA0287	<i>groEL</i>	Chaperonin GroEL	6,66

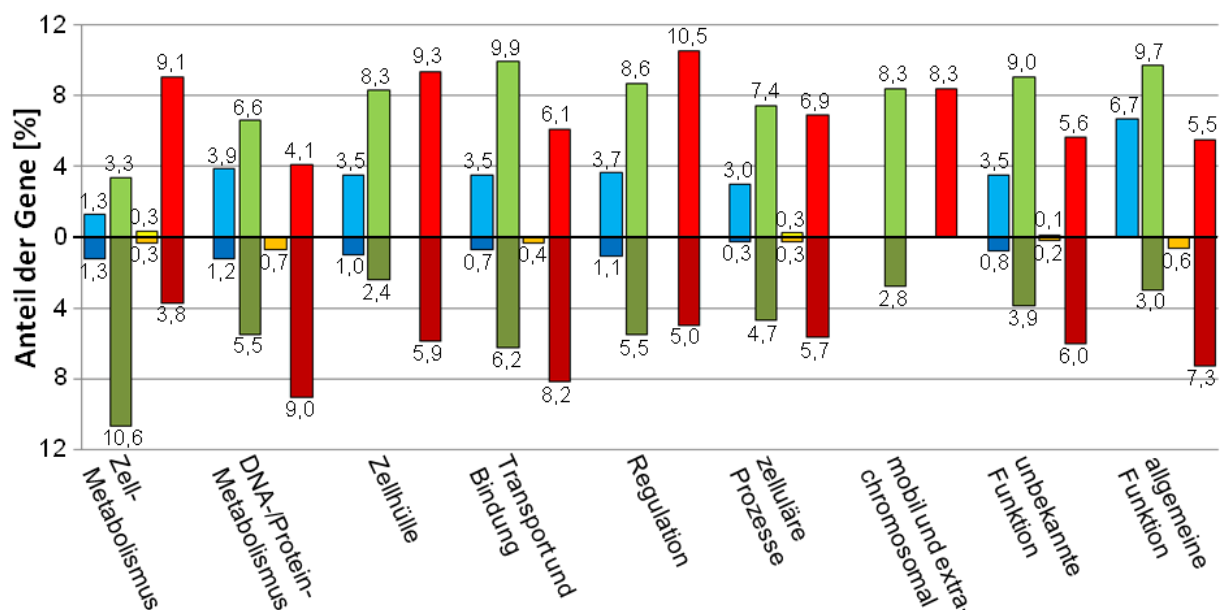
PTS, Phosphotransferase-System; transkr. Reg., transkriptioneller Regulator; put., putative

### 3.3.9 Gegensätzliche Expression von Genen bei Hitze und Kälte

Einige Gruppen von Genen zeigten sowohl Induktion als auch Repression bei den untersuchten Temperaturen. Gene der hsp60-Familie (*groESEL*: VP2851-52, VPA0286-87) waren bei 4 °C, 15 °C und 20 °C reprimiert, während sie bei 42 °C eine starke Induktion zeigten. Die Gene der hsp70-Familie (*dnaK*: VP0653, *dnaJ*: VP0654) waren dagegen nur bei 15 °C signifikant reprimiert. Im Gegensatz dazu waren CSPs, wie z. B. *cspA* (VPA1289-1291 und VP1889), bei 4 °C und 15 °C induziert und bei 42 °C reprimiert.

### 3.3.10 Identifikation von differentiell regulierten Prozessen

Um biologische Prozesse oder Stoffwechselwege zu identifizieren, die bei den verschiedenen Temperaturen eine vermehrte Induktion oder Repression zeigen, wurde zunächst der Anteil differentiell regulierter Gene pro Kategorie bestimmt (Abbildung 30 und Tabelle 22).

**Abbildung 30:** Anteil der differentiell regulierten Gene pro funktionaler Kategorie.

Die Gene sind nach ihrer Funktion und der Inkubationstemperatur sortiert. Nur signifikant ( $p < 0,05$ ) regulierte Gene mit einer  $\geq 1,5$ -fachen differentiellen Expression sind dargestellt. Einfärbung nach Temperatur, dabei markiert der helle Ton induzierte und der dunkle Ton reprimierte Gene: 4 °C blau, 15 °C grün, 20 °C gelb und 42 °C rot.

**Tabelle 22:** Anteil (%) der signifikant differentiell exprimierten Gene pro Kategorie

Kategorie	4 °C		15 °C		20 °C		42 °C	
	↑	↓	↑	↓	↑	↓	↑	↓
Zell-Metabolismus	1,3	1,3	3,3	10,6	0,3	0,3	9,1	3,8
DNA-/Protein-Metabolismus	3,9	1,2	6,6	5,5	0	0,7	4,1	9,0
Zellhülle	3,5	1,0	8,3	2,4	0	0	9,3	5,9
Transport und Bindung	3,5	0,7	9,9	6,2	0	0,4	6,1	8,2
Regulation	3,7	1,1	8,6	5,5	0	0	10,5	5,0
zelluläre Prozesse	3,0	0,3	7,4	4,7	0,3	0,3	6,9	5,7
mobil und extrachromosomal	0	0	8,3	2,8	0	0	8,3	0
unbekannte Funktion	3,5	0,8	9,0	3,9	0,1	0,2	5,6	6,0
allgemeine Funktion	6,7	0	9,7	3,0	0	0,6	5,5	7,3

↑ induziert, ↓ reprimiert

Bei 20 °C war nur ein geringer Anteil der Gene differentiell reguliert (maximal 0,7 % der Gene der Kategorie „DNA-/Protein-Metabolismus“). Auch bei 4 °C war ein vergleichsweise kleiner Anteil der Gene aller Kategorien reguliert. In den meisten Kategorien (7 von 9) konnte eine Induktion von mehr als 3 % der Gene beobachtet werden, dabei waren 6,7 % der Gene der Kategorie „allgemeine Funktion“ induziert. Die Repression lag in allen Kategorien zwischen 0 % und 1,3 %. Bei den Temperaturen 15 °C und 42 °C war ein deutlich höherer Anteil an Genen (bis zu 10,6 %) fast aller Kategorien induziert oder reprimiert. Meist überwog entweder Induktion oder Repression. So war bei 15 °C in acht von neun Kategorien ein höherer Anteil (6,6 - 9,9 %) der Gene induziert, wobei in der Kategorie „DNA-/Protein-Metabolismus“ der Unterschied nur 1,1 % betrug. Nur in der Kategorie „Zell-Metabolismus“ überwog der Anteil reprimierter Gene (10,6 %). Bei 42 °C zeigte sich ein eher ausgeglichenes Verhältnis zwischen Induktion und Repression: In fünf Kategorien überwog Induktion und in vier Kategorien Repression. Allerdings waren die Unterschiede zwischen Induktion und Repression in den Kategorien „zelluläre Prozesse“ (1,2 %) und „unbekannte Funktion“ (0,4 %) gering. Insgesamt waren zwischen 4,1 % und 10,5 % der Gene einer Kategorie induziert, wohingegen zwischen 0 % und 9,0 % der Gene reprimiert waren. Über 9 % der Gene waren in den Kategorien „Zell-Metabolismus“, „Zellhülle“ und „Regulation“ induziert.

### 3.3.10.1 DAVID-Analyse

Neben der Zuordnung zu funktionalen Kategorien sind viele Gene auch in sogenannten DAVID-Kategorien eingeordnet. Diese Kategorien repräsentieren spezifische Prozesse oder beinhalten Gene, die für Produkte mit bestimmten Eigenschaften codieren. Die identifizierten Kategorien, Anzahl und Anteil der enthaltenen differentiell regulierten Gene sowie der p-Wert (Fisher-Test,  $p < 0,05$ ) sind in Tabelle A9 im Anhang angegeben. Dabei können die gleichen Gene in mehreren Kategorien vertreten sein.

Bei 4 °C wurden elf DAVID-Genkategorien mit insgesamt 186 Genen identifiziert, bei denen statistisch ein höherer Anteil differenziell reguliert war. Neun dieser Kategorien waren mit Transkription, DNA-Bindung und Regulation des RNA-Metabolismus assoziiert. Die beiden anderen Kategorien waren ABC-Transporter bzw. die Genprodukte waren durch Transmembran-Domänen charakterisiert.

Bei 15 °C wurden 32 DAVID-Genkategorien mit insgesamt 472 Genen identifiziert, die eine statistisch vermehrte differentielle Expression zeigten. Davon waren zehn Kategorien mit dem Transport bzw. Transportern assoziiert. Die Kategorien „integrale Membran-Komponenten“ und

„intrinsische Membran-Komponenten“ waren mit jeweils 69 Genen (11,6 %) die Gruppen mit den meisten differentiell exprimierten Genen. Außerdem waren neun Kategorien mit dem Metabolismus assoziiert.

Bei 20 °C wurden ausschließlich DAVID-Kategorien identifiziert, die mit dem Abbau von Peptiden und Proteinen assoziiert waren: „Peptidase“ (15,8 %), „Proteasen“, „Peptidase-Aktivität“ und „Proteolyse“ (jeweils 21,1 %).

Bei 42 °C wurden 38 DAVID-Kategorien mit insgesamt 423 differentiell exprimierten Genen identifiziert. Davon waren z. B. neun Kategorien mit der Zellbewegung (Flagelle), acht mit metabolischen Prozessen und sechs Kategorien mit Prozessen assoziiert, die die RNA, DNA und Transkription betreffen. Außerdem waren drei Kategorien mit der Homöostase (Ionen, Kationen und chemische Homöostase) sowie zwei Kategorien mit Eisen-Siderophoren und dem Siderophor-Transport assoziiert.

### 3.3.11 Temperaturinduzierte Kreuzprotektion

Durch die verschiedenen Temperaturen wurden Gene induziert oder reprimiert, die an der Stressantwort auf temperaturunabhängige Stressoren beteiligt sein könnten. Diese Gene sind hinsichtlich der Stressantwort, an der sie beteiligt sind, in Tabelle 23 zusammengestellt.

Des Weiteren zeigten transkriptionelle Regulatoren des AraC-Typs (n = 5) und des LysR-Typs (n = 13) eine signifikante Expressionsänderung nach Hitze- und/oder Kältestress.

**Tabelle 23:** An der Stressantwort beteiligte differentiell exprimierte Gene  
Aufgeführt sind die Gene, die eine Induktion oder Repression bei einer oder mehreren Temperaturen zeigten ( $\log_2FC \geq 1,5$  bzw.  $\leq -1,5$  und  $p < 0,05$ ).

Gen	Produkt	Differentielle Regulation bei der Temperatur <sup>1</sup>
<b>Alternative Sigma-Faktoren</b>		
VP2553	RpoS	↑ 4 °C, 15 °C
VPA1690	RpoE	↑ 42 °C
<b>Osmotischer Stress</b>		
VPA1112-14	betABI	↑ 4 °C
VP1456	BCCT	↑ 15 °C; ↓ 42 °C
VP1723	BCCT	↑ 42 °C
VP1905	BCCT	↑ 15 °C
VPA1109-11	ProVWX	(↓ 42 °C)
VP1455	OmpA	↑ 42 °C
VPA1186	OmpA	↑ 42 °C
<b>Oxidativer Stress</b>		
VP2005	put. Thioredoxin	↑ 4 °C, 15 °C
VPA0453	KatG	↑ 42 °C
VPA0768	KatG	↑ 42 °C
VP2860	Superoxid-Dismutase	↓ 42 °C
<b>Säurestress</b>		
VP2890-91	Lysin-Decarboxylase Operon	↑ 15 °C
<b>Stress durch antimikrobielle Peptide</b>		
VP2473	RND-Typ Efflux Transporter	↑ 15 °C

↑, induziert; ↓, reprimiert; put., putatives

<sup>1</sup> Angaben in Klammern stehen für teils zutreffende Angabe

### 3.3.12 Temperaturabhängige Expression von Virulenz-Genen

Der Virulenz zugeordnete Gene zeigten keine einheitliche von den verschiedenen Temperaturen beeinflusste differentielle Expression. Allerdings zeigten einzelne Gene eine temperaturabhängige Induktion bzw. Repression. Die klassischen Pathogenitätsfaktoren mit signifikant differentieller Expression werden im Folgenden vorgestellt. Diese und weitere virulenzassoziierte Gene mit signifikant differentieller Regulation sind in Tabelle 24 zusammengestellt.

So zeigte das T3SS1 eine Repression bei 15 °C für *nosA* (VP1697). Das putative Chaperon VP1687 war bei 42 °C induziert. Ein Translokationsprotein (VP1675) zeigte eine Induktion bei 15 °C und das putative Translokationsprotein (VP1670) eine Induktion bei 42 °C.

**Tabelle 24:** An der Virulenz beteiligte differentiiell exprimierte Gene

Aufgeführt sind die Gene, die eine Induktion oder Repression bei einer oder mehreren Temperaturen zeigten ( $\log_2FC \geq 1,5$  bzw.  $\leq -1,5$  und  $p < 0,05$ ).

Gen	Produkt	Differentielle Regulation bei der Temperatur <sup>1</sup>
<b>Enzyme zum Abbau von Strukturen</b>		
VPA1670	put. Protease des Typs Collagenase	↓ 15 °C, 20 °C, 42 °C
VPA0714	Collagenase	↑ 15 °C
VPA0227	Alkalische Serin-Protease	↑ 42 °C
<b>Zelladhäsion</b>		
VP2409	PilF	↑ 15 °C, 42 °C
VP2410-13	Zelladhäsion	(↑ 42 °C)
VPA0721-30	Zelladhäsion	(↑ 15 °C, 42 °C)
<b>Peritriche Flagellen zum Schwärmen</b>		
VPA0261-75	Flagellen-Proteine	(↑ 42 °C)
VPA1532-57	Flagellen-Proteine	(↑ 15 °C; ↓ 15 °C; ↑ 42 °C)
<b>Quorum-Sensing</b>		
VP2516	OpaR	↓ 42 °C
<b>Eisen-Transport und -Akquirierung</b>		
VP0857-59	Fe <sup>2+</sup> -Transporter	↓ 15 °C, (↓ 20 °C)
VPA1438	Eisen-III-ABC-Transporter	↑ 4 °C, ↑ 15 °C
VPA1656-57	Vibrioferin-Fe <sup>3+</sup> -Rezeptor	↓ 42 °C
VPA1659	Komponente der Siderophor-Synthetase	↓ 42 °C
<b>T3SS1</b>		
VP1670	put. Translokationsprotein	↑ 42 °C
VP1675	Translokationsprotein	↑ 15 °C
VP1687	put. Chaperon	↑ 42 °C
VP1697	NosA	↓ 15 °C
<b>T3SS2</b>		
VPA1356	hypothetisches Protein	↓ 42 °C
<b>T6SS1</b>		
VP1391	put. Regulator	↑ 15 °C
VP1392	put. ClpA/B-Protease ClpB	↑ 42 °C
VP1393	BfdA	↓ 4 °C
VP1398	hypothetisches Protein	↑ 42 °C
<b>T6SS2</b>		
VPA1030	ImpG	↑ 42 °C
<b>Exotoxine</b>		
VP3048	put. Hämolyisin	↑ 4 °C, 15 °C; ↓ 42 °C
<b>Endotoxin</b>		
VP1745	Lipid A-Biosynthese Lauroyl-Acyltransferase	↑ 15 °C
VP2509	Lipid A-Biosynthese Lauroyl-Acyltransferase	↑ 15 °C; ↓ 42 °C

↑, induziert; ↓, reprimiert; put., putative(s)

<sup>1</sup> Angaben in Klammern stehen für teils zutreffende Angabe



Die Gene des T3SS2 zeigten mit einer Ausnahme keine signifikante differentielle Expression; nur das hypothetische Protein VPA1356 mit unbekannter Funktion war bei 42 °C reprimiert.

Einige Gene des T6SS1 zeigten eine signifikante differentielle Expression bei den untersuchten Temperaturen. So waren der putative Regulator VP1391 bei 15 °C und die putative ClpA/B-Protease *clpB* (VP1392) bei 42 °C induziert. Das Gen *bfdA* (VP1393) war bei 4 °C reprimiert. Ein hypothetisches Protein (VP1398) war bei 42 °C induziert.

Das Gen *impG* (VPA1030) des T6SS2 zeigte eine Induktion bei 42 °C.

VP3048, das für ein putatives Hämolysin codiert, war bei 4 °C und 15 °C induziert und bei 42 °C reprimiert. Weder *tdhA* (VPA1314) noch *tdhS* (VPA1378) oder das thermolabile Hämolysin codierende Gen (VPA0226) waren bei den untersuchten Bedingungen induziert oder reprimiert.

## 4 Diskussion

### 4.1 *Vibrio* spp. und *V. parahaemolyticus* in Lebensmitteln

Bei den 168 untersuchten Garnelen- und Krabbenerzeugnissen betrug die Prävalenz von *Vibrio* spp. 28 %. Verglichen mit Studien, bei denen Proben ähnlicher Lebensmittel hinsichtlich dem Vorhandensein dieser Spezies untersucht wurden, konnten hier insgesamt höhere Prävalenzen beobachtet werden: Bei in Deutschland getesteten Meeresfrüchten, Krusten- und Schalentieren lag die Prävalenz von *Vibrio* spp. bei 12,1 bis 19,5 % (LEHMACHER und HANSEN, 2007; MESSELHAUSSER *et al.*, 2010; SIEFFERT und STOLLE, 2002). Dagegen konnte bei Probenahmen in Garnelenfarmen Sri Lankas eine Prävalenz von 95,1 % beobachtet werden (KORALAGE *et al.*, 2012). Erklärt werden könnten diese Prävalenzunterschiede durch Unterschiede bezüglich der Probenzusammensetzung, wie z. B. des Anteils gegarter oder prozessierter Proben, verschiedener geographischer Herkunft, Salinität, Jahreszeit, untersuchter Spezies sowie hygienischer Standards bei Bearbeitung, Transport und Lagerung (ABD-ELGHANY und SALLAM, 2013; CROCI *et al.*, 2001). So ist u. a. davon auszugehen, dass in rohen und nicht-prozessierten Garnelen- und Krabbenerzeugnissen häufiger *Vibrio* spp. nachgewiesen werden können (MESSELHAUSSER *et al.*, 2010). Die Prävalenz von *Vibrio* spp. war in asiatischen Erzeugnissen deutlich höher als in den Proben anderer Herkunft. Übereinstimmend konnten KORALAGE (2011) und YANO *et al.* (2014) eine Prävalenz von 95,1 % bis 100 % in Garnelenfarmen Sri Lankas und Thailands beobachten.

Wie auch MESSELHAUSSER *et al.* (2010), LHAFI und KUHNE (2007), KORALAGE *et al.* (2012) und RIPABELLI *et al.* (1999) zeigten, konnte in den meisten *Vibrio* spp.-positiven Proben (61,7 %) mehr als eine *Vibrio* spp. nachgewiesen werden. Dies spiegelt die natürliche Co-Existenz der verschiedenen Spezies wider (DETER *et al.*, 2010a). Der Anteil von *V. parahaemolyticus* an den *Vibrio*-positiven Proben war mit 46,8 % im gleichen Rahmen wie bei ähnlichen Untersuchungen (6,3 bis 82,9 %), die in Deutschland durchgeführt wurden (LEHMACHER und HANSEN, 2007; MESSELHAUSSER *et al.*, 2010; SIEFFERT und STOLLE, 2002).

In Lebensmittel- und Umweltproben ist der Anteil von *tdh*<sup>+</sup>- und/oder *trh*<sup>+</sup>-*V. parahaemolyticus* mit 1 % bis 2 % gering (HONDA und IIDA, 1993; MESSELHAUSSER *et al.*, 2010). Die hier untersuchten *V. parahaemolyticus*-Isolate besaßen dagegen zu 48,4 % die Gene *trh* bzw. *tdh*/*trh*. Die Prävalenz pathogener *V. parahaemolyticus* in den untersuchten Proben lag bei 6,0 %. Dabei stammten acht der *trh*<sup>+</sup>- und *tdh*<sup>+</sup>/*trh*<sup>+</sup>-Proben aus dem südostasiatischen Raum, eine aus Ecuador und eine Probe war unbekannter Herkunft. Demnach konnten in keiner der aus Europa bzw. dem Atlantik stammenden Proben die Toxingene nachgewiesen werden. SUFFREDINI *et al.* (2014) konnten zeigen, dass der Anteil an pathogenen *V. parahaemolyticus* in Regionen mit höheren Temperaturen, die über das Jahr gemittelt wurden, vergleichsweise höher ist. Für *Vibrio* spp. – inkl. *V. parahaemolyticus* – ist bekannt, dass Pathogenitätsfaktoren zwischen pathogenen und apathogenen Stämmen in der Umwelt und demnach auch in Lebensmitteln ausgetauscht werden können (CHANG *et al.*, 1998). Daher ist es wichtig, nicht nur pathogene Stämme in Lebensmitteln zu detektieren, sondern auch apathogene Stämme, die potentielle Empfänger von Virulenzgenen darstellen und auch ohne den Besitz der Toxingene zu Erkrankungen führen können.

## 4.2 MLST-Analyse

### 4.2.1 Diversität der Stammsammlung

Die Diversität der untersuchten *V. parahaemolyticus*-Stämme wurde mit Hilfe verschiedener Methoden (empirische Datenauswertung, Rarefaction-Kurven, allelbasierte MSTs und sequenzbasierte UPGMAs auf Nukleotid- sowie Peptid-Ebene) untersucht. Die dabei beobachtete Diversität der Sequenztypen, Peptid-Sequenztypen, Allele, polymorphen Stellen sowie  $d_N/d_S$ -,  $D$ - und  $I_A^S$ -Werte war vergleichbar zu denen, die auf Basis der pubMLST-Stämme berechnet wurden. Dies legt nahe, dass die verschiedenen untersuchten Stamm-Gruppen – in Hinblick auf die MLST- und AA-MLST-Eigenschaften – eine angemessene Teilsammlung der pubMLST-Datenbank darstellen.

Um zu evaluieren, inwiefern die Stammsammlung repräsentativ war und somit aussagekräftige und verlässliche Ergebnisse erzeugt werden konnten, wurden Rarefaction-Kurven berechnet. Rarefaction ist eine Daten-Resampling Methode, die angeben soll, ob die natürliche Diversität in der gesammelten Stichprobe enthalten ist. Dabei wird angenommen, dass die analysierte Stammsammlung eine zufällige Stichprobe ist, die aus einem geschlossenen System mit einem stabilen Spektrum verschiedener Typen stammt. Die vollständige Diversität ist in der Stammsammlung enthalten, wenn die Rarefaction-Kurve das Plateau erreicht. Steigt die Kurve dagegen weiterhin an, bedeutet dies, dass ein Teil der Diversität nicht in der Stichprobe enthalten ist.

Wie in Abbildung 11 (in Abschnitt 3.2.1) gezeigt, erreicht keine der erstellten Kurven, auch nicht die Kurve basierend auf den pubMLST-Stämmen, das Plateau. Demnach scheint keine der hier analysierten Stamm-Gruppen die natürliche Diversität widerzuspiegeln. Ähnliches beobachteten FORBES und HORNE (2009) bei MLST-Untersuchungen von *Campylobacter* und schlugen zwei mögliche sich nicht ausschließende Erklärungen vor: Zum einen könnte die Stichprobe aus einem geschlossenen System mit einem konstanten und stabilen Spektrum verschiedener Typen stammen, aber die natürliche Diversität konnte nicht in der Stichprobe erfasst werden. Zum anderen könnte die Annahme eines geschlossenen Systems für die analysierte Population nicht zulässig sein.

Basierend auf der verfügbaren Literatur und der generierten Daten scheint die wahrscheinlichste Interpretation für *V. parahaemolyticus* zu sein, dass die vorhandene Population ein extrem großes Reservoir diverser Stämme darstellt, das kontinuierlich durch Mutation und Rekombination wächst (DRYSELIUS *et al.*, 2007). In regionale Teilpopulationen könnten neue Stämme auch durch menschliche Aktivitäten (z. B. Ballastwasser von Schiffen, Entsorgung von *V. parahaemolyticus* enthaltenden Meeresfrüchten) oder Zugvögel eingebracht werden (ALTUG *et al.*, 2012; BUCK, 1990; RIVERA *et al.*, 2012; RUIZ *et al.*, 2000). Somit scheint es kaum möglich zu sein, die globale natürliche Diversität in einer Stammsammlung abzubilden.

### 4.2.2 Sequenzierung der *gyrB*- und *recA*-Fragmente

Bei Verwendung der von GONZALEZ-ESCALONA *et al.* (2008) publizierten Primer konnte bei vielen Stämmen keine Amplifikation der Genfragmente *gyrB* und *recA* erzielt werden. Als Ursache kommen z. B. Mutationen im Bereich der zum Primer komplementären Sequenz in Frage, bei der Primer kaum oder gar nicht binden, oder die amplifizierten Fragmente bilden Sekundärstrukturen aus, die zu Abbrüchen bei der Sequenzierung führen. Auch CHAO *et al.* (2011) und ELLINGSEN *et al.* (2013) gelang

nicht bei allen analysierten Stämmen die Amplifikation der *gyrB*- und *recA*-Genfragmente. Für *recA* konnte gezeigt werden, dass das Gen in einigen Fällen verkürzt vorlag (CHAO *et al.*, 2011).

Mit Hilfe der im Rahmen dieser Arbeit designten Primer war eine Amplifikation der fehlenden *gyrB*- und *recA*-Fragmente möglich. Indem die ursprüngliche Annealing-Temperatur und die M13-Sequenzierüberhänge beibehalten wurden, konnte sowohl die parallelisierte PCR (z. B. im 96-well Format) als auch die Sequenzierung zusammen mit den anderen Loki durchgeführt werden. Alternativ änderten z. B. JOHNSON *et al.* (2009) die Annealing-Temperatur, um die Selektivität zu verringern, oder THEETHAKAEW *et al.* (2013) designten getrennte Primerpaare für die PCR und zur Sequenzierung. Damit konnten allerdings nicht mehr alle Loki parallel per PCR amplifiziert bzw. die Sequenzierung mit universellen Primerpaaren durchgeführt werden, wobei sowohl Parallelisierung als auch Standardisierung, die zu Kostenreduktion und Arbeitsvereinfachung führen, zu den Stärken dieser Methode zählen.

### 4.2.3 Diversität der Sequenztypen und Peptid-Sequenztypen

Die untersuchten *V. parahaemolyticus* wiesen eine hohe genetische Diversität auf: So konnten bei den 130 Stämmen insgesamt 82 verschiedene Sequenztypen identifiziert werden. Dies bestätigt die in anderen Studien gefundene hohe Diversität (ELLINGSEN *et al.*, 2013; GONZALEZ-ESCALONA *et al.*, 2008; JOHNSON *et al.*, 2009; YAN *et al.*, 2011). Auch der hohe Anteil neuer Sequenztypen (82,9 %) wurde sowohl für die Sammlung umweltassoziiierter Stämme verschiedener Herkunft als auch für die Gruppen von Stämmen mit gleicher Herkunft erwartet (ELLINGSEN *et al.*, 2013; ELLIS *et al.*, 2012; HARTH *et al.*, 2009; JOHNSON *et al.*, 2009; THEETHAKAEW *et al.*, 2013; YU *et al.*, 2011b). Die Diversität spiegelt sich auch in der hohen Anzahl verschiedener Allele eines Lokus wider. Außerdem kann aus der Allel-Anzahl abgeleitet werden, dass das MLST-Schema zwischen einer hohen Anzahl verschiedener Allel-Profile differenzieren kann ( $41^7$  bis  $65^7$ ) und demnach die Wahrscheinlichkeit sehr niedrig ist, dass durch Zufall zwei nicht verwandte Isolate den gleichen Sequenztyp besitzen (OSORIO *et al.*, 2012; SPRATT, 1999).

Die Mehrheit der identifizierten Sequenztypen wurde nur einmal erfasst, wie auch schon THEETHAKAEW *et al.* (2013) für thailändische *V. parahaemolyticus* zeigen konnten. Durch die sich ständig, z. B. durch Rekombination, verändernden Genotypen kann – v. a. bei umweltassoziierten Stämmen – der insgesamt hohe Anteil neuer Sequenztypen bzw. Allel-Kombinationen erklärt werden (VOS und DIDELOT, 2009; YAN *et al.*, 2011). Dieser ist weiterhin ein Indiz dafür, dass die natürliche genotypische Diversität der globalen *V. parahaemolyticus*-Population nur schlecht durch die pubMLST-Datenbank repräsentiert wird (THEETHAKAEW *et al.*, 2013).

Auf Peptid-Ebene wurden 31 verschiedene Peptid-Sequenztypen identifiziert, von denen 19 neu waren. Ein ähnliches Ergebnis konnten THEETHAKAEW *et al.* (2013) bei thailändischen Stämmen erzielen, sie identifizierten 31 verschiedene Peptid-Sequenztypen, von denen 16 neu waren.

#### 4.2.3.1 Reinigende Selektion führt zu einer verringerten Peptid-Sequenztyp-Diversität

Die hohe Diversität der Sequenztypen nahm bei der Umwandlung in Peptid-Sequenztypen stark ab. Im Fall von *V. parahaemolyticus* waren 95,8 % der Reduktion der Stamm-Diversität auf Nukleotid-Änderungen an der wobble-Base zurückzuführen. Bei solchen stummen Mutationen tritt keine Veränderung der Aminosäure auf, da durch die degenerativen Eigenschaften des genetischen Codes

mehrere Codons für eine Aminosäure codieren (BERNFELD und NIRENBERG, 1965; WOESE, 1965). Diese Beobachtungen wurden auch durch den  $d_N/d_S$ -Wert widerspiegelt. Dieser war, wie auch schon in anderen Studien gezeigt, für alle untersuchten Loki gleich oder nahe null, was auf einen reinigenden Selektionsdruck hindeutet (YAN *et al.*, 2011). Dies stimmt mit der Annahme überein, dass nicht-synonyme Substitutionen gerade bei Housekeeping-Genen zu schädlichen Effekten führen können (OSORIO *et al.*, 2012; PEREZ-LOSADA *et al.*, 2006). Dabei kann die Funktion des korrespondierenden Enzyms schon durch eine kleine Veränderung, wie z. B. durch den Austausch einer einzelnen Aminosäure, gestört werden, was einen schädlichen oder ggf. letalen Effekt auf das Bakterium haben kann. Die hohe Stabilität bei Housekeeping-Genen wird außerdem dadurch ersichtlich, dass in den meisten Fällen nur wenige Allele pro Locus vorhanden sind und die meisten Loki durch ein einziges Allel auf Peptid-Ebene repräsentiert werden, d. h., wenige funktionelle Varianten existieren.

#### 4.2.3.2 Verbreitung von Sequenztypen und Peptid-Sequenztypen

Wie von FORBES und HORNE (2009) dargestellt, stammen Stämme mit demselben Sequenztyp oder aus dem gleichen klonalen Komplex von einem gemeinsamen Vorfahren ab, wobei dies bei Stämmen des gleichen Sequenztyps weniger lange zurückliegt als bei Stämmen innerhalb desselben klonalen Komplexes. Wenn diese Überlegung fortgeführt wird, kann die Entwicklung vom gemeinsamen Vorfahr in denselben Sequenztyp über eine weitere Diversifizierung zum gemeinsamen klonalen Komplex und schließlich nach ausreichend vielen Änderungen zu einem veränderten Peptid-Sequenztyp angenommen werden.

Die globale Verteilung der Peptid-Sequenztypen kann durch den Transfer von *V. parahaemolyticus* über z. B. Meeresvögel oder Ballastwasser erklärt werden (ALTUG *et al.*, 2012; BUCK, 1990; RIVERA *et al.*, 2012). In seinem neuen Habitat würde sich der entsprechende Stamm (mit einem bestimmten Sequenztyp) lokal verändern und einen neuen Sequenztyp definieren, aber noch immer demselben Peptid-Sequenztyp angehören. Sogar innerhalb der verschiedenen geographischen Stamm-Gruppen konnten die verbreiteten Peptid-Sequenztypen identifiziert werden, wohingegen die seltenen Peptid-Sequenztypen in der Regel nur in einer einzelnen geographischen Gruppe identifiziert werden konnten. Dies könnte durch die Bildung neuer seltener Peptid-Sequenztypen durch lokale Proliferation der häufigen Peptid-Sequenztypen erklärt werden. So waren auch bei den IFH-Stämmen und den pubMLST-Stämmen die seltenen Peptid-Sequenztypen auf einen bestimmten Kontinent begrenzt, wohingegen die häufigen Typen eine weltweite Verbreitung zeigten. Die vergleichsweise höhere Diversität der Peptid-Sequenztypen in Sri Lanka könnte durch das Vorhandensein etablierter abgeschlossener *V. parahaemolyticus*-Populationen in den Garnelen-Farmen erklärt werden, die genetische Veränderungen durchlaufen haben, ohne dass negative Effekte aufgetreten sind. Andererseits könnte auch die besondere Lage Sri Lankas – zwischen dem arabischen Meer und dem Golf von Bengalen – dazu führen, dass sich Meeresströmungen mit unterschiedlichen *V. parahaemolyticus*-Populationen vermischen und so zu einer erhöhten Diversität an Peptid-Sequenztypen führen.

In Sri Lanka konnte auch eine größere Anzahl Sequenztypen (z. B. ST394) identifiziert werden, die in mehr als einer der verschiedenen untersuchten Teilregionen vorhanden waren. Dies führt zu der Annahme, dass eine Verbreitung der Stämme entweder zwischen den verschiedenen Farmen oder

aus einer gemeinsamen Quelle in die verschiedenen Farmen einer bzw. mehrerer Teilregionen stattfindet. Dies könnte durch die Transmission mittels verschiedener Vektoren, wie z. B. dem Meerwasser zur Befüllung der Zuchtbecken, dem Futter, dem Arbeitsgerät oder der Larven erfolgen (OTTA *et al.*, 2001; VASEEHARAN und RAMASAMY, 2003).

Einige der Sequenztypen konnten wiederholt zu verschiedenen Zeitpunkten in den Farmen nachgewiesen werden. So wurden Sequenztypen in zwei (ST394, ST397) bzw. drei (ST395) aufeinanderfolgenden Jahren identifiziert. Diese Stämme scheinen gut an die Umweltbedingungen in den Garnelen-Becken angepasst zu sein bzw. gibt es auch in der marinen Umwelt persistente Stämme (ELLIS *et al.*, 2012; JOHNSON *et al.*, 2009; TURNER *et al.*, 2013b).

In den meisten Fällen konnte keine globale Verbreitung der Sequenztypen beobachtet werden. Nur ein Sequenztyp konnte in mehr als einer Region nachgewiesen werden, so dass eine globale Verbreitung von Stämmen des gleichen Sequenztyps über natürliche Wege unwahrscheinlich erscheint. Ähnliches beobachteten ELLINGSEN *et al.* (2013) in einer Studie: Sie konnten einen Sequenztyp, der nicht dem pandemischen klonalen Komplex angehört, in verschiedenen Regionen der Welt identifizieren und schlossen daraus, dass sich der Stamm außerhalb seines ursprünglichen Verbreitungsgebietes ausgebreitet hat. Eine schnelle globale Ausbreitung wäre durch Transport von Ballastwasser, importierte Lebensmittel, Strömungen der Ozeane oder menschliches Reisen möglich.

Wie auch JOHNSON *et al.* (2009) berichteten, können innerhalb verschiedener geographischer Regionen sowohl lokal begrenzte als auch überregional verbreitete Sequenztypen gefunden werden. Dabei wurde der höchste Anteil überregional verbreiteter Sequenztypen bei den Stämmen aus Sri Lanka und der geringste Anteil bei den Stämmen der NB-Seas gefunden. Verglichen mit den kontrollierten Umweltbedingungen in Garnelenfarmen (z. B. konstanter pH-Wert und konstante Salinität) ist der Lebensraum der NB-Seas-Region durch wechselnde Umweltbedingungen (z. B. Temperatur und Salinität) und eine Vielzahl ökologischer Nischen (z. B. offenes Wasser, Mündungsgebiete, Sedimente) charakterisiert, was zur lokalen Entstehung von besser adaptierten Typen führen kann (KARL und DORE, 2001; KORALAGE, 2011). Beide Meere stellen außerdem sehr unterschiedliche Habitate dar. Die Ostsee als eher abgeschlossenes Binnenmeer und die Nordsee als offeneres Meer mit starken Wasserzuströmen insbesondere aus dem Norden sind z. B. durch unterschiedliche Salzgehalte charakterisiert (Ostsee 0,8 - 1,5 %, Nordsee 3,2 - 3,5 %). So waren Sequenztypen, die mehrfach in der Region NB-Seas identifiziert wurden, entweder in der Nordsee oder der Ostsee vorhanden, aber nicht in beiden. Somit scheint sich die natürliche Unterteilung der Nord- und Ostsee in der Verteilung der Sequenztypen widerzuspiegeln, die auf den verschiedenen Habitaten beruht, an die sich unterschiedliche Stämme (bzw. Sequenztypen) angepasst haben.

Die Unterschiede in der Verteilung der Sequenztypen in sri-lankischen und ecuadorianischen Garnelenfarmen könnten auf verschiedene Strukturen innerhalb der Farmen zurückgeführt werden. So stammten z. B. 50 % der gekauften post-Larvae der Garnelen-Becken Sri Lankas von nur vier verschiedenen Händlern – einer der Händler belieferte 24,1 % der Becken –, wohingegen alle untersuchten Farmen in Ecuador ihre post-Larvae von verschiedenen Händlern bezogen (KORALAGE, 2011; SPERLING, pers. Kommunikation).

In einzelnen Fällen gelang ein Verfolgen der Sequenztypen entlang der Verbreitungskette der Lebensmittel: von Garnelen-produzierenden Regionen Sri Lankas und Ecuadors bis zum Einzelhandel in Deutschland.

Weitere Analysen der genetischen Diversität innerhalb kleinerer geographischer Einheiten, wie z. B. auf einzelnen Farmen oder in einer abgegrenzten Bucht, könnten dazu beitragen zu verstehen, ob die Sequenztypen bzw. Peptid-Sequenztypen, die keine gemeinsamen Loci mit anderen Typen teilen, an die lokale Umwelt angepasste Typen mit einer klonalen Populationsstruktur darstellen. Andererseits könnten solche lokalen Populationen auch durch genetischen Austausch zwischen den vorhandenen Typen bzw. mit neu eingeführten Stämmen oder durch Mutation sehr divers sein.

Die großen Wasserströmungen des arabischen Meeres und des Golfs von Bengalen, die bei Sri Lanka aufeinandertreffen, enthalten vermutlich unterschiedliche *V. parahaemolyticus*-Populationen mit für die jeweilige Population spezifischen Sequenztypen bzw. Peptid-Sequenztypen. Beim Durchmischen der Strömungen werden auch diese Populationen vermischt. Dabei könnte sich ein Hot Spot für Vibrionen bilden, an dem sich neue Typen durch z. B. horizontalen Gentransfer bilden und diversifizieren. Es stellt sich daher die Frage, inwieweit dies durch die hohe Diversität an Peptid-Sequenztypen in den Garnelenbecken Sri Lankas widergespiegelt wird. Um zu überprüfen, ob die Garnelenbecken als Modell-System für die Umwelt dienen könnten, müsste man Meerwasserproben des Oberflächen- und Tiefenwassers vor den Küsten Sri Lankas und aus den sich treffenden Meeresströmungen analysieren und hinsichtlich der enthaltenen *V. parahaemolyticus*-Populationen untersuchen und insbesondere nach Unterschieden in Bezug auf die vorhandenen Sequenztypen und Peptid-Sequenztypen suchen.

#### 4.2.4 Populationsstruktur von *V. parahaemolyticus*

Der standardisierte Index der Assoziation ( $I_A^S$ ) dient dazu, die Populationsstruktur einer Population zu bestimmen, und wurde für entweder alle Isolate oder ein Isolat pro Sequenztyp berechnet. Dies soll einen Bias minimieren, der bei epidemischen Populationsstrukturen auftreten kann, wenn viele Isolate desselben Sequenztyps analysiert werden (ROMANO *et al.*, 2009). Dabei war der  $I_A^S$  für die verschiedenen analysierten Stamm-Gruppen signifikant unterschiedlich zu null (vgl. Tabelle 14 in Abschnitt 3.2.3). Dies konnten auch ELLIS *et al.* (2012), THEETHAKAEW *et al.* (2013), TURNER *et al.* (2013b) und YAN *et al.* (2011) in den von ihnen untersuchten Populationen beobachten. Der relativ niedrige  $I_A^S$ -Wert spiegelt die auftretende Rekombination in den untersuchten *V. parahaemolyticus*-Populationen wider (YAN *et al.*, 2011). Der Abfall des  $I_A^S$ -Wertes, wenn nur ein Isolat pro Sequenztyp betrachtet wurde, stimmte mit den Ergebnissen von THEETHAKAEW *et al.* (2013) und YAN *et al.* (2011) überein.

Dieses Verhalten ist typisch für die postulierte Populationsstruktur von *V. parahaemolyticus*, die dem epidemischen Modell der klonalen Expansion folgt (CHAO *et al.*, 2011; FEIL, 2004; YAN *et al.*, 2011; YU *et al.*, 2011b).

Epidemische Populationen werden aus zwei Teil-Populationen gebildet (SMITH *et al.*, 2000). Den ersten Teil stellt die Hintergrund-Population dar, die aus einer großen Anzahl relativ seltener und unverwandter Genotypen besteht. Bei diesen tritt mit hoher Frequenz Rekombination auf. Hervorgehoben vor diesem Hintergrund ist eine kleine Anzahl an Genotypen oder Cluster von nah verwandten Genotypen. Diese stellen klonale Komplexe dar, die typischerweise aus einem einzelnen, hoch adaptivem ursprünglichen Genotyp entstanden sind. Diese Klone treten mit einer größeren Frequenz in der natürlichen Population auf und können über Jahrzehnte persistieren. Die Diversifikation beruht überwiegend auf Rekombination, aber auch auf Mutation.

In klonalen Populationen stammen alle Stämme von einem gemeinsamen Vorfahren ab. Dieser hat sich vor allem durch Mutation diversifiziert, Rekombination tritt dagegen nicht frei auf (SMITH *et al.*, 1993). Die Mitglieder einer klonalen Population vererben identische Allele an den meisten Loci, die sie von einem gemeinsamen Vorfahren erhalten haben (MAIDEN *et al.*, 1998). D. h. die Verteilung der Allele ist in der Regel nicht zufällig. Allerdings kann es innerhalb verschiedener Teilpopulationen zu Rekombination kommen (GONZALEZ-ESCALONA *et al.*, 2008).

Durch die Betrachtung der Lebensweise von *V. parahaemolyticus* kann diese Struktur veranschaulicht werden (YAN *et al.*, 2011): *V. parahaemolyticus* ist in Mündungsgebieten, marinen und küstennahen Lebensräumen weltweit verbreitet. In diesen Lebensräumen ändern sich physiochemische Eigenschaften wie Nährstoffgehalt, Temperatur, Salzgehalt und pH-Wert sehr häufig. Dies erfordert eine fortwährende Adaptation. Damit übereinstimmend kann eine hohe genotypische Diversität bei *V. parahaemolyticus* beobachtet werden. Besonders erfolgreiche Klone breiten sich schnell aus und könnten, falls sie wie der pandemische Klon humanpathogen sind, zu einem weltweit verbreiteten Auftreten von gastrointestinalen Infektionen führen (NAIR *et al.*, 2007).

Bei den verschiedenen geographischen Stamm-Gruppen wurden insgesamt ähnliche  $I_A^S$ -Werte beobachtet, wobei der etwas höhere Wert für die Stämme aus Sri Lanka für eine vergleichsweise klonale Populationsstruktur spricht.

#### 4.2.4.1 Klonale Beziehungen der Isolate

Die hohe Diversität der untersuchten Stämme spiegelt sich auch im Population Snapshot wider (vgl. Abbildung 12 A in Abschnitt 3.2.3.1). Nur sieben Sequenztypen waren Einzel-Lokus-Varianten (SLV) zu einem der anderen Sequenztypen und es konnten auf Nukleotid-Ebene nur drei klonale Komplexe bzw. Doubletten identifiziert werden. Eine ähnlich kleine Anzahl von SLVs wurde auch von TURNER *et al.* (2013b) beobachtet. Die hier identifizierten SLVs stammten von einem oder zwei Kontinenten. Wie GONZALEZ-ESCALONA *et al.* (2008) bereits für den pandemischen CC3 zeigen konnten, liefert dies einen Hinweis auf eine mögliche globale Verbreitung von Sequenztypen. Für nicht-klinische Stämme konnte eine solche Verbreitung allerdings noch nicht gezeigt werden. Auf regionaler Ebene konnte nur ein einziges Triplett bei den Stämmen aus Sri Lanka identifiziert werden. Dies stimmt mit den Ergebnissen von GAVILAN *et al.* (2013) überein, die nur einen klonalen Komplex innerhalb einer geographisch begrenzten Region in Peru beschrieben haben. Auch bei den pubMLST-Stämmen gehörten nur wenige Sequenztypen zu klonalen Komplexen, insbesondere wenn man den pandemischen klonalen Komplex nicht berücksichtigt (vgl. Abbildung 13 in Abschnitt 3.2.3.1). Somit führte der hohe Anteil alleler Diversität zu einer reduzierten Fähigkeit von goeBURST, verwandte Genotypen zu identifizieren. Nur für identische oder nah verwandte Stämme (SLVs bis TLVs) sind die identifizierten Beziehungen verlässlich (SPRATT und MAIDEN, 1999). Sind die Stämme hingegen entfernter verwandt, können nur wenige Rückschlüsse hinsichtlich ihrer Beziehungen zueinander und ihrer Abstammung voneinander aus den Analysen gezogen werden.

Der Minimum Spanning Tree (MST) auf Peptid-Ebene bestand dagegen aus einem einzigen klonalen Komplex, der, wie auch von THEETHAKAEW *et al.* (2013) beschrieben, von zwei Peptid-Sequenztypen (pST1 und pST2) gegründet wurde (vgl. Abbildung 12 C in Abschnitt 3.2.3.1). Diese beiden Peptid-Sequenztypen repräsentieren eine große Anzahl verschiedener Sequenztypen (pST1 entspricht 142 Sequenztypen, pST2 entspricht 127 Sequenztypen) und stellen vermutlich



ursprüngliche Typen von *V. parahaemolyticus* dar. Somit erlaubte die Verwendung von Peptid-Sequenztypen statt Sequenztypen eine Identifizierung nahverwandter Stämme unabhängig von ihrer geographischen Herkunft. Die anderen Peptid-Sequenztypen könnten aus den ursprünglichen Typen pST1 und pST2 durch genetischen Drift, Mutation oder andere genetische Veränderungen entstanden sein (OSORIO *et al.*, 2012). Ein ähnliches Ergebnis erzielten OSORIO *et al.* (2012), die ein peptidbasiertes MLST-Schema bei *Brachyspira hyodysenteriae* anwendeten, um mögliche Beziehungen zwischen verschiedenen Stämmen zu identifizieren.

Bei der Analyse der IFH-Stämme im Kontext mit den pubMLST-Stämmen konnte die Bildung des neuen CC412 beobachtet werden (vgl. Abbildung 14 in Abschnitt 3.2.3.1). Dieser klonale Komplex wurde vom umweltassoziierten ST412 gegründet und besitzt neben potentiell pathogenen umweltassoziierten Stämmen auch klinische Stämme als DLVs bzw. TLVs. Dies unterstreicht die schon zuvor beobachtete enge genetische Verwandtschaft von umweltassoziierten und potentiell pathogenen Sequenztypen (ELLIS *et al.*, 2012). Durch das Vorhandensein dieser Sequenztypen im selben Habitat könnten zwischen den Stämmen Virulenzgene durch Rekombination oder den Transfer mobiler Elemente ausgetauscht werden (THOMPSON *et al.*, 2004). Allerdings erlaubt die Zugehörigkeit eines Sequenztyps zu einem klonalen Komplex mit pathogenen Stämmen keine Vorhersage über die pathogenen Eigenschaften dieses Sequenztyps.

#### 4.2.5 Geographische Cluster im UPGMA

Die in der UPGMA-Analyse identifizierten Cluster zeigten eine geographische Abhängigkeit und repräsentierten die lokale Verbreitung der Sequenztypen. Ähnliches beobachteten GONZALEZ-ESCALONA *et al.* (2008): Stämme, die von Patienten isoliert wurden, die rohe Austern von der US-amerikanischen Pazifikküste verzehrt hatten, bildeten ein einzelnes abgegrenztes Cluster. Allerdings konnten bei den hier analysierten IFH-Stämmen mehrere Cluster pro Kontinent identifiziert werden und die Verteilung der Sequenztypen war unabhängig vom geographischen Ursprung (vgl. Abbildung 17 A in Abschnitt 3.2.4). So waren z. B. Sequenztypen aller Kontinente über den ganzen UPGMA-Baum verteilt. Der Verlust der Clusterbildung auf Peptid-Ebene kann dadurch erklärt werden, dass viele Peptid-Sequenztypen eine globale Verbreitung besitzen (vgl. Abbildung 17 B). Wie schon OSORIO *et al.* (2012) zeigten, werden auf Peptid-Ebene nahezu alle Peptid-Sequenztypen in ein einzelnes Cluster gruppiert. Die unterschiedlichen Ergebnisse, die mittels UPGMA-Analyse auf Nukleotid- und Peptid-Ebene erzielt wurden, lassen sich durch das reduzierte Auflösungsvermögen des AA-MLST-Schemas erklären. Allerdings wurden klonale Komplexe und Doubletten mit beiden Methoden übereinstimmend gruppiert, wodurch die hohe genetische Ähnlichkeit innerhalb dieser Gruppen untermauert wird. Im Fall der sequenzbasierten UPGMA-Analyse konnten keine zusätzlichen Informationen durch die Verwendung des AA-MLST-Schemas gewonnen werden.

#### 4.2.6 Übereinstimmung der allel- und sequenzbasierten Analysen

Die im UPGMA-Baum, aber nicht im MST beobachtete geographische Abhängigkeit kann durch die unterschiedlichen Herangehensweisen der sequenzbasierten bzw. allelbasierten Analyse erklärt werden. Sequenzen mit vergleichsweise weniger Unterschieden werden im UPGMA nah aneinander gruppiert, dagegen besitzen im MST alle Sequenzen eines Allels mit mindestens einem Unterschied die gleiche relative Entfernung zueinander. Somit scheint der UPGMA besser geeignet zu sein,

geographische Unterschiede in hoch diversen Populationen zu zeigen. Die mittels goeBURST identifizierten klonalen Komplexe und Doubletten bildeten auch im UPGMA nah verwandte Gruppen. So konnten auch YAN *et al.* (2011) beobachten, dass die Sequenztypen, die mittels eBURST in klonale Komplexe gruppiert wurden, in UPGMA-Bäumen in hoch monophyletische Gruppen zusammengefasst wurden.

### 4.3 Genexpression

Mit Hilfe von temperaturabhängigen Veränderungen der Genexpressionsmuster von ubiquitär verbreiteten und/oder pathogenen Mikroorganismen können viele Informationen über Tenazität, Invasion und die Überlebensfähigkeit in Umwelt und Wirt gewonnen werden. Die Expressionsveränderungen konnten Hinweise auf temperaturinduzierte Gene liefern, die an der Tenazität und Persistenz von pathogenen Mikroorganismen in der Umwelt und verschiedenen Matrices, wie z. B. Lebensmittel oder Wirtsgewebe, beteiligt sind (MAURELLI *et al.*, 1984; RAPPUOLI *et al.*, 1992; STRALEY und PERRY, 1995).

#### 4.3.1 Auswahl der Referenztemperatur

Um temperaturabhängige Veränderungen der Genexpression zu erkennen, muss eine der getesteten Temperaturen als Referenztemperatur betrachtet werden. Die Temperatur, bei der *V. parahaemolyticus* Wachstum zeigt, liegt zwischen 5 °C und 43 °C (ALTER, 2012b). Optimale Wachstumstemperaturen werden im Sommer z. B. in Küstengewässern des Mittelmeeres (20 °C bis 25 °C), aber auch in der Nordsee (~20 °C) erreicht (OBERBECKMANN *et al.*, 2011b; SUFFREDINI *et al.*, 2014). Das Temperaturoptimum sollte, insbesondere für pathogene Stämme, bei 37 °C liegen, da sie bei dieser Temperatur optimales Wachstum zeigen müssten, um für homoiotherme Wirte pathogen zu sein (ALTER, 2012b; ZIMMERMAN *et al.*, 2007). Da bei der Adaptation Prozesse ablaufen, die Energie erfordern, sollte diejenige Bedingung als normal angesehen werden, bei der eine Adaptation an davon abweichende Bedingungen so einfach wie möglich, d. h. mit wenigen Veränderungen, erfolgen kann. Auf die Genexpression übertragen, sollte demnach diejenige Temperatur als Referenztemperatur betrachtet werden, bei der die Summe aller signifikant differentiell exprimierten Gene bei allen anderen Temperaturen am niedrigsten ist.

Um die Referenztemperatur für die Genexpressionsstudien zu bestimmen, wurde, nach der Normalisierung gegen die Daten jeder anderen Temperatur, die Anzahl differentiell exprimierter Gene bei allen Temperaturen (4 °C, 15 °C, 20 °C, 37 °C und 42 °C) ermittelt. Wie in Tabelle 15 (Abschnitt 3.3.4) dargestellt war diese Anzahl bei 37 °C am niedrigsten. Dies wurde erwartet, da 37 °C das Temperaturoptimum für pathogene Stämme, wie den verwendeten *V. parahaemolyticus*-Stamm RIMD 2210633, darstellt. Für die weitere Auswertung der Genexpression wurde daher 37 °C als Referenztemperatur verwendet.

Auch bei 20 °C war die Anzahl der signifikant differentiell exprimierten Gene vergleichsweise niedrig: Es konnten nur 19 Gene identifiziert werden, die eine signifikant differentielle Expression bei 20 °C zeigten. In der hierarchischen Clusteranalyse waren die Proben bei 37 °C und 20 °C sehr ähnlich (vgl. Abbildung 21 in Abschnitt 3.3.2). Dies spricht dafür, dass 20 °C noch im optimalen Temperaturbereich von *V. parahaemolyticus* RIMD 2210633 liegt.

### 4.3.2 Übereinstimmung von Microarray und RT-qPCR

Um die Methodik der Microarray-Analyse zu überprüfen, wurde die Expression einiger Gene zusätzlich mittels RT-qPCR untersucht. Mit beiden Methoden konnten übereinstimmende Ergebnisse erzielt werden. So betrug der Korrelationskoeffizient  $R^2$ , der als Maß für die Korrelation verwendet wird, für alle untersuchten Gene 0,7825 (vgl. Abbildung 22 A in Abschnitt 3.3.3). Teilweise ergaben sich höhere Werte (bis 0,9792), wenn die Gene einzeln betrachtet wurden (Abbildung 22 B-G). Verglichen mit den Ergebnissen anderer Genexpressionsstudien ( $R^2$  von 0,7364 bis 0,96) wurde für die einzelnen Gene und auch für alle Gene gemeinsam demnach eine gute bis starke Korrelation beider Methoden gezeigt (HAN *et al.*, 2005; WOOD und ARIAS, 2011; YANG *et al.*, 2010; YANG *et al.*, 2009).

### 4.3.3 Genexpression bei Kältestress

Bei niedrigen Temperaturen (4 °C und 15 °C) konnte eine globale Veränderung der Genexpression bei *V. parahaemolyticus* beobachtet werden. Das heißt, es waren nicht nur Gene einer bestimmten Funktion induziert oder reprimiert. Stattdessen wurden Genexpressionsunterschiede über alle funktionalen Genkategorien hinweg identifiziert. Dies stimmt mit den Beobachtungen von YANG *et al.* (2009) überein: Fast 60 % aller Gene zeigten zu einem der untersuchten Zeitpunkte eine Reaktion. Dabei überwog in den metabolismusverwandten Gen-Kategorien („Aminosäure-Synthese“, „Energie-Metabolismus“, „Protein-Synthese“, „Fettsäure-“, und „Phospholipid-Metabolismus“ sowie „Purin-, Pyrimidin-, Nukleosid- und Nukleotid-Metabolismus“) die Repression und bei Genen ohne Zuordnung zu metabolismusverwandten Gen-Kategorien („Zellhülle“, „Transport- und Bindung“, „Regulation“, „zelluläre Prozesse“) sowie bei Genen mit unbekannter oder nicht-zugeordneter Funktion häufiger die Induktion.

Auch bei dem im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Stamm waren Gene der metabolismusverwandten Kategorien überwiegend reprimiert, wie z. B. ein Gencluster, das einen Ribose-Transporter codiert (VPA1082-1087). Dies kann auf das allgemein reduzierte Wachstum und die verlangsamte Zellteilung bei niedrigeren Temperaturen zurückgeführt werden (PHADTARE *et al.*, 1999). So war unter anderem das Gen *rpoS* induziert, das für den alternativen Sigma-Faktor RpoS ( $\sigma^{38}$ ) codiert. Bei den *Enterobacteriaceae* *E. coli* und *Salmonella enterica* ist RpoS an der Transkription von Genen beteiligt, die für das Überleben der Zellen in der stationären Phase und bei verschiedenen Stressbedingungen notwendig sind (FANG *et al.*, 1992; KAZMIERCZAK *et al.*, 2005; LANGE und HENGGE-ARONIS, 1991). Außerdem werden vermehrt Genprodukte benötigt, die eine Anpassung an die veränderten Umweltbedingungen ermöglichen.

Dagegen zeigten Gene der Kategorien „DNA-/Protein-Metabolismus“, „Zellhülle“, „Transport und Bindung“, „Regulation“, „zelluläre Prozesse“ sowie „unbekannte Funktion“ überwiegend eine Induktion. Bei 15 °C bzw. 4 °C waren 8,3 % bzw. 3,5 % der Gene der Kategorie „Zellhülle“ induziert. Dabei war ein großer Teil für die Biosynthese oder die Degradation der Bestandteile der Membran verantwortlich. Durch niedrige Umgebungstemperaturen verändern sich die Eigenschaften der Membranmoleküle, sodass die Zusammensetzung der Bestandteile – durch die homöoviskose Adaptation – verändert werden muss, um die ursprünglichen Eigenschaften (z. B. die Fluidität) zu erhalten (PHADTARE *et al.*, 2000; SINENSKY, 1974). Allerdings konnte für *E. coli* gezeigt werden, dass bei 12 °C die Membranzusammensetzung unverändert bleibt (VORACHEK-WARREN *et al.*, 2002).

Das durch Kälte veränderte Supercoiling der DNA kann durch Enzyme, wie z. B. die DNA-Gyrase und DNA-Topoisomerase, reguliert werden (WANG und SYVANEN, 1992). Im Genom von *V. parahaemolyticus* RIMD 2210633 wurden zwei DNA-Gyrasen und sieben DNA-Topoisomerase identifiziert; nur die DNA-Topoisomerase *topB* (VP2149) zeigte bei 15 °C eine Induktion. Dagegen wurde eine Vielzahl regulierter Gene identifiziert, die mit transkriptionellen Regulatoren, DNA-Reparatur-Mechanismen, DNA-Polymerasen und -Integrasen sowie -Helikasen assoziiert sind.

Bei 4 °C waren insbesondere transkriptionelle Regulatoren und Gene induziert, die an Prozessen des RNA-Metabolismus beteiligt sind. Diese Ergebnisse wurden auch durch die DAVID-Analyse bestätigt. Unter den elf Kategorien mit besonders vielen differenziell exprimierten Genen bei 4 °C waren neun, die mit der Transkription, der DNA-Bindung und der Regulation des RNA-Metabolismus assoziiert sind. Gene dieser Kategorien werden für die allgemeine Genexpression benötigt. Eine Induktion dieser Gene unterstreicht somit den hohen Einfluss, den eine verringerte Temperatur auf die globale Genexpression hat. Übereinstimmend wurde diese differentielle Regulation von PHADTARE (2004) beschrieben. Auch die Induktion der RNase R durch Kälte wurde schon für *Enterobacteriaceae*, wie z. B. *E. coli*, beschrieben (CAIRRAO *et al.*, 2003). Die RNase R ist an der Adaptation an Kälte, der RNA-Kontrolle (Helikase-Aktivität), der Protein-Qualitätskontrolle sowie der Pathogenese beteiligt (CAIRRAO *et al.*, 2003; PHADTARE, 2011). Auch ATP-abhängige RNA-Helikasen der DEAD-box Familie wie VP1699 waren bei *E. coli* bei Kälteschock induziert (PHADTARE, 2011). Diese sind für die RNA-Prozessierung, den RNA-Transport und -Abbau sowie die Biosynthese der Ribosomen nötig. Dagegen zeigte H-NS (VP1133) keine Induktion, sondern eine Repression bei 15 °C. Das Protein wurde von DERSCH *et al.* (1994) und PHADTARE *et al.* (2000) bei *E. coli* als kälteinduziertes Protein beschrieben, das zur Adaptation an niedrige Temperaturen benötigt wird.

Des Weiteren konnte die Induktion der polaren Flagelle (VP2232-61 und VP0770-86) bei 4 °C und 15 °C beobachtet werden. Diese Gene waren dagegen bei 42 °C reprimiert. Die polare Flagelle dient *V. parahaemolyticus* zur Fortbewegung in flüssigen Medien (MCCARTER, 1999). Im Gegensatz dazu bildet *V. parahaemolyticus* zum Schwärmen eine peritriche Begeißelung aus. Ggf. werden vermehrt Proteine der polaren Flagelle gebildet, um eine schnellere Fortbewegung zu ermöglichen oder die Fortbewegung in einer durch die niedrigere Temperatur visköseren Flüssigkeit aufrechtzuerhalten.

### 4.3.3.1 Kälteschock-Proteine

Bei *E. coli* wird CspA als wichtigstes Kälteschock-Protein angesehen, das als RNA-Chaperon für eine effiziente Translation bei niedrigen Temperaturen sorgt und als Induktor für das Kälteschock-Regulon fungiert (PHADTARE *et al.*, 1999). Bei *V. parahaemolyticus* RIMD 2210633 wurden vier CspA-ähnliche Proteine (VP1889, VPA1289-VPA1291) und ein CspD-ähnliches Protein (VP1012) identifiziert (MAKINO *et al.*, 2003). Die Gene, die CspA-ähnliche Proteine codieren, wurden durch die verschiedenen Temperaturen differentiiell reguliert: VP1889 war bei 4 °C, 15 °C und 20 °C induziert und bei 42 °C reprimiert. Die benachbarten Gene VP1884-88 mit unbekannter Funktion und das Gen *vacB* (VP1890), das für die RNase R codiert, zeigten alle eine Induktion bei 15 °C. Bei 4 °C waren nur die Gene VP1886-88 und bei 20 °C das Gen VP1888 induziert. Letzteres war bei 42 °C außerdem reprimiert. Dagegen zeigten die Gene VPA1289 und VPA1290 nur eine signifikante Induktion bei 15 °C, allerdings waren beide auch bei 4 °C nicht-signifikant aktiviert ( $p < 0,057$ ). VPA1289 war außerdem bei 42 °C reprimiert. Auch YANG *et al.* (2009) konnten für VPA1289 eine Induktion bei 10 °C

zeigen. Das *cspA*-ähnliche Gen VPA1291 war nur bei 4 °C induziert, bei 15 °C war es nur nicht-signifikant aktiviert ( $p < 0,072$ ). Das Gen *cspD* (VP1012) war bei keiner der untersuchten Temperaturen differentiell exprimiert.

Somit scheinen von den identifizierten Kälteschock-Proteinen nur die CspA-ähnlichen Proteine eine wichtige Rolle bei der Adaptation an niedrige Temperaturen zu spielen.

#### 4.3.3.2 Unterschiede der Genexpression bei 4 °C und 15 °C

Bei 4 °C waren mit 4 % der Gene deutlich weniger Gene differentiell reguliert als bei 15 °C (13,2 %). Dabei waren die Gene mit differentieller Regulation bei 4 °C häufig auch bei 15 °C induziert bzw. reprimiert. Bei niedrigen Temperaturen laufen chemische und biologische Reaktionen mit einer verringerten Geschwindigkeit ab, was z. B. an einer verringerten Enzymaktivität erkennbar ist (FIELDS, 2001). So kann nicht ausgeschlossen werden, dass diese verringerte Aktivität und Reaktionsgeschwindigkeit als reduzierte Genexpression interpretiert wird. Gegebenenfalls wäre eine verlängerte Inkubation bei 4 °C nötig, um eine zu 15 °C vergleichbare Regulation zu erzielen. So konnten YANG *et al.* (2009) mit zunehmender Inkubationszeit eine höhere Anzahl differentiell regulierter Gene identifizieren. Alternativ könnte man versuchen, die Geschwindigkeitsreduktion zu ermitteln, die bei niedrigen Temperaturen auftritt. Dies könnte mit Hilfe von Enzymaktivitätstests geschehen, indem man die Aktivität eines Enzyms bei verschiedenen Temperaturen bestimmt. Daraus könnte der Faktor berechnet werden, um den die Reaktionsgeschwindigkeit reduziert wird und der zur scheinbar verringerten Genexpression beiträgt. Basierend darauf, dass sich bei Normalbedingungen die Reaktionsgeschwindigkeit halbiert, wenn ein System um 10 °C abgekühlt wird, würden bei einer Abkühlung von 37 °C auf 4 °C ca. 10 % der ursprünglichen Aktivität erhalten bleiben (NELSON und COX, 2008). Bei einer Bakterienzelle handelt es sich allerdings nicht um ein abgeschlossenes System unter Normalbedingungen, so dass diese Werte nur einen groben Anhaltspunkt liefern können.

#### 4.3.4 Genexpression bei Hitzestress

Wie schon HAN *et al.* (2005) feststellten, konzentrieren sich die durchgeführten Studien zur bakteriellen Genexpression bei Hitzestress überwiegend auf die Expression der klassischen HSPs.

Bei erhöhten Temperaturen wurde ein nahezu ausgeglichenes Verhältnis von Induktion (53,3 %) und Repression (46,7 %) beobachtet. Die Genkategorien mit dem höchsten Anteil (> 9 %) induzierter Gene waren die Kategorien „Zell-Metabolismus“, „Zellhülle“ und „Regulation“. So konnte vor allem eine Induktion vieler Gene beobachtet werden, die mit dem Transport und Metabolismus, insbesondere von Kohlenhydraten (z. B. Arabinose, Mannose und Gluconat), assoziiert waren. Auch waren Gene induziert, die an der Fermentation beteiligt sind. So sinkt bei steigenden Temperaturen die Löslichkeit von Gasen im Medium, was zu einem verringerten Anteil von gelöstem O<sub>2</sub> führt. Dies führt wiederum dazu, dass Gene induziert werden, die an der Fermentation, d. h. am anaeroben Metabolismus, beteiligt sind. Ähnliches wurde auch bei Hitzeschock von *Yersinia (Y.) pestis* beobachtet (HAN *et al.*, 2005). Wie bei Kälte muss auch bei Hitze die Zusammensetzung der Zellmembran angepasst werden, um die optimale Fluidität aufrechtzuerhalten. Gegensätzlich zur Adaptation an Kälte wird evtl. der Anteil an gesättigten Fettsäuren in den Lipiden der Membran erhöht, da diese einen höheren Schmelzpunkt als ungesättigte Fettsäuren besitzen (PHADTARE *et al.*, 2000).

#### 4.3.4.1 Hitzeschock-Proteine

Durch Hitzeeinwirkungen werden Proteine denaturiert, die in der Zelle akkumulieren, zelluläre Abläufe inhibieren bzw. ihre ursprüngliche Funktion nicht mehr erfüllen können (SKOWYRA *et al.*, 1990). Um diese fehlgefalteten Proteine abzubauen und/oder in ihre native Form zurückzuführen, werden bei der Hitzestress-Antwort spezielle Systeme induziert.

Zur klassischen Hitzestress-Antwort gehört die Induktion von *rpoH*, das den alternativen Sigma-Faktor RpoH ( $\sigma^{32}$ ) codiert, der wiederum die Transkription von HSPs induziert (MORITA *et al.*, 1999; PHADTARE *et al.*, 2000; YURA *et al.*, 1993). Das bei *V. parahaemolyticus* RIMD 2210633 identifizierte Gen *rpoH* (VP2953) zeigte bei 42 °C allerdings nur eine leichte Aktivierung ( $\log_2FC > 1,4$ ). Demnach scheint ein anderer Regulator für die Expression der HSPs von *V. parahaemolyticus* RIMD 2210633 bei Hitze verantwortlich zu sein.

Die HSPs spielen als molekulare Chaperone und ATP-abhängige Proteasen eine wichtige Funktionen bei der Faltung, der Reparatur und dem Abbau von Proteinen sowohl unter normalen als auch Stressbedingungen (LINDQUIST und CRAIG, 1988). Generell war von einer Induktion der HSPs bei erhöhten Temperaturen auszugehen und diese konnte im Allgemeinen auch beobachtet werden (WONG *et al.*, 2002).

Bei *Vibrionaceae* und auch *V. parahaemolyticus* RIMD 2210633 wurde eine Genduplikation des *groESEL*-Operons nachgewiesen (CHOWDHURY *et al.*, 2014). Das durch das *groESEL*-Operon codierte Chaperonin-System ist für die Faltung fehlgefalteter Proteine in ihre native Form verantwortlich. Beide *groESEL*-Operons (*groESEL1*: VP2851-VP2852 und *groESEL2*: VPA0286-VPA0287) zeigten eine Induktion bei 42 °C. Für *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* und *V. cholerae* konnten CHOWDHURY *et al.* (2014) zeigen, dass *groEL1* in der exponentiellen Wachstumsphase stärker exprimiert war als *groEL2*. Dagegen wurde im Rahmen der hier durchgeführten Studie eine stärkere Induktion von *groESEL2* gegenüber *groESEL1* beobachtet.

Des Weiteren waren die beiden Clp-Proteasen *clpA* (VP1014) und *clpB* (VP1392) induziert. Diese Proteasen dienen dem Abbau fehlgefalteter Proteine. Für die Chaperonine *dnaK* (VP0653,  $p < 0,15$ ) und *dnaJ* (VP0654,  $p < 0,19$ ) konnte dagegen nur eine nicht-signifikante Aktivierung beobachtet werden. Die Gene *dnaK* und *grpE* (VP0651) zeigten bei 15 °C eine Repression, das Gen *dnaJ* war mit einem p-Wert von  $< 0,051$  nur nicht-signifikant reprimiert.

#### 4.3.5 Antagonistische Genexpression von Hitze- und Kälteschock-Proteinen

Wie auch YANG *et al.* (2009) beobachteten, zeigte der hier untersuchte Stamm RIMD 2210633 eine antagonistische Regulation der Kälte- und Hitzeschock-Gene (vgl. 4.3.3.1 und 4.3.4.1). So waren Gene, die an der Hitzestress-Antwort beteiligt sind, bei niedrigen Temperaturen hauptsächlich reprimiert. Bei erhöhten Temperaturen zeigten diese an der Hitzestress-Antwort beteiligten Gene dagegen eine Induktion und die an der Kältestress-Antwort beteiligten Gene eine Repression. Diese antagonistische Regulation von Genen der Hitze- und Kältestress-Antwort scheint bei einer Vielzahl von Bakterien, wie z. B. *Bacillus subtilis*, *L. monocytogenes* und *Y. pestis*, eine verbreitete regulatorische Kaskade darzustellen (CHAN *et al.*, 2007; HAN *et al.*, 2005; HELMANN *et al.*, 2001). Ein Teil der HSPs zeigt allerdings auch bei Kälte eine Induktion, wie z. B. bei *E. coli* und *Leuconostoc esenteroides* (PHADTARE und INOUE, 2004; SALOTRA *et al.*, 1995). So ist bei *E. coli* z. B. das molekulare Chaperon ClpB sowohl bei Kälte als auch Hitze induziert. Eine Induktion von HSPs bei

---

niedrigen Temperaturen konnte bei *V. parahaemolyticus* RIMD 2210633 allerdings nicht beobachtet werden.

#### 4.3.6 Unterschiede zwischen den Chromosomen

Der Anteil der differentiell exprimierten Gene pro Chromosom war bei verschiedenen Temperaturen unterschiedlich. Bei 4 °C war ein höherer Anteil der auf Chromosom 1 codierten Gene differentiell exprimiert, wohingegen bei 15 °C und 42 °C der Anteil differentiell exprimierter Gene auf Chromosom 2 höher war. Bei 20 °C war der Anteil auf beiden Chromosomen ähnlich.

Diese Beobachtungen können durch die unterschiedliche Verteilung von Genen erklärt werden, die mit der transkriptionellen Regulation und dem Transport verschiedenster Substrate assoziiert sind und somit zur Adaptation an wechselnde Umweltbedingungen benötigt werden (MAKINO *et al.*, 2003). Diese befinden sich zu einem größeren Anteil auf Chromosom 2.

Bei 20 °C kann sich *V. parahaemolyticus* weiterhin gut vermehren und benötigt keine größere Anpassung an die veränderte Temperatur (vgl. Abschnitt 4.3.1). Daher zeigten nur sehr wenige Gene überhaupt eine differentielle Expression. Die Veränderungen der Genexpression bei 20 °C sind für beide Chromosomen vergleichbar, da beide Chromosomen essentielle Gene codieren, die zum Überleben nötig sind.

#### 4.3.7 Induzierte Kreuzprotektion

Durch verschiedene Stressbedingungen können Gene induziert werden, die ein Überleben bei anderen Stressbedingungen erleichtern bzw. ermöglichen. Dieses Phänomen wird als Kreuzprotektion bezeichnet und wurde auch für *V. parahaemolyticus* beschrieben (vgl. Abschnitt 1.5.4). In den folgenden Abschnitten werden mögliche Kreuzprotektionen diskutiert, die durch Hitze bzw. Kälte bei *V. parahaemolyticus* induziert werden könnten.

Generell ist anzumerken, dass die Regulation der Schutzsysteme hoch komplex sein kann und einige Regulationsmechanismen von *V. parahaemolyticus* nicht aufgeklärt sind bzw. auch viele regulierte Gene mit noch unbekannter Funktion an diesen Mechanismen beteiligt sein könnten (vgl. Abschnitt 4.3.9).

#### Osmotischer Stress

In Bezug auf osmotischen Stress konnte keine einheitliche durch Temperaturveränderungen induzierte Reaktion beobachtet werden. In der transienten Phase der Antwort auf osmotischen Stress spielen Gene für die Synthese von Glutamat als Anion zu K<sup>+</sup> eine wichtige Rolle (LUCHT und BREMER, 1994; MCLAGGAN *et al.*, 1994; ONGAGNA-YHOMBI und BOYD, 2013). Keines dieser Systeme zeigte eine signifikante differentielle Expression. Bakterien verwenden kompatible Solute, die im Cytoplasma akkumuliert werden, um hohe Osmolaritäten in der Umgebung längerfristig auszugleichen (ATKINSON, 1969; BROWN und SIMPSON, 1972; DA COSTA *et al.*, 1998; GALINSKI, 1995; SLEATOR und HILL, 2002). Außerdem dienen sie zum Schutz bei hohen Temperaturen, Gefrier-Auftau-Stress und Austrocknung, indem sie die enzymatische Aktivität stabilisieren (DA COSTA *et al.*, 1998; SLEATOR und HILL, 2002; WELSH, 2000). Von den Genen zur Betain-Synthese *betABI* (VPA112-14) waren nur *betB* (VPA1113) bei 4 °C und 15 °C und *betI* VPA1114 bei 4 °C induziert. Die Gene des Ectoin-Synthesecusters *ectABC* (VP1720-22) zeigten keine Reaktion auf thermale Veränderungen.

Transporter zum Import fertiger kompatibler Solute aus der Umgebung sind z. B. die

Betain/Carnitin/Cholin-Transporter (BCCT) sowie das ProU-System (WHITAKER und BOYD, 2012; ZIEGLER *et al.*, 2010). Ein Teil der Gene der vier BCCTs von *V. parahaemolyticus* RIMD 2210633 war induziert oder reprimiert. Gene der ProU-Systeme zur Aufnahme und zum Transport von Prolin, (Glycin-)Betain, Ectoin und deren Vorläufern (*proVWX*, VP1726-28 und VPA1109-11) waren ebenfalls nur zum Teil induziert.

Bei osmotischem Stress erfolgt eine Umstrukturierung der OMPs. Allerdings ist bisher unklar, inwieweit diese Gene an der Bildung von Porin-Kanälen beteiligt sind oder zur Veränderung der Permeabilität beitragen (YANG *et al.*, 2010). Unter den Genen, die für Proteine der äußeren Membran (OmpA, OmpU und OmpW) bzw. für Porine codieren und an der Antwort auf osmotischen Stress beteiligt sind, konnten keine signifikanten Expressionsunterschiede beobachtet werden.

Durch diese unterschiedlichen Reaktionen konnte bei keiner der untersuchten Temperaturen eine eindeutige Induktion von Systemen identifiziert werden, die zu einer erhöhten Toleranz bei osmotischem Stress führen könnten.

### Oxidativer Stress

Eine wichtige Funktion bei der Antwort auf oxidativen Stress haben bei *V. cholerae* und *V. vulnificus* OxyR und durch OxyR-regulierte Katalasen (KONG *et al.*, 2004; WANG *et al.*, 2012). LIMTHAMMAHISORN *et al.* (2008) konnten für *V. vulnificus* eine Induktion der Gene *oxyR* und *katG* durch Kältestress beobachten. Gene zur ROS-Eliminierung bei oxidativem Stress sind auch bei *V. parahaemolyticus* essentiell. So besitzt der Stamm RIMD 2210633 Gene, die für die Enzyme Superoxid-Dismutase (VP2118, VP2860, VPA1514), Katalase (VPA0305, VPA0453, VPA0768, VPA1418), Peroxiredoxin (VP2753), Thioredoxin (VP0806, VP2005, VP3001, VPA0972) und Thioredoxin-Reduktase (VP1251) codieren (MAKINO *et al.*, 2003). Bei *V. parahaemolyticus* konnte im Rahmen der hier durchgeführten Versuche nur eine Induktion bei einem Teil der Gene zur ROS-Elimination durch Kälte identifiziert werden. Das putative Thioredoxin VP2005 war bei 4 °C und 15 °C induziert. Die von LIN *et al.* (2004) beobachtete verringerte Resistenz gegenüber Wasserstoffperoxid nach Kälteadaptation konnte von unseren Daten nicht bestätigt werden. Dagegen wurden die Katalasen *katG* (VPA0453, VPA0768) durch die Inkubation bei 42 °C induziert. Die Superoxid-Dismutase VP2860 war bei 42 °C allerdings reprimiert. CHIANG und CHOU (2008) konnten nach Hitzestress eine reduzierte Aktivität der Enzyme Superoxid-Dismutase und Katalase beobachten. Da *V. parahaemolyticus* allerdings nach Hitzestress eine erhöhte Resistenz gegenüber oxidativem Stress durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zeigte, sind entweder andere Mechanismen für diese Resistenz verantwortlich, wie z. B. die Synthese von Stressproteinen, die DNA-Schäden verhindern, oder die verringerte Enzymaktivität wird durch die erhöhte Genexpression ausgeglichen (CHANG *et al.*, 2004; PARK *et al.*, 2005). Ein solches Stressprotein ist z. B. VPA0454, das bei 42 °C eine Induktion zeigte.

Würde durch eine thermale Behandlung die Resistenz gegenüber oxidativem Stress erhöht, könnte dies zu Problemen bei der Lebensmittel-Prozessierung führen, da oxidativer Stress z. B. durch Bestrahlung, durch die Anwesenheit von Schwermetallen und Desinfektionsmitteln, durch wiederholtes Einfrieren sowie bei Säure- und Hitzestress entsteht (CABISCOL *et al.*, 2000; MOLS und ABEE, 2011; RODRIGUEZ-ROMO und YOUSEF, 2002). Diese Maßnahmen werden u. a. zur Reduktion von *Vibrio* spp. eingesetzt.



## Säurestress

Der molekulare Mechanismus der Säurestress-Antwort beruht vor allem auf Aminosäure-Decarboxylase-Systemen. Diese Systeme sind in Operons organisiert und codieren für einen Substrat/Produkt-Antiporter und eine Decarboxylase (vgl. Abschnitt 1.5.3.2). Bei *V. parahaemolyticus* ist das Lysin-Decarboxylase-System an der Säurestress-Antwort beteiligt (TANAKA *et al.*, 2008; WHITAKER *et al.*, 2010). Die Gene, die für die Lysin-Decarboxylase (VP2890) und einen putativen Lysin/Cadaverin-Transporter (VP2891) codieren, waren bei 15 °C induziert. Der codierte Transporter transportiert Lysin in die Zelle hinein (MERRELL und CAMILLI, 1999, 2002). Die Lysin-Decarboxylase ermöglicht dann die Umwandlung von Lysin in Cadaverin und Kohlenstoffdioxid. Dabei wird ein H<sup>+</sup>-Ion aus dem Cytoplasma verbraucht und damit der interne pH-Wert der Zelle bei Säurestress erhöht. Das entstandene Cadaverin wird durch denselben Transporter aus der Zelle hinaus transportiert.

Da beide Gene des Lysin-Decarboxylase-Systems bei 15 °C induziert waren, könnte dies für eine mögliche Kreuzprotektion durch Kälte sprechen. So zeigten TANAKA *et al.* (2008), dass die Lysin-Decarboxylase zum Überleben bei niedrigen pH-Werten essentiell ist. Die von KOGA *et al.* (1999) beobachtete allgemein verringerte Säuretoleranz nach einer Inkubation bei 42 °C konnte in den Genexpressionsstudien nicht bestätigt werden: Keines der Gene, die der Säurestress-Antwort zugeordnet waren, war nach Hitzestress signifikant reprimiert.

Bei 4 °C konnte keine Induktion des Lysin-Decarboxylase-Systems beobachtet werden. Die Lagerung von Lebensmitteln erfolgt in der Regel in Kühlschränken bei deutlich weniger als 15 °C. Werden Lebensmittel, die *V. parahaemolyticus* enthalten, bei niedrigen Temperaturen (um 4 °C) gelagert, scheint die Ausbildung der Kreuzprotektion daher unwahrscheinlich zu sein. Bei der Prozessierung bzw. der Zubereitung von Krustentieren wird häufig Säure (z. B. Essig, Zitronensäure) verwendet, mit der ggf. auch eine Reduktion von *Vibrio* spp. erzielt werden soll (MATHUR und SCHAFFNER, 2013). Bei unsachgemäßer zu warmer Lagerung, wie z. B. bei 15 °C, könnte es zu einer Kreuzprotektion kommen und eine mögliche Keimzahlreduktion durch Säure könnte erschwert oder verhindert werden.

## Stress durch Gallensäuren, antimikrobielle Peptide und Detergenzien

Die Antwort auf Stress an der äußeren Membran durch Gallensäuren und/oder durch antimikrobielle Peptide wird durch den alternativen Sigma-Faktor RpoE reguliert (MATHUR *et al.*, 2007; WALSH *et al.*, 2003). Bei 42 °C konnte in den durchgeführten Expressionsstudien eine Induktion des Gens *rpoE* beobachtet werden. Eine *rpoE*-Deletionsmutante war sensitiver gegenüber Polymyxin-B, Ethanol und hohen Temperaturen (HAINES-MENGES *et al.*, 2014). Insofern unterstützt die beobachtete Induktion die Schutzfunktion bei hohen Temperaturen. Gleichzeitig könnten über RpoE aber auch Gene reguliert werden, die die Resistenz gegenüber antimikrobiellen Peptiden (z. B. Polymyxin-B) erhöhen.

Für den Transport von (schädlichen) Substanzen aus der Zelle hinaus, werden Efflux-Transporter benötigt. So wurden bei *V. parahaemolyticus* drei Efflux-Transporter (VmeAB, VmeCD und VmeTUV) des RND-Typs identifiziert, die an der Resistenz gegenüber Gallensäuren beteiligt sind (MATSUO *et al.*, 2013; MATSUO *et al.*, 2014). Die Gene dieser Operons zeigten keine signifikante und einheitliche Reaktion bei thermalen Veränderungen. Abhängig von der Inkubationstemperatur konnte für die Gene drei weiterer RND-Typ-Transporter eine teils signifikante differentielle Expression beobachtet werden. So war z. B. das Gen VP2473 bei 15 °C induziert und bei 4 °C nicht-signifikant aktiviert.

Somit konnte keine eindeutige Induktion von Systemen beobachtet werden, die die Resistenz gegenüber Gallensäuren und/oder antimikrobiellen Peptiden erhöht.

#### **4.3.8 Einfluss der Temperatur auf Expression von Pathogenitätsfaktoren**

Da durch die veränderten Temperaturen die globale Genexpression beeinflusst wurde, lag ein Schwerpunkt der Analyse auf der differentiellen Expression von Genen, die mit der Pathogenität assoziiert sind. Generell konnte keine einheitliche Induktion oder Repression aller Pathogenitätsfaktoren bzw. aller Faktoren, die mit einem Pathogenitätsmechanismus assoziiert sind, beobachtet werden. Allerdings konnten verschiedene Gene oder Gencluster identifiziert werden, die eine differentielle temperaturabhängige Regulation zeigten. MAHONEY *et al.* (2010) konnten für klinische Referenzstämme zeigen, dass die Expression bekannter und möglicher virulenzassoziiertes Eigenschaften (Hämolyse, Proteasen, Motilität, Biofilm-Bildung und Zytotoxizität) nach einer Temperaturerhöhung von 28 °C auf 37 °C zunahm.

Generell ist anzumerken, dass bei niedrigen Temperaturen besonders der Energie-Metabolismus verlangsamt wird und damit verbunden eine veränderte Virulenz oder veränderte Expressionsraten bei Kälte erwartet werden können (SOMERVILLE und PROCTOR, 2009).

#### **Zelladhäsion**

Nahezu zwei komplette Cluster mit Genen, die mit der Zelladhäsion assoziiert sind (VP2409-13 und VPA0721-30), waren bei 42 °C induziert. Über solche Adhäsine wird Bakterien ein Anhaften an Zielzellen und somit der erste Schritt zur Injektion von Toxinen und Effektoren ermöglicht (BROBERG *et al.*, 2011). Demnach scheint eine temperaturabhängige Induktion der Adhärenz von *V. parahaemolyticus* möglich zu sein.

#### **Collagenasen und Proteasen**

Für verschiedene Collagenasen (z. B. VP1340 und VPA0714) und eine alkalische Serin-Protease (VPA0227) konnte zwar eine (teils) signifikante differentielle Expression beobachtet werden, doch reagierten die verschiedenen Gene unterschiedlich bei den untersuchten Temperaturen. Die Serin-Proteasen gehören zu den Chymotrypsin-ähnlichen Proteasen (MIYOSHI, 2013). Diese besitzen proteolytische Aktivität gegenüber Laminin und Typ I Collagen, die beide Bestandteile der extrazellulären Matrix sind. Die Produktion der von MIYOSHI *et al.* (2008) untersuchten Serin-Protease (VPA0227) war bei 25 °C – der Oberflächentemperatur des menschlichen Körpers – höher als bei 37 °C. Dieselbe Serin-Protease zeigte bei den hier durchgeführten Studien eine Induktion bei 42 °C. Da hier keine Untersuchung der Expression bei 25 °C erfolgte und MIYOSHI *et al.* (2008) keine höheren Temperaturen untersuchten, können die Ergebnisse weder bestätigt noch widerlegt werden.

Bei *L. monocytogenes* waren Proteasen auch zum intrazellulären Überleben und Entkommen aus dem Phagosom von Makrophagen nötig sowie für die Virulenz in der Maus verantwortlich (ROUQUETTE *et al.*, 1998; ROUQUETTE *et al.*, 1996). Auch bei *V. parahaemolyticus* könnten Proteasen für ähnliche Prozesse verantwortlich sein, die bei vergleichsweise höheren Temperaturen (Körpertemperatur) ablaufen und daher eine Induktion bei höheren (> 20 °C) und keine bei niedrigeren (≤ 20 °C) Temperaturen zeigen.

#### **Peritriche Begeißelung**

Da ein Teil der Gene (VPA0261-75 und VPA1532-57), die mit der Bildung und Erhaltung der

peritrichen Begeißelung assoziiert sind, bei 42 °C induziert war, könnte durch Hitzeschock die Fähigkeit zum Schwärmen, z. B. auf (Körper-)Oberflächen, induziert werden. Dies könnte zu einer erhöhten bzw. schnelleren Kolonisation und Ausbreitung von *V. parahaemolyticus* führen, was als erhöhte Virulenz angesehen werden könnte.

### Quorum-Sensing

Bei 42 °C war der Master-QS-Regulator OpaR reprimiert. GODE-POTRATZ und MCCARTER (2011) konnten zeigen, dass das OpaR-Regulon ca. 5,2 % des Genoms umfasst. Es reprimiert das Surface-Sensing, T3SS1-Regulon und induziert die Kapselbildung sowie das Schwärmen. Außerdem reguliert es die beiden T6SSs gegensätzlich, es reguliert den zellulären Gehalt an di-Guanosinmonophosphat, kontrolliert positiv die durch Chitin induzierte DNA-Kompetenz und blockiert umfassend die Zytotoxizität gegenüber Wirtszellen. Demnach könnte eine Repression von OpaR bei 42 °C dafür sprechen, dass dieser negative Regulator der Zytotoxizität durch Hitzeschock inaktiviert wird und somit die Zytotoxizität aufrecht erhalten bleibt.

### Eisentransport und Eisenakquirierung

Gene, die mit dem Eisentransport oder der Eisenakquirierung assoziiert sind, waren nicht einheitlich reguliert. So überwog eine Repression bei verschiedenen Temperaturen, wohingegen einige Gene eines Eisen-III-ABC-Transporters (VP1435-38) bei 4 °C und 15 °C induziert waren. Ggf. übernehmen verschiedene Transporter bei unterschiedlichen Temperaturen die Aufgabe, Eisen energieabhängig zu transportieren. Weder Kälte noch Hitze scheint die Eisenakquirierung umfassend zu beeinflussen.

### Endotoxine

Die Gene (VP1745 und VP2509) eines Schrittes der Biosynthese des Endotoxins Lipid A (Lauroyl-Acetyltransferase) waren bei 15 °C induziert. VP2509 war außerdem bei 42 °C reprimiert. Wird Lipid A beim Absterben der Bakterien aus den LPS der äußeren Membran freigesetzt, werden entzündliche Prozesse im Wirt induziert (JACOBS *et al.*, 1997). Bei *E. coli* zeigte die Palmitoleoyl-Acyltransferase der Lipid A Biosynthese eine Induktion nach Kälteschock bei 12 °C (CARTY *et al.*, 1999). Das Enzym ersetzt Laurat durch Palmitoleat und führt dazu, dass die optimale Membranfluidität bei niedrigen Temperaturen aufrechterhalten bleibt. Sollte die Lauroyl-Acetyltransferase bei *V. parahaemolyticus* eine vergleichbare Funktion bei der Umstrukturierung der LPS besitzen, dient die Modifikation vermutlich vor allem der Adaptation an Kälte. Dann würde die vermehrte Produktion nicht zu einem erhöhten pathogenen Potential führen. Allerdings könnte die Induktion der Lauroyl-Acetyltransferase bei *V. parahaemolyticus* auch eine Funktion bei der Pathogenese spielen, indem es die Produktion des Endotoxins Lipid A beeinflusst.

### Exotoxine

Die beiden Gene *tdhA* (VPA1314) und *tdhS* (VPA1378) waren bei keiner der untersuchten Temperaturen induziert. Dagegen zeigten CHIANG und CHOU (2008), dass die Synthese von TDH bei Hitzeschock zunahm. Diese Beobachtungen können durch unsere durchgeführten Microarray-Versuche nicht bestätigt werden. Allerdings untersuchten CHIANG und CHOU (2008) den Stamm 690 und nicht RIMD2210633, sodass diese unterschiedlichen Reaktionen stammspezifisch sein könnten. Des Weiteren bestimmten sie die Toxinproduktion direkt mittels eines Antikörpers gegen TDH und

nicht anhand der Expression des Gens *tdh*. YANG *et al.* (2009) beobachteten eine Induktion von vier putativen Hämolytinen (VP2536, VP0446, VP0372, VP3048) nach Inkubation bei 10 °C. Diese Induktion durch Kälte konnten wir nur für das Gen VP3048 beobachten: Es war sowohl bei 4 °C als auch bei 15 °C induziert, was für eine erhöhte Virulenz bei niedrigen Temperaturen sprechen würde.

### **Sekretionssysteme**

Von den Sekretionssystemen zeigte keines eine einheitliche Induktion oder Repression bei Kälte- oder Hitzeschock.

Gene des auf Chromosom 1 codierten T3SS1 waren teils durch Hitze und Kälte induziert. Inwieweit eine solche partielle Induktion bei 42 °C zu einer erhöhten Aktivität der vier Effektoren des T3SS1 führen könnte, müsste durch weitere Studien untersucht werden. Wäre dem so, käme es zu einer Zunahme von Autophagie, Membran-Blebbing, Zell-Abrundung und schließlich Zellyse der Wirtszellen (BROBERG *et al.*, 2010). Das T3SS1 ist neben der Pathogenese aber auch am Überleben im Wirt beteiligt und wird durch Surface-Sensing induziert (GODE-POTRATZ *et al.*, 2011). Da es auch in allen Umweltstämmen vorkommt, ist es vermutlich über die Regulation durch OpaR überwiegend für die Fitness von *V. parahaemolyticus* in seiner natürlichen marinen Umgebung verantwortlich.

Die Gene des auf Chromosom 2 codierten T3SS2 zeigten unter den untersuchten Bedingungen keine differentielle Regulation. Demnach scheint das Sekretionssystem T3SS2, das ausschließlich bei pathogenen Stämmen identifiziert wurde und für die Pathogenität essentiell ist, nicht durch Hitze oder Kälte induziert zu werden (PINEYRO *et al.*, 2010; RITCHIE *et al.*, 2012). Da das T3SS2 durch Gallensäuren auf dem Weg durch den Darm induziert wird, ist eine zusätzliche Aktivierung durch eine veränderte Temperatur nicht unbedingt notwendig, um die Aktivität des Transporters im Wirt zu erhöhen (GOTOH *et al.*, 2010; KODAMA *et al.*, 2010).

Einige Gene des T6SS1, das auf Chromosom 1 lokalisiert ist, zeigten eine Induktion bei verschiedenen Temperaturen. Der Regulator VP1391 zeigte eine Induktion bei 15 °C. Der korrespondierende Regulator *opaR* (VP2516), der auch für die Regulation des Quorum-Sensing verantwortlich ist, war bei 42 °C reprimiert (GODE-POTRATZ und MCCARTER, 2011). OpaR reprimiert die Expression von Komponenten des T6SS1 (MA *et al.*, 2012). Außerdem ist das Protein H-NS (VP1133) an der Repression des Sekretionssystems unter verschiedenen Umweltbedingungen beteiligt (SALOMON *et al.*, 2014). H-NS zeigte eine Repression bei 15 °C. Demnach wäre das T6SS1 sowohl durch die Induktion des Regulators VP1391 und die Repression des Repressors H-NS bei 15 °C als auch durch die Repression des Repressors OpaR bei 42 °C induziert. SALOMON *et al.* (2013a) zeigten für das T6SS1 die höchste Aktivität bei Bedingungen, die denen im Meerwasser im Sommer ähneln. Unter diesen Bedingungen besitzt T6SS1 auch eine antibakterielle Aktivität. Die hier identifizierte Expression des negativen Regulators OpaR bei höheren Temperaturen scheint diese Beobachtungen zu unterstützen. Inwieweit das System durch Kälte induziert wird, wurde von SALOMON *et al.* (2013a) nicht untersucht.

Für einige Gene des auf Chromosom 2 codierten T6SS2 konnte eine Induktion bei 42 °C gezeigt werden. Auch der korrespondierende positive Regulator *opaR* (VP2516) war bei 42 °C induziert. Dieser ist für die Induktion des T6SS2 mitverantwortlich (MA *et al.*, 2012). Für das T6SS2 wurde die stärkste Aktivität bei niedrigen Salzkonzentrationen beobachtet, wie sie z. B. im Inneren mariner Lebewesen vorherrschen (SALOMON *et al.*, 2013a). Die hier beobachtete Induktion konnte von SALOMON *et al.* (2013a) zuvor nicht identifiziert werden. Die von ihnen beschriebene fehlende

Induktion bei 37 °C ließ die Autoren darauf schließen, dass das T6SS2 eher indirekt an der Kolonisierung von Landsäugetieren bzw. dem Menschen beteiligt ist.

### Molekulare Chaperone

Molekulare Chaperone bzw. Hitzeschockproteine (HSP) sind auch unter normalen Bedingungen zum Überleben notwendig, da sie für die Faltung, die Reparatur und den Abbau von Proteinen verantwortlich sind (LINDQUIST und CRAIG, 1988). Aber auch bei der Invasion in und der Kolonisation von homoiothermen Wirten übernehmen HSPs wichtige Funktionen (GOPHNA und RON, 2003). So war *groESEL* bei *L. monocytogenes* beim Wachstum in Makrophagen-Zellen von Mäusen induziert (GAHAN *et al.*, 2001). Bei *V. cholerae* hat DnaK indirekt einen Einfluss auf die Expression des Toxins und des Toxin-regulierten Pilus, indem es die Expression des Virulenz-Regulators *toxR* induziert (CHAKRABARTI *et al.*, 1999). So konnte in einer *dnaK*-Deletionsmutante eine Repression von *toxR* und damit eine Reduktion der Virulenz von *V. cholerae* beobachtet werden. In den hier durchgeführten Studien konnte eine Induktion von *groESEL* und *dnaK* bei 42 °C beobachtet werden. Somit werden Systeme aktiviert, die nicht nur bei der Hitzestress-Antwort eine entscheidende Rolle spielen, sondern auch das Überleben von *V. parahaemolyticus* im Wirt ermöglichen könnten.

### 4.3.9 Gene mit unbekannter Funktion

Die zur Analyse der Daten zugrundeliegende Annotation der Gene wurde von YANG *et al.* (2009) übernommen und ergänzt. So waren bei YANG *et al.* (2009) ca. 42 % aller untersuchten Gene ohne bekannte oder zugeordnete Funktion. Durch die Ergänzungen konnte der Anteil dieser Gene auf unter 30 % reduziert werden. Dennoch gehörte ein hoher Anteil der signifikant differentiell exprimierten Gene der Gen-Kategorie „unbekannte Funktion“ an. Bei den verschiedenen Bedingungen waren zwischen 20 % und 36 % der induzierten oder reprimierten Gene keiner Funktion zugeordnet.

Es ist zu erwarten, dass durch die Annotation weiterer Gene neue Informationen über die Genfunktionen gewonnen werden können. Diese Gene könnten ggf. auch an der Stressadaptation oder Virulenz beteiligt sein.

## 4.4 Fazit

Die hohe Prävalenz (28 %) von *Vibrio* spp. und besonders der Nachweis Toxin-codierender *V. parahaemolyticus* in Garnelen- und Krabbenerzeugnissen aus dem deutschen Einzelhandel bestätigt die potentielle Gefahr für den Verbraucher, die von unzureichend erhitzten oder roh verzehrten Krustentieren ausgeht (KAYSNER und DEPAOLA, 2004). Besonders in warmen Jahren, in denen sowohl die Vermehrung als auch die Verbreitung von *Vibrio* spp. begünstigt sind, sollte auf eine ausreichende Erhitzung geachtet und mögliche Kreuzkontaminationen sollten vermieden werden (BAKER-AUSTIN *et al.*, 2010; BAKER-AUSTIN *et al.*, 2012).

Mit Hilfe der angewendeten MLST- und AA-MLST-Typisierungsschemata konnten die in der Literatur verfügbaren Ergebnisse bestätigt und erweitert werden. Die hohe genotypische Diversität der untersuchten Umweltstämme wurde erwartet und durch die Anwendung des AA-MLST-Schemas gelang es, verlässliche Beziehungen zwischen den Stämmen aufzuzeigen (ELLINGSEN *et al.*, 2013; GONZALEZ-ESCALONA *et al.*, 2008). Allerdings konnten die mittels MLST identifizierten geographischen Muster auf Peptid-Ebene nicht aufgezeigt werden. Daher sollten – je nach Studienschwerpunkt –

beide Schemata zur Anwendung kommen. Der Verlust der Diversität im AA-MLST-Schema beruht darauf, dass die Stabilität der analysierten Housekeeping-Gene durch reinigende Selektion aufrechterhalten bleibt (OSORIO *et al.*, 2012; PEREZ-LOSADA *et al.*, 2006). Durch die Verteilung der Sequenztypen, Peptid-Sequenztypen und klonalen Komplexe konnte das von FORBES und HORNE (2009) vorgestellte Entwicklungsschema erweitert werden: Die Entwicklung von einem gemeinsamen Vorfahr in denselben Sequenztyp mit verschiedenen genomischen Einzelnukleotid-Polymorphismen führt über eine weitere Diversifizierung zu einem gemeinsamen klonalen Komplex und schließlich nach ausreichend vielen Änderungen zu einem neuen Peptid-Sequenztyp. Außerdem konnten verschiedene Faktoren identifiziert werden, die für die globale bzw. lokale Verteilung von Sequenztypen und Peptid-Sequenztypen in Frage kommen.

Durch die Analyse der temperaturabhängigen Genexpression von *V. parahaemolyticus* konnte gezeigt werden, dass die Adaptation an Hitze und Kälte eine globale Veränderung der Genexpression erforderlich macht. Dabei konnten mögliche Kreuzprotektionen identifiziert werden, die durch Hitze bzw. Kälte induziert wurden. Diese könnten bei der Prozessierung bzw. Zubereitung von Lebensmitteln zu einer erhöhten Resistenz führen. Außerdem wurden durch Hitze Faktoren induziert, die bei der Kolonisation bzw. Invasion benötigt werden und so ggf. zu einer erhöhten Pathogenität von hitzestressen *V. parahaemolyticus* führen könnten. Da in der Umwelt der Anteil von Stämmen überwiegt, die für keines der klassischen Toxine TDH und TRH codieren, sollten solche Untersuchungen an umweltassoziierten Stämmen wiederholt werden (DEPAOLA *et al.*, 1990; HALEY *et al.*, 2014). Außerdem wäre eine Analyse der globalen Genexpression der Stämme interessant, die nicht im Medium, sondern direkt in Garnelen oder Muscheln erfolgt. Dazu wäre eine Trennung von eukaryotischer und prokaryotischer RNA nötig. Alternativ könnte die RNA-Analyse mittels Sequenzierung durchgeführt werden. Dabei würde zum einen die Identifikation der prokaryotischen RNA *in silico* erfolgen und zum anderen könnten auch nicht-codierende RNAs bzw. könnte das gesamte Transkriptom analysiert werden (PINTO *et al.*, 2011).

## 5 Zusammenfassung

*Vibrio* spp. sind ubiquitär in marinen Lebensräumen verbreitet und können regelmäßig aus der Umwelt und aus Lebensmitteln (z. B. Garnelen und Krabben) isoliert werden. Der Verzehr von bzw. Kontakt zu Lebensmitteln, die *Vibrio* spp. enthalten, kann beim Menschen zu Erkrankungen führen. Die Spezies sind durch eine hohe genetische Diversität gekennzeichnet. So kann bei *V. parahaemolyticus* z. B. zwischen pandemischen Typen und umweltassoziierten Stämmen unterschieden werden. Neben der genetischen Ausstattung spielen auch Umweltbedingungen, wie z. B. Hitze oder Kälte, eine entscheidende Rolle, Resistenzen gegenüber der Prozessierung und Zubereitung von Lebensmitteln auszubilden bzw. Krankheiten auszulösen.

In 28 % der im deutschen Einzelhandel erstandenen Garnelen- und Krabbenerzeugnisse konnten eine oder mehrere *Vibrio* spp. nachgewiesen werden. Dabei war in nahezu 50 % der *Vibrio* spp.-positiven Proben mindestens ein *V. parahaemolyticus*-Isolat vorhanden. In 45,5 % der *V. parahaemolyticus*-positiven Proben konnte *trh* und in 4,5 % *tdh/trh* nachgewiesen werden.

Mit Hilfe der Multi-Locus-Sequenz-Typisierung (MLST) konnte eine hohe genetische Diversität für die verschiedenen untersuchten *V. parahaemolyticus*-Stamm-Gruppen gezeigt werden. Dabei wurde, wie für Umweltstammsammlungen typisch, ein hoher Anteil neuer Allele und Sequenztypen identifiziert. Stammcluster enthielten hauptsächlich Stämme, die vom selben Kontinent stammten. Die hohe Diversität der Sequenztypen führte zu wenig verlässlichen Verbindungen bei den Analysen auf Nukleotid-Ebene. Die Verlässlichkeit konnte erhöht werden, indem die Beziehungen auf Peptid-Ebene mit Hilfe des neu entwickelten AA-MLST-Typisierungsschemas untersucht wurden. Die dabei beobachtete Abnahme der Diversität beruht vor allem darauf, dass nur nicht-synonyme Nukleotidsubstitutionen zu einer veränderten Aminosäure führen. Auf Peptid-Ebene zeigten die Cluster keine Abhängigkeit zur geographischen Herkunft der Stämme. Vor allem die häufig auftretenden Peptid-Sequenztypen waren durch eine globale Verbreitung gekennzeichnet. Allerdings konnten auch nur lokal auftretende Peptid-Sequenztypen identifiziert werden. Die Analyse der Populationsstruktur ergab – übereinstimmend mit der Literatur –, dass diese dem epidemischen Modell der klonalen Expansion folgt und sich vor allem durch die Lebensweise von *V. parahaemolyticus* erklären lässt, die häufige Anpassungen auch auf genetischer Ebene nötig macht.

Die Studien zur Veränderung der Genexpression bei *V. parahaemolyticus* ergaben, dass Temperaturstress – sowohl bei Kälte als auch Hitze – zu einer globalen Anpassung der Expression durch Repression und Induktion führt. Bei niedrigen Temperaturen wurden vor allem Gene induziert, die mit der Anpassung an atypische Umweltbedingungen assoziiert sind. Dazu zählen u. a. die klassischen Kälteschock-Proteine (CSP), Proteine zur Modifikation der DNA-Topologie, Reparatur der DNA sowie für die Biosynthese und Degradation von Membranbestandteilen. Bei Hitze überwog dagegen die Induktion von Genen, die am Metabolismus oder an Transportprozessen beteiligt sind. Zusätzlich wurden die klassischen Hitzeschock-Proteine (HSP) induziert. Generell konnte eine antagonistische Expression von CSPs und HSPs beobachtet werden. Durch Hitze wurden Gene induziert, die ggf. zu einer Kreuzprotektion gegenüber oxidativem Stress führen könnten. Dagegen könnte durch Kälte die Resistenz gegenüber Säurestress erhöht werden, da Gene der molekularen Säurestress-Antwort induziert wurden. Von den klassischen Pathogenitätsfaktoren, wie z. B.

Exotoxinen und Sekretionssystemen, wurden keine umfassend durch Temperaturstress induziert. Allerdings wurde bei 42 °C eine Induktion von Genen beobachtet, die an der Adhärenz, am Schwärmen und an der Auflösung von Geweben beteiligt sind. Somit könnten die Kolonisierung und/oder Invasion von *V. parahaemolyticus* nach einem Hitzeschock erleichtert sein.



## 6 Summary

*Vibrio* spp. are distributed ubiquitously in marine habitats and are frequently isolated from the environment and seafood (e. g. prawns and mussels). The consumption of and contact to *Vibrio* spp. containing products can lead to infections in humans. The species are characterized by a high genetic diversity. *V. parahaemolyticus* can be differentiated for example into pandemic and environmental strains. Besides the genetic properties, environmental conditions like heat or cold can play a decisive role to mount a resistance against processing and preparation methods of foods or the ability to cause infections.

At least one *Vibrio* spp. was present in 28% of the purchased retail prawn and shrimp samples. Almost 50% of the *Vibrio* spp.-containing samples contained a minimum of one isolate of *V. parahaemolyticus*. In the *V. parahaemolyticus*-positive samples *trh* and in *tdh/trh* were detected in 45.5% and 4.5%, respectively.

Multi Locus Sequence Typing (MLST) revealed a high genetic diversity of all strain groups analyzed. Thereby a high number of new alleles and sequence types was identified as expected for environmental strain collections. Clusters of strains contained mostly strains originating from the same continent. The portion of supra-regionally distributed sequence types differed among the analyzed strain collections. The high diversity of sequence types led to less reliable relationships on nucleotide level. Reliability could be increased by applying the newly developed AA-MLST typing scheme to analyze relationships on peptide level. The observed decrease in diversity is mainly due to the fact that mostly non-synonymous nucleotide substitutions result in an altered amino acid. On peptide level clusters were not related to the geographic origin of strains. Especially the common peptide sequence types were characterized by a global distribution. However peptide sequence types were identified that showed a local distribution only. The analysis of the population structure of *V. parahaemolyticus* revealed – in concordance to the literature – the epidemic model of clonal expansion. Since the lifestyle of *V. parahaemolyticus* in the marine habitat frequently requires adaptations also on genetic level.

The conducted studies on the global gene expression of *V. parahaemolyticus* revealed a global adaptation of expression via repression and induction induced by temperature stresses – by heat as well as by cold. At low temperatures especially genes were induced that are associated to adaptation to atypical conditions, including classical cold shock proteins (CSP), proteins for modification of DNA-topology, DNA-repair as well as for biosynthesis and degradation of membrane components. At high temperatures the induction of genes that are associated to metabolism and transport predominated. Additionally the classical heat shock proteins (HSP) were induced. In general an antagonistic expression of CSPs and HSPs at low and high temperatures was observed. Genes that could lead to a cross protection against oxidative stress were induced by heat. In contrast stress from cold temperatures could improve the resistance against low pH as genes associated to the molecular acid stress response were induced. None of the classical pathogenicity markers (e.g. exotoxins and secretion systems) was induced extensively by temperature stress. However at 42°C an induction of genes was monitored that are related to adherence, swarming and degradation of tissues. Consequently colonization and/or invasion of *V. parahaemolyticus* could be eased after heat shock.

## 7 Literaturverzeichnis

- Abbott SL, Powers C, Kaysner CA, Takeda Y, Ishibashi M, Joseph SW und Janda JM, 1989. Emergence of a restricted bioserovar of *Vibrio parahaemolyticus* as the predominant cause of *Vibrio*-associated gastroenteritis on the West Coast of the United States and Mexico. *J Clin Microbiol* 27:2891-3.
- Abd-Elghany SM und Sallam KI, 2013. Occurrence and molecular identification of *Vibrio parahaemolyticus* in retail shellfish in Mansoura, Egypt. *Food Control* 33:399-405.
- Ahmad A, Brumble L und Maniaci M, 2013. *Vibrio parahaemolyticus* induced necrotizing fasciitis: an atypical organism causing an unusual presentation. *Case Rep Infect Dis* 2013:216854.
- Aiyar SE, Gaal T und Gourse RL, 2002. rRNA promoter activity in the fast-growing bacterium *Vibrio natriegens*. *J Bacteriol* 184:1349-58.
- Alam MJ, Tomochika KI, Miyoshi SI und Shinoda S, 2002. Environmental investigation of potentially pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in the Seto-Inland Sea, Japan. *FEMS Microbiol Lett* 208:83-7.
- Alipour M, Issazadeh K und Soleimani J, 2014. Isolation and identification of from seawater and sediment samples in the southern coast of the Caspian Sea. *Comp Clin Path* 23:129-33.
- Alter T, 2012a. Einleitung, S. 3-6. In: Alter, T., Huehn, S., Strauch, E. und Dieckmann, R. (Hrsgg.), Pathogene Mikroorganismen - Vibrio. Behr's Verlag, Hamburg.
- Alter T, 2012b. Industrierelevanz und Präventionsstrategien, S. 67-75. In: Alter, T., Huehn, S., Strauch, E. und Dieckmann, R. (Hrsgg.), Pathogene Mikroorganismen - Vibrio. Behr's Verlag, Hamburg.
- Alter T, 2012c. Taxonomie und allgemeine Charakteristika, S. 9-13. In: Alter, T., Huehn, S., Strauch, E. und Dieckmann, R. (Hrsgg.), Pathogene Mikroorganismen - Vibrio. Behr's Verlag, Hamburg.
- Altug G, Gurun S, Cardak M, Ciftci PS und Kalkan S, 2012. The occurrence of pathogenic bacteria in some ships' ballast water incoming from various marine regions to the Sea of Marmara, Turkey. *Mar Environ Res* 81:35-42.
- Amin SA, Green DH, Kupper FC und Carrano CJ, 2009. Vibrioferrin, an unusual marine siderophore: iron binding, photochemistry, and biological implications. *Inorg Chem* 48:11451-8.
- Anderson MT und Armstrong SK, 2004. The BfeR regulator mediates enterobactin-inducible expression of *Bordetella* enterobactin utilization genes. *J Bacteriol* 186:7302-11.
- Andrews LS, DeBlanc S, Veal CD und Park DL, 2003a. Response of *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 to a hot water/cold shock pasteurization process. *Food Addit Contam* 20:331-4.
- Andrews SC, Robinson AK und Rodriguez-Quinones F, 2003b. Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiol Rev* 27:215-37.
- Annous BA, Becker LA, Bayles DO, Labeda DP und Wilkinson BJ, 1997. Critical role of anteiso-C15:0 fatty acid in the growth of *Listeria monocytogenes* at low temperatures. *Appl Environ Microbiol* 63:3887-94.
- Ansaruzzaman M, Chowdhury A, Bhuiyan NA, Sultana M, Safa A, Lucas M, von Seidlein L, Barreto A, Chaignat CL, Sack DA, Clemens JD, Nair GB, Choi SY, Jeon YS, Lee JH, Lee HR, Chun J und Kim DW, 2008. Characteristics of a pandemic clone of O3:K6 and O4:K68 *Vibrio parahaemolyticus* isolated in Beira, Mozambique. *J Med Microbiol* 57:1502-7.
- Ansaruzzaman M, Lucas M, Deen JL, Bhuiyan NA, Wang XY, Safa A, Sultana M, Chowdhury A, Nair GB, Sack DA, von Seidlein L, Puri MK, Ali M, Chaignat CL, Clemens JD und Barreto A, 2005. Pandemic serovars (O3:K6 and O4:K68) of *Vibrio parahaemolyticus* associated with diarrhea in Mozambique: spread of the pandemic into the African continent. *J Clin Microbiol* 43:2559-62.
- Aragi Y, Taga N und Simidu U, 1977. Isolation and distribution of oligotrophic marine bacteria. *Can J Microbiol* 23:981-7.
- Arakawa E, Murase T, Shimada T, Okitsu T, Yamai S und Watanabe H, 1999. Emergence and prevalence of a novel *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 clone in Japan. *Jpn J Infect Dis* 52:246-7.
- Arnold CN, McElhanon J, Lee A, Leonhart R und Siegele DA, 2001. Global analysis of *Escherichia coli* gene expression during the acetate-induced acid tolerance response. *J Bacteriol* 183:2178-86.
- Arsene F, Tomoyasu T und Bukau B, 2000. The heat shock response of *Escherichia coli*. *Int J Food Microbiol* 55:3-9.
- Atkinson DE, 1969. Limitation of metabolic concentrations and the conservation of solvent capacity in the living cell, S. 29-43, Current topics in cellular regulation. Academic Press, New York.
- Atlas RM, 1997. Bacterial diversity. In: Fishback, J.E. (Hrsg.), Principles of Microbiology. Wm.C. Brown, Boston.

- Baba K, Shirai H, Terai A, Kumagai K, Takeda Y und Nishibuchi M, 1991. Similarity of the *tdh* gene-bearing plasmids of *Vibrio cholerae* non-O1 and *Vibrio parahaemolyticus*. *Microb Pathog* 10:61-70.
- Baffone W, Citterio B, Vittoria E, Casaroli A, Campana R, Falzano L und Donelli G, 2003. Retention of virulence in viable but non-culturable halophilic *Vibrio* spp. *Int J Food Microbiol* 89:31-9.
- Baffone W, Citterio B, Vittoria E, Casaroli A, Pianetti A, Campana R und Bruscolini F, 2001. Determination of several potential virulence factors in *Vibrio* spp. isolated from sea water. *Food Microbiol* 18:479-88.
- Bagg A und Neilands JB, 1987. Ferric uptake regulation protein acts as a repressor, employing iron (II) as a cofactor to bind the operator of an iron transport operon in *Escherichia coli*. *Biochemistry* 26:5471-7.
- Baker-Austin C, Stockley L, Rangdale R und Martinez-Urtaza J, 2010. Environmental occurrence and clinical impact of *Vibrio vulnificus* and *Vibrio parahaemolyticus*: a European perspective. *Environ Microbiol Rep* 2:7-18.
- Baker-Austin C, Trinanes J, Taylor NGH, Hartnell R, Siitonen A und Martinez-Urtaza J, 2012. Emerging *Vibrio* risk at high latitudes in response to ocean warming. *Nature Clim. Change* 3:73-77.
- Balado M, Osorio CR und Lemos ML, 2008. Biosynthetic and regulatory elements involved in the production of the siderophore vancomycin in *Vibrio anguillarum*. *Microbiology* 154:1400-13.
- Balaji B, O'Connor K, Lucas JR, Anderson JM und Csonka LN, 2005. Timing of induction of osmotically controlled genes in *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium, determined with quantitative real-time reverse transcription-PCR. *Appl Environ Microbiol* 71:8273-83.
- Banerjee SK, Kearney AK, Nadon CA, Peterson CL, Tyler K, Bakouche L, Clark CG, Hoang L, Gilmour MW und Farber JM, 2014. Phenotypic and genotypic characterization of Canadian clinical isolates of *Vibrio parahaemolyticus* - 2000 to 2009. *J Clin Microbiol*.
- Barrett T, Suzek TO, Troup DB, Wilhite SE, Ngau WC, Ledoux P, Rudnev D, Lash AE, Fujibuchi W und Edgar R, 2005. NCBI GEO: mining millions of expression profiles--database and tools. *Nucleic Acids Res* 33:D562-6.
- Bashyam MD und Hasnain SE, 2004. The extracytoplasmic function sigma factors: role in bacterial pathogenesis. *Infect Genet Evol* 4:301-8.
- Bauer A, Ostensvik O, Florvag M, Ormen O und Rorvik LM, 2006. Occurrence of *Vibrio parahaemolyticus*, *V. cholerae*, and *V. vulnificus* in Norwegian Blue Mussels (*Mytilus edulis*). *Appl Environ Microbiol* 72:3058-61.
- Bauer A und Rorvik LM, 2007. A novel multiplex PCR for the identification of *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio cholerae* and *Vibrio vulnificus*. *Lett Appl Microbiol* 45:371-5.
- Begley M, Gahan CG und Hill C, 2005. The interaction between bacteria and bile. *FEMS Microbiol Rev* 29:625-51.
- Benjamini Y und Hochberg Y, 1995. Controlling the false discovery rate - a practical and powerful approach to multiple testing. *J Roy Stst Soc B Met* 57:289-300.
- Bernfield MR und Nirenberg MW, 1965. RNA codewords and protein synthesis. The nucleotide sequences of multiple codewords for phenylalanine, serine, leucine, and proline. *Science* 147:479-84.
- Bhowmick PP, Khushiramani R, Raghunath P und Karunasagar I, 2008. Molecular typing of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from seafood harvested along the south-west coast of India. *Lett Appl Microbiol* 46:198-204.
- Bhuiyan NA, Ansaruzzaman M, Kamruzzaman M, Alam K, Chowdhury NR, Nishibuchi M, Faruque SM, Sack DA, Takeda Y und Nair GB, 2002. Prevalence of the pandemic genotype of *Vibrio parahaemolyticus* in Dhaka, Bangladesh, and significance of its distribution across different serotypes. *J Clin Microbiol* 40:284-6.
- Billington D, Evans CE, Godfrey PP und Coleman R, 1979. Effects of bile salts on the plasma membranes of isolated hepatocytes. *Biochem Soc Trans* 7:947.
- Blake PA, Merson MH, Weaver RE, Hollis DG und Heublein PC, 1979. Disease caused by a marine *Vibrio* - Clinical Characteristics and epidemiology. *N Engl J Med* 300:1-5.
- Blake PA, Weaver RE und Hollis DG, 1980. Diseases of humans (other than cholera) caused by *Vibrios*. *Annu Rev Microbiol* 34:341-67.
- Boer SI, Heinemeyer EA, Luden K, Eler R, Gerds G, Janssen F und Brennholt N, 2013. Temporal and spatial distribution patterns of potentially pathogenic *Vibrio* spp. at recreational beaches of the German North Sea. *Microb Ecol* 65:1052-67.
- Bogosian GANDB, E. V.; Morris, P.J.; O'Neil, J. P., 2000. Recovery of hydrogen peroxide-sensitive culturable cells of *Vibrio vulnificus* gives the appearance of resuscitation from a variable but nonculturable state. *Bacteriol* 182:5070-75.
- Bolstad BM, Irizarry RA, Astrand M und Speed TP, 2003. A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias. *Bioinformatics* 19:185-93.

- Booth IR, Edwards MD, Black S, Schumann U und Miller S, 2007. Mechanosensitive channels in bacteria: signs of closure? *Nat Rev Microbiol* 5:431-40.
- Boyd EF, Cohen AL, Naughton LM, Ussery DW, Binnewies TT, Stine OC und Parent MA, 2008. Molecular analysis of the emergence of pandemic *Vibrio parahaemolyticus*. *BMC Microbiol* 8:110.
- Brazma A, Hingamp P, Quackenbush J, Sherlock G, Spellman P, Stoeckert C, Aach J, Ansorge W, Ball CA, Causton HC, Gaasterland T, Glenisson P, Holstege FC, Kim IF, Markowitz V, Matese JC, Parkinson H, Robinson A, Sarkans U, Schulze-Kremer S, Stewart J, Taylor R, Vilo J und Vingron M, 2001. Minimum information about a microarray experiment (MIAME)-toward standards for microarray data. *Nat Genet* 29:365-71.
- Broberg CA, Calder TJ und Orth K, 2011. *Vibrio parahaemolyticus* cell biology and pathogenicity determinants. *Microbes Infect* 13:992-1001.
- Broberg CA, Zhang L, Gonzalez H, Laskowski-Arce MA und Orth K, 2010. A *Vibrio* effector protein is an inositol phosphatase and disrupts host cell membrane integrity. *Science* 329:1660-2.
- Brown AD, 1976. Microbial water stress. *Bacteriol Rev* 40:803-46.
- Brown AD und Simpson JR, 1972. Water relations of sugar-tolerant yeasts: the role of intracellular polyols. *J Gen Microbiol* 72:589-91.
- Bryan PJ, Steffan RJ, DePaola A, Foster JW und Bej AK, 1999. Adaptive response to cold temperatures in *Vibrio vulnificus*. *Curr Microbiol* 38:168-75.
- Buck JD, 1990. Isolation of *Candida albicans* and halophilic *Vibrio* spp. from aquatic birds in Connecticut and Florida. *Appl Environ Microbiol* 56:826-8.
- Bukau B, 1993. Regulation of the *Escherichia coli* heat-shock response. *Mol Microbiol* 9:671-80.
- Burdette DL, Seemann J und Orth K, 2009. *Vibrio* VopQ induces PI3-kinase-independent autophagy and antagonizes phagocytosis. *Mol Microbiol* 73:639-49.
- Burdette DL, Yarbrough ML, Orvedahl A, Gilpin CJ und Orth K, 2008. *Vibrio parahaemolyticus* orchestrates a multifaceted host cell infection by induction of autophagy, cell rounding, and then cell lysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:12497-502.
- Butler A, 2003. Iron acquisition: straight up and on the rocks? *Nat Struct Biol* 10:240-1.
- Cabiscol E, Tamarit J und Ros J, 2000. Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. *Int Microbiol* 3:3-8.
- Caburlotto G, Lleo MM, Gennari M, Balboa S und Romalde JL, 2011. The use of multiple typing methods allows a more accurate molecular characterization of *Vibrio parahaemolyticus* strains isolated from the Italian Adriatic Sea. *FEMS Microbiol Ecol* 77:611-22.
- Cairrao F, Cruz A, Mori H und Arraiano CM, 2003. Cold shock induction of RNase R and its role in the maturation of the quality control mediator SsrA/tmRNA. *Mol Microbiol* 50:1349-60.
- Calder T, Kinch LN, Fernandez J, Salomon D, Grishin NV und Orth K, 2014. *Vibrio* type III effector VPA1380 is related to the cysteine protease domain of large bacterial toxins. *PLoS One* 9:e104387.
- Calik H, Morrissey MT, Reno PW und An H, 2002. Effect of high-pressure processing on *Vibrio parahaemolyticus* strains in pure culture and Pacific oysters. *Journal of Food Science* 67:1506-10.
- Canny G, Levy O, Furuta GT, Narravula-Alipati S, Sisson RB, Serhan CN und Colgan SP, 2002. Lipid mediator-induced expression of bactericidal/ permeability-increasing protein (BPI) in human mucosal epithelia. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:3902-7.
- Carli A, Pane L, Casareto L, Bertone S und Pruzzo C, 1993. Occurrence of *Vibrio alginolyticus* in Ligurian coast rock pools (Tyrrhenian Sea, Italy) and its association with the copepod *Tigriopus fulvus* (Fisher 1860). *Appl Environ Microbiol* 59:1960-2.
- Carty SM, Sreekumar KR und Raetz CR, 1999. Effect of cold shock on lipid A biosynthesis in *Escherichia coli*. Induction at 12 degrees C of an acyltransferase specific for palmitoleoyl-acyl carrier protein. *J Biol Chem* 274:9677-85.
- Cavallo RA und Stabili L, 2002. Presence of vibrios in seawater and *Mytilus galloprovincialis* (Lam.) from the Mar Piccolo of Taranto (Ionian Sea). *Water Res* 36:3719-26.
- CDC, 2010. Preliminary FoodNet data on the incidence of infection with pathogens transmitted commonly through food - 10 states, 2009. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 59:418-22.
- Chakrabarti S, Sengupta N und Chowdhury R, 1999. Role of DnaK in *in vitro* and *in vivo* expression of virulence factors of *Vibrio cholerae*. *Infect Immun* 67:1025-33.
- Chan B, Miyamoto H, Taniguchi H und Yoshida S, 2002. Isolation and genetic characterization of a novel filamentous bacteriophage, a deleted form of phage f237, from a pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O4:K68 strain. *Microbiol Immunol* 46:565-9.
- Chan YC, Raengpradub S, Boor KJ und Wiedmann M, 2007. Microarray-based characterization of the *Listeria monocytogenes* cold regulon in log- and stationary-phase cells. *Appl Environ Microbiol* 73:6484-98.

- Chang B, Taniguchi H, Miyamoto H und Yoshida S, 1998. Filamentous bacteriophages of *Vibrio parahaemolyticus* as a possible clue to genetic transmission. *J Bacteriol* 180:5094-101.
- Chang CM, Chiang ML und Chou CC, 2004. Response of heat-shocked *Vibrio parahaemolyticus* to subsequent physical and chemical stresses. *J Food Prot* 67:2183-8.
- Chao G, Jiao X, Zhou X, Wang F, Yang Z, Huang J, Pan Z, Zhou L und Qian X, 2010. Distribution of genes encoding four pathogenicity islands (VPals), T6SS, biofilm, and type I pilus in food and clinical strains of *Vibrio parahaemolyticus* in China. *Foodborne Pathog Dis* 7:649-58.
- Chao G, Jiao X, Zhou X, Yang Z, Huang J, Zhou L und Qian X, 2009. Distribution, prevalence, molecular typing, and virulence of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from different sources in coastal province Jiangsu, China. *Food Control* 20:907-12.
- Chao G, Wang F, Zhou X, Jiao X, Huang J, Pan Z, Zhou L und Qian X, 2011. Origin of *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 pandemic clone. *Int J Food Microbiol* 145:459-63.
- Chen M, Guo D, Wong HC, Zhang X, Liu F, Chen H, Liu B, Wang L, Wu F und Feng L, 2012a. Development of O-serogroup specific PCR assay for detection and identification of *Vibrio parahaemolyticus*. *Int J Food Microbiol* 159:122-9.
- Chen SY, Jane WN, Chen YS und Wong HC, 2009. Morphological changes of *Vibrio parahaemolyticus* under cold and starvation stresses. *Int J Food Microbiol* 129:157-65.
- Chen W, Xie Y, Xu J, Wang Q, Gu M, Yang J, Zhou M, Wang D, Shi C und Shi X, 2012b. Molecular typing of *Vibrio parahaemolyticus* isolates from the middle-east coastline of China. *Int J Food Microbiol* 153:402-12.
- Chen W, Yu S, Zhang C, Zhang J, Shi C, Hu Y, Suo B, Cao H und Shi X, 2011. Development of a single base extension-tag microarray for the detection of pathogenic *Vibrio* species in seafood. *Appl Microbiol Biotechnol* 89:1979-90.
- Chiang ML, Chen HC, Wu C und Chen MJ, 2014. Effect of acid adaptation on the environmental stress tolerance of three strains of *Vibrio parahaemolyticus*. *Foodborne Pathog Dis*.
- Chiang ML und Chou CC, 2008. Expression of superoxide dismutase, catalase and thermostable direct hemolysin by, and growth in the presence of various nitrogen and carbon sources of heat-shocked and ethanol-shocked *Vibrio parahaemolyticus*. *Int J Food Microbiol* 121:268-74.
- Chiang ML, Ho WL und Chou CC, 2006. Response of *Vibrio parahaemolyticus* to ethanol shock. *Food Microbiol* 23:461-7.
- Chiang ML, Ho WL und Chou CC, 2008. Ethanol shock changes the fatty acid profile and survival behavior of *Vibrio parahaemolyticus* in various stress conditions. *Food Microbiol* 25:359-65.
- Chiang ML, Yu RC und Chou CC, 2005. Fatty acid composition, cell morphology and responses to challenge by organic acid and sodium chloride of heat-shocked *Vibrio parahaemolyticus*. *Int J Food Microbiol* 104:179-87.
- Chowdhury A, Ishibashi M, Thiem VD, Tuyet DT, Tung TV, Chien BT, Seidlein Lv L, Canh DG, Clemens J, Trach DD und Nishibuchi M, 2004a. Emergence and serovar transition of *Vibrio parahaemolyticus* pandemic strains isolated during a diarrhea outbreak in Vietnam between 1997 and 1999. *Microbiol Immunol* 48:319-27.
- Chowdhury MA, Yamanaka H, Miyoshi S, Aziz KM und Shinoda S, 1989. Ecology of *Vibrio mimicus* in aquatic environments. *Appl Environ Microbiol* 55:2073-8.
- Chowdhury N, Kingston JJ, Whitaker WB, Carpenter MR, Cohen A und Boyd EF, 2014. Sequence and expression divergence of an ancient duplication of the chaperonin groESEL operon in *Vibrio* species. *Microbiology*.
- Chowdhury NR, Chakraborty S, Ramamurthy T, Nishibuchi M, Yamasaki S, Takeda Y und Nair GB, 2000. Molecular evidence of clonal *Vibrio parahaemolyticus* pandemic strains. *Emerg Infect Dis* 6:631-6.
- Chowdhury NR, Stine OC, Morris JG und Nair GB, 2004b. Assessment of evolution of pandemic *Vibrio parahaemolyticus* by multilocus sequence typing. *J Clin Microbiol* 42:1280-2.
- Chun D, Chung JK, Tak R und Seol SY, 1975. Nature of the Kanagawa phenomenon of *Vibrio parahaemolyticus*. *Infect Immun* 12:81-7.
- Colwell RR, Kaper J und Joseph SW, 1977. *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, and other Vibrios: occurrence and distribution in Chesapeake Bay. *Science* 198:394-6.
- Coly I, Sow AG, Seydi M und Martinez-Urtaza J, 2013. *Vibrio cholerae* and *Vibrio parahaemolyticus* detected in seafood products from Senegal. *Foodborne Pathog Dis*.
- Cook DW, 1994. Effect of time and temperature on multiplication of *Vibrio vulnificus* in postharvest Gulf Coast shellstock oysters. *Appl Environ Microbiol* 60:3483-4.
- Cook DW, Bowers JC und DePaola A, 2002. Density of total and pathogenic (*tdh*+) *Vibrio parahaemolyticus* in Atlantic and Gulf coast molluscan shellfish at harvest. *J Food Prot* 65:1873-80.
- Cooper JE und Feil EJ, 2004. Multilocus sequence typing--what is resolved? *Trends Microbiol* 12:373-7.
- Cornelis GR, 2006. The type III secretion injectisome. *Nat Rev Microbiol* 4:811-25.

- Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR und Lappin-Scott HM, 1995. Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol* 49:711-45.
- Craig EA, Gambill BD und Nelson RJ, 1993. Heat shock proteins: molecular chaperones of protein biogenesis. *Microbiol Rev* 57:402-14.
- Croci L, Serratore P, Cozzi L, Stacchini A, Milandri S, Suffredini E und Toti L, 2001. Detection of *Vibrionaceae* in mussels and in their seawater growing area. *Lett Appl Microbiol* 32:57-61.
- Csonka LN und Hanson AD, 1991. Prokaryotic osmoregulation: genetics and physiology. *Annu Rev Microbiol* 45:569-606.
- Culham DE, Lu A, Jishage M, Krogfelt KA, Ishihama A und Wood JM, 2001. The osmotic stress response and virulence in pyelonephritis isolates of *Escherichia coli*: contributions of RpoS, ProP, ProU and other systems. *Microbiology* 147:1657-70.
- da Costa MS, Santos H und Galinski EA, 1998. An overview of the role and diversity of compatible solutes in Bacteria and Archaea. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 61:117-53.
- Dai JH, Lee YS und Wong HC, 1992. Effects of iron limitation on production of a siderophore, outer membrane proteins, and hemolysin and on hydrophobicity, cell adherence, and lethality for mice of *Vibrio parahaemolyticus*. *Infect Immun* 60:2952-6.
- Daniels NA, MacKinnon L, Bishop R, Altekruze S, Ray B, Hammond RM, Thompson S, Wilson S, Bean NH, Griffin PM und Slutsker L, 2000a. *Vibrio parahaemolyticus* infections in the United States, 1973-1998. *J Infect Dis* 181:1661-6.
- Daniels NA, Ray B, Easton A, Marano N, Kahn E, McShan AL, 2nd, Del Rosario L, Baldwin T, Kingsley MA, Puhr ND, Wells JG und Angulo FJ, 2000b. Emergence of a new *Vibrio parahaemolyticus* serotype in raw oysters: a prevention quandary. *JAMA* 284:1541-5.
- Datta PP und Bhadra RK, 2003. Cold shock response and major cold shock proteins of *Vibrio cholerae*. *Appl Environ Microbiol* 69:6361-9.
- DePaola A, Capers GM und Alexander D, 1994. Densities of *Vibrio vulnificus* in the intestines of fish from the US Gulf-Coast. *Appl Environ Microbiol* 60:984-88.
- DePaola A, Hopkins LH, Peeler JT, Wentz B und McPhearson RM, 1990. Incidence of *Vibrio parahaemolyticus* in U.S. coastal waters and oysters. *Appl Environ Microbiol* 56:2299-302.
- DePaola A, Kaysner CA, Bowers J und Cook DW, 2000. Environmental investigations of *Vibrio parahaemolyticus* in oysters after outbreaks in Washington, Texas, and New York (1997 and 1998). *Appl Environ Microbiol* 66:4649-54.
- DePaola A, Motes ML, Cook DW, Veazey J, Garthright WE und Blodgett R, 1997. Evaluation of an alkaline phosphatase-labeled DNA probe for enumeration of *Vibrio vulnificus* in Gulf Coast oysters. *J Microbiol Methods* 29:115-20.
- DePaola A, Nordstrom JL, Bowers JC, Wells JG und Cook DW, 2003a. Seasonal abundance of total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in Alabama oysters. *Appl Environ Microbiol* 69:1521-6.
- DePaola A, Ulaszek J, Kaysner CA, Tenge BJ, Nordstrom JL, Wells J, Puhr N und Gendel SM, 2003b. Molecular, serological, and virulence characteristics of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from environmental, food, and clinical sources in North America and Asia. *Appl Environ Microbiol* 69:3999-4005.
- Dersch P, Kneip S und Bremer E, 1994. The nucleoid-associated DNA-binding protein H-NS is required for the efficient adaptation of *Escherichia coli* K-12 to a cold environment. *Mol Gen Genet* 245:255-9.
- Deter J, Lozach S, Derrien A, Veron A, Chollet J und Hervio-Heath D, 2010a. Chlorophyll *a* might structure a community of potentially pathogenic culturable *Vibrionaceae*. Insights from a one-year study of water and mussels surveyed on the French Atlantic coast. *Environ Microbiol Rep* 2:185-91.
- Deter J, Lozach S, Veron A, Chollet J, Derrien A und Hervio-Heath D, 2010b. Ecology of pathogenic and non-pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* on the French Atlantic coast. Effects of temperature, salinity, turbidity and chlorophyll *a*. *Environ Microbiol* 12:929-37.
- Di Pinto A, Ciccarese G, Tantillo G, Catalano D und Forte VT, 2005. A collagenase-targeted multiplex PCR assay for identification of *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio cholerae*, and *Vibrio parahaemolyticus*. *J Food Prot* 68:150-3.
- Dickenson NE, Zhang L, Epler CR, Adam PR, Picking WL und Picking WD, 2011. Conformational changes in IpaD from *Shigella flexneri* upon binding bile salts provide insight into the second step of type III secretion. *Biochemistry* 50:172-80.
- DiRita VJ und Mekalanos JJ, 1991. Periplasmic interaction between two membrane regulatory proteins, ToxR and ToxS, results in signal transduction and transcriptional activation. *Cell* 64:29-37.
- DiRita VJ, Parsot C, Jander G und Mekalanos JJ, 1991. Regulatory cascade controls virulence in *Vibrio cholerae*. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:5403-7.

- Donlan RM und Costerton JW, 2002. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* 15:167-93.
- Drake SL, DePaola A und Jaykus L-A, 2007. An Overview of *Vibrio vulnificus* and *Vibrio parahaemolyticus*. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 6:120-44.
- Dryselius R, Kurokawa K und Iida T, 2007. *Vibrionaceae*, a versatile bacterial family with evolutionarily conserved variability. *Res Microbiol* 158:479-86.
- Dziejman M und Mekalanos JJ, 1994. Analysis of membrane protein interaction: ToxR can dimerize the amino terminus of phage lambda repressor. *Mol Microbiol* 13:485-94.
- Egan ES, Lobner-Olesen A und Waldor MK, 2004. Synchronous replication initiation of the two *Vibrio cholerae* chromosomes. *Curr Biol* 14:R501-2.
- Ellingsen AB, Olsen JS, Granum PE, Rorvik LM und Gonzalez-Escalona N, 2013. Genetic characterization of *trh* positive *Vibrio* spp. isolated from Norway. *Front Cell Infect Microbiol* 3:107.
- Ellis CN, Schuster BM, Striplin MJ, Jones SH, Whistler CA und Cooper VS, 2012. Influence of seasonality on the genetic diversity of *Vibrio parahaemolyticus* in New Hampshire shellfish waters as determined by multilocus sequence analysis. *Appl Environ Microbiol* 78:3778-82.
- Empadinhas N und da Costa MS, 2008. Osmoadaptation mechanisms in prokaryotes: distribution of compatible solutes. *Int Microbiol* 11:151-61.
- Enos-Berlage JL, Guvener ZT, Keenan CE und McCarter LL, 2005. Genetic determinants of biofilm development of opaque and translucent *Vibrio parahaemolyticus*. *Mol Microbiol* 55:1160-82.
- Enos-Berlage JL und McCarter LL, 2000. Relation of capsular polysaccharide production and colonial cell organization to colony morphology in *Vibrio parahaemolyticus*. *J Bacteriol* 182:5513-20.
- Enright MC und Spratt BG, 1999. Multilocus sequence typing. *Trends Microbiol* 7:482-7.
- Ensgraber M und Loos M, 1992. A 66-kilodalton heat shock protein of *Salmonella typhimurium* is responsible for binding of the bacterium to intestinal mucus. *Infect Immun* 60:3072-8.
- Ermolenko DN und Makhatadze GI, 2002. Bacterial cold-shock proteins. *Cell Mol Life Sci* 59:1902-13.
- Escolar L, Perez-Martin J und de Lorenzo V, 1999. Opening the iron box: transcriptional metalloregulation by the Fur protein. *J Bacteriol* 181:6223-9.
- Euzéby JP, 1997. List of bacterial names with standing in nomenclature: a folder available on the Internet. *International Journal of Systematic Bacteriology* 47:590-2.
- Fabrizi A, Falzano L, Frank C, Donelli G, Matarrese P, Raimondi F, Fasano A und Fiorentini C, 1999. *Vibrio parahaemolyticus* thermostable direct hemolysin modulates cytoskeletal organization and calcium homeostasis in intestinal cultured cells. *Infect Immun* 67:1139-48.
- Fang FC, Libby SJ, Buchmeier NA, Loewen PC, Switala J, Harwood J und Guiney DG, 1992. The alternative sigma factor KatF (RpoS) regulates *Salmonella* virulence. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:11978-82.
- Fang L, Jiang W, Bae W und Inouye M, 1997. Promoter-independent cold-shock induction of *cspA* and its derepression at 37 degrees C by mRNA stabilization. *Mol Microbiol* 23:355-64.
- Fayet O, Ziegelhoffer T und Georgopoulos C, 1989. The *groES* and *groEL* heat shock gene products of *Escherichia coli* are essential for bacterial growth at all temperatures. *J Bacteriol* 171:1379-85.
- FDA, 2005. Quantitative risk assessment on the public health impact of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in raw oysters, S. 1-164. In: U.S. Food and Drug Administration, W. (Hrsg.).
- Feil EJ, 2004. Small change: keeping pace with microevolution. *Nat Rev Microbiol* 2:483-95.
- Feil EJ und Enright MC, 2004. Analyses of clonality and the evolution of bacterial pathogens. *Curr Opin Microbiol* 7:308-13.
- Feil EJ, Li BC, Aanensen DM, Hanage WP und Spratt BG, 2004. eBURST: inferring patterns of evolutionary descent among clusters of related bacterial genotypes from multilocus sequence typing data. *J Bacteriol* 186:1518-30.
- Fernandez-Piquer J, Bowman JP, Ross T und Tamplin ML, 2011. Predictive models for the effect of storage temperature on *Vibrio parahaemolyticus* viability and counts of total viable bacteria in Pacific Oysters (*Crassostrea gigas*). *Appl Environ Microbiol* 77:8687-95.
- Fetherston JD, Bearden SW und Perry RD, 1996. YbtA, an AraC-type regulator of the *Yersinia pestis* pesticin/yersiniabactin receptor. *Mol Microbiol* 22:315-25.
- Fields PA, 2001. Review: Protein function at thermal extremes: balancing stability and flexibility. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 129:417-31.
- Flegel TW und Fegan DF, 2002. Strategies for preventing the spread of fish and shellfish diseases. *Fish Sci* 68:776-88.
- Forbes K und Horne J, 2009. The molecular epidemiology of Scottish *Campylobacter* isolates from human cases of infection using Multilocus Sequence Typing (MLST), S. 1-151, *Campylobacter* MLST Project in Scotland (CaMPS). University of Aberdeen, Aberdeen.
- Foster JW, 1999. When protons attack: microbial strategies of acid adaptation. *Curr Opin Microbiol* 2:170-4.

- Foster JW, 2004. *Escherichia coli* acid resistance: tales of an amateur acidophile. *Nat Rev Microbiol* 2:898-907.
- Francisco AP, Bugalho M, Ramirez M und Carrico JA, 2009. Global optimal eBURST analysis of multilocus typing data using a graphic matroid approach. *BMC Bioinformatics* 10:152.
- Fuenzalida L, Hernandez C, Toro J, Rioseco ML, Romero J und Espejo RT, 2006. *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish and clinical samples during two large epidemics of diarrhoea in southern Chile. *Environ Microbiol* 8:675-83.
- Fujino T, 1974. Discovery of *Vibrio parahaemolyticus*, S. 1-4. In: Fujino, T., Sakaguchi, G., Sakazaki, R. und Takeda, Y. (Hrsgg.), International symposium on *Vibrio parahaemolyticus*. Saikon Publishing Co, Tokyo.
- Fujino T, Okuno Y, Nakada D, Aoyama A, Fukai K, Mukai T und Ueno T, 1953. On the bacteriological examination of shirasu food poisoning. *Med. J. Osaka Univ.* 4:299-304.
- Fukui T, Shiraki K, Hamada D, Hara K, Miyata T, Fujiwara S, Mayanagi K, Yanagihara K, Iida T, Fukusaki E, Imanaka T, Honda T und Yanagihara I, 2005. Thermostable direct hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus* is a bacterial reversible amyloid toxin. *Biochemistry* 44:9825-32.
- Funahashi T, Tanabe T, Shiuchi K, Nakao H und Yamamoto S, 2009. Identification and characterization of genes required for utilization of desferri-ferrichrome and aerobactin in *Vibrio parahaemolyticus*. *Biol Pharm Bull* 32:359-65.
- Gahan CG, O'Mahony J und Hill C, 2001. Characterization of the *groESL* operon in *Listeria monocytogenes*: utilization of two reporter systems (*gfp* and *hly*) for evaluating in vivo expression. *Infect Immun* 69:3924-32.
- Galinski EA, 1995. Osmoadaptation in bacteria. *Adv Microb Physiol* 37:272-328.
- Garcia K, Gavilan RG, Hofle MG, Martinez-Urtaza J und Espejo RT, 2012. Microevolution of pandemic *Vibrio parahaemolyticus* assessed by the number of repeat units in short sequence tandem repeat regions. *PLoS One* 7:e30823.
- Garcia K, Torres R, Uribe P, Hernandez C, Rioseco ML, Romero J und Espejo RT, 2009. Dynamics of clinical and environmental *Vibrio parahaemolyticus* strains during seafood-related summer diarrhea outbreaks in southern Chile. *Appl Environ Microbiol* 75:7482-7.
- Gauthier MJ, 2000. S. 87. In: Colwell, R.R. und Grimes, D.J. (Hrsgg.), Nonculturable microorganisms in the environment. ASM Press, Washington, D.C.
- Gavilan RG, Zamudio ML und Martinez-Urtaza J, 2013. Molecular epidemiology and genetic variation of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in Peru. *PLoS Negl Trop Dis* 7:e2210.
- Georgette D, Blaise V, Collins T, D'Amico S, Gratia E, Hoyoux A, Marx JC, Sonan G, Feller G und Gerday C, 2004. Some like it cold: biocatalysis at low temperatures. *FEMS Microbiol Rev* 28:25-42.
- Gibson DL, White AP, Snyder SD, Martin S, Heiss C, Azadi P, Surette M und Kay WW, 2006. *Salmonella* produces an O-antigen capsule regulated by AgfD and important for environmental persistence. *J Bacteriol* 188:7722-30.
- Gode-Potratz CJ, Kustusich RJ, Breheny PJ, Weiss DS und McCarter LL, 2011. Surface sensing in *Vibrio parahaemolyticus* triggers a programme of gene expression that promotes colonization and virulence. *Mol Microbiol* 79:240-63.
- Gode-Potratz CJ und McCarter LL, 2011. Quorum sensing and silencing in *Vibrio parahaemolyticus*. *J Bacteriol*.
- Goldstein J, Pollitt NS und Inouye M, 1990. Major cold shock protein of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:283-7.
- Göller K, 1999. Identifizierung und Charakterisierung des Ectoin-Genclusters in *Halomonas elongata*. Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.
- Gonzalez-Escalona N, Cachicas V, Acevedo C, Rioseco ML, Vergara JA, Cabello F, Romero J und Espejo RT, 2005. *Vibrio parahaemolyticus* diarrhea, Chile, 1998 and 2004. *Emerg Infect Dis* 11:129-31.
- Gonzalez-Escalona N, Martinez-Urtaza J, Romero J, Espejo RT, Jaykus LA und DePaola A, 2008. Determination of molecular phylogenetics of *Vibrio parahaemolyticus* strains by multilocus sequence typing. *J Bacteriol* 190:2831-40.
- Gophna U und Ron EZ, 2003. Virulence and the heat shock response. *Int J Med Microbiol* 292:453-61.
- Gotoh K, Kodama T, Hiyoshi H, Izutsu K, Park KS, Dryselius R, Akeda Y, Honda T und Iida T, 2010. Bile acid-induced virulence gene expression of *Vibrio parahaemolyticus* reveals a novel therapeutic potential for bile acid sequestrants. *PLoS One* 5:e13365.
- Graumann PL und Marahiel MA, 1998. A superfamily of proteins that contain the cold-shock domain. *Trends Biochem Sci* 23:286-90.
- Hackney CR, Kleeman EG, Ray B und Speck ML, 1980. Adherence as a method of differentiating virulent and avirulent strains of *Vibrio parahaemolyticus*. *Appl Environ Microbiol* 40:652-8.



- Haines-Menges B, Whitaker WB und Boyd EF, 2014. The alternative sigma factor RpoE is important for *Vibrio parahaemolyticus* cell envelope stress response and intestinal colonization. *Infect Immun*.
- Haley BJ, Kokashvili T, Tskshvediani A, Janelidze N, Mitaishvili N, Grim CJ, Constantin de Magny G, Chen AJ, Taviani E, Eliashvili T, Tediashvili M, Whitehouse CA, Colwell RR und Huq A, 2014. Molecular diversity and predictability of *Vibrio parahaemolyticus* along the Georgian coastal zone of the Black Sea. *Front Microbiol* 5:45.
- Han Y, Zhou D, Pang X, Zhang L, Song Y, Tong Z, Bao J, Dai E, Wang J, Guo Z, Zhai J, Du Z, Wang X, Huang P und Yang R, 2005. DNA microarray analysis of the heat- and cold-shock stimulons in *Yersinia pestis*. *Microbes Infect* 7:335-48.
- Hantke K, 2003. Is the bacterial ferrous iron transporter FeoB a living fossil? *Trends Microbiol* 11:192-5.
- Hara-Kudo Y, Sugiyama K, Nishibuchi M, Chowdhury A, Yatsuyanagi J, Ohtomo Y, Saito A, Nagano H, Nishina T, Nakagawa H, Konuma H, Miyahara M und Kumagai S, 2003. Prevalence of pandemic thermostable direct hemolysin-producing *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 in seafood and the coastal environment in Japan. *Appl Environ Microbiol* 69:3883-91.
- Harth-Chu E, Espejo RT, Christen R, Guzman CA und Hofle MG, 2009. Multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis for clonal identification of *Vibrio parahaemolyticus* isolates by using capillary electrophoresis. *Appl Environ Microbiol* 75:4079-88.
- Harth E, Matsuda L, Hernandez C, Rioseco ML, Romero J, Gonzalez-Escalona N, Martinez-Urtaza J und Espejo RT, 2009. Epidemiology of *Vibrio parahaemolyticus* outbreaks, southern Chile. *Emerg Infect Dis* 15:163-8.
- Hazen TH, Martinez RJ, Chen Y, Lafon PC, Garrett NM, Parsons MB, Bopp CA, Sullards MC und Sobecky PA, 2009. Rapid identification of *Vibrio parahaemolyticus* by whole-cell matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Appl Environ Microbiol* 75:6745-56.
- Heinrichs DE und Poole K, 1993. Cloning and sequence analysis of a gene (*pchR*) encoding an AraC family activator of pyochelin and ferripyochelin receptor synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 175:5882-9.
- Helmann JD und Chamberlin MJ, 1988. Structure and function of bacterial sigma factors. *Annu Rev Biochem* 57:839-72.
- Helmann JD, Wu MF, Kobel PA, Gamo FJ, Wilson M, Morshedi MM, Navre M und Paddon C, 2001. Global transcriptional response of *Bacillus subtilis* to heat shock. *J Bacteriol* 183:7318-28.
- Henke JM und Bassler BL, 2004. Three parallel quorum-sensing systems regulate gene expression in *Vibrio harveyi*. *J Bacteriol* 186:6902-14.
- Hilton T, Rosche T, Froelich B, Smith B und Oliver J, 2006. Capsular polysaccharide phase variation in *Vibrio vulnificus*. *Appl Environ Microbiol* 72:6986-93.
- Hino M, Zhang J, Takagi H, Miyoshi T, Uchiumi T, Nakashima T, Kakuta Y und Kimura M, 2014. Characterization of putative toxin-antitoxin systems in *Vibrio parahaemolyticus*. *J Appl Microbiol*.
- Hiyoshi H, Kodama T, Saito K, Gotoh K, Matsuda S, Akeda Y, Honda T und Iida T, 2011. VopV, an F-actin-binding type III secretion effector, is required for *Vibrio parahaemolyticus*-induced enterotoxicity. *Cell Host Microbe* 10:401-9.
- Hlady WG und Klontz KC, 1996. The epidemiology of *Vibrio* infections in Florida, 1981-1993. *J Infect Dis* 173:1176-83.
- Hofmann AF und Eckmann L, 2006. How bile acids confer gut mucosal protection against bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:4333-4.
- Hollander A, Mercante AD, Shafer WM und Cornelissen CN, 2011. The iron-repressed, AraC-like regulator MpeR activates expression of *fetA* in *Neisseria gonorrhoeae*. *Infect Immun* 79:4764-76.
- Holtmann G, 2002. Charakterisierung eines ABC-Transporters für kompatible Solute in dem hyperthermophilen Archaeon *Archaeoglobus fulgidus* und Untersuchungen zur thermoprotektiven Wirkung kompatibler Solute in *Bacillus subtilis*. Philipps-Universität Marburg, Marburg, Doktorarbeit.
- Honda T und Iida T, 1993. The pathogenicity of *Vibrio parahaemolyticus* and the role of the thermostable direct hemolysin and related haemolysins. *Rev Med Microbiol* 4:106-13.
- Honda T, Ni Y, Miwatani T, Adachi T und Kim J, 1992. The thermostable direct hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus* is a pore-forming toxin. *Can J Microbiol* 38:1175-80.
- Honda T, Ni YX und Miwatani T, 1988. Purification and characterization of a hemolysin produced by a clinical isolate of Kanagawa phenomenon-negative *Vibrio parahaemolyticus* and related to the thermostable direct hemolysin. *Infect Immun* 56:961-5.

- Honda T, Nishibuchi M, Miwatani T und Kaper JB, 1986. Demonstration of a plasmid-borne gene encoding a thermostable direct hemolysin in *Vibrio cholerae* non-O1 strains. *Appl Environ Microbiol* 52:1218-20.
- Hood MA und Ness GE, 1982. Survival of *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli* in estuarine waters and sediments. *Appl Environ Microbiol* 43:578-84.
- Huang da W, Sherman BT und Lempicki RA, 2009a. Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic Acids Res* 37:1-13.
- Huang da W, Sherman BT und Lempicki RA, 2009b. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc* 4:44-57.
- Huehn S, 2012a. Epidemiologie und Erkrankung, S. 12-28. In: Alter, T., Huehn, S., Strauch, E. und Dieckmann, R. (Hrsgg.), Pathogene Mikroorganismen - Vibrio. Behr's Verlag, Hamburg.
- Huehn S, 2012b. Molekulare Charakteristika, S. 29-43. In: Alter, T., Huehn, S., Strauch, E. und Dieckmann, R. (Hrsgg.), Pathogene Mikroorganismen - Vibrio. Behr's Verlag, Hamburg.
- Huq A, Small EB, West PA, Huq MI, Rahman R und Colwell RR, 1983. Ecological relationships between *Vibrio cholerae* and planktonic crustacean copepods. *Appl Environ Microbiol* 45:275-83.
- Hurley CC, Quirke A, Reen FJ und Boyd EF, 2006. Four genomic islands that mark post-1995 pandemic *Vibrio parahaemolyticus* isolates. *BMC Genomics* 7:104.
- Iguchi T, Kondo S und Hisatsune K, 1995. *Vibrio parahaemolyticus* O serotypes from O1 to O13 all produce R-type lipopolysaccharide: SDS-PAGE and compositional sugar analysis. *FEMS Microbiol Lett* 130:287-92.
- Iida T, Hattori A, Tagomori K, Nasu H, Naim R und Honda T, 2001. Filamentous phage associated with recent pandemic strains of *Vibrio parahaemolyticus*. *Emerg Infect Dis* 7:477-8.
- Iida T, Makino K, Nasu H, Yokoyama K, Tagomori K, Hattori A, Okuno T, Shinagawa H und Honda T, 2002. Filamentous bacteriophages of vibrios are integrated into the *dif*-like site of the host chromosome. *J Bacteriol* 184:4933-5.
- Iida T, Park KS, Suthienkul O, Kozawa J, Yamaichi Y, Yamamoto K und Honda T, 1998. Close proximity of the *tdh*, *trh* and *ure* genes on the chromosome of *Vibrio parahaemolyticus*. *Microbiology* 144 ( Pt 9):2517-23.
- Imlay JA, 2002. How oxygen damages microbes: oxygen tolerance and obligate anaerobiosis. *Adv Microb Physiol* 46:111-53.
- Imlay JA, 2003. Pathways of oxidative damage. *Annu Rev Microbiol* 57:395-418.
- Ishibashi M, Ohta K, Shimada T, Honda T, Sugiyama J, Miwatani T und Yokoo H, 2000. Current status of OK serotype combinations of *Vibrio parahaemolyticus*. *Nippon Saikingaku Zasshi* 55:539-41.
- Izore T, Job V und Dessen A, 2011. Biogenesis, regulation, and targeting of the type III secretion system. *Structure* 19:603-12.
- Izutsu K, Kurokawa K, Tashiro K, Kuhara S, Hayashi T, Honda T und Iida T, 2008. Comparative genomic analysis using microarray demonstrates a strong correlation between the presence of the 80-kilobase pathogenicity island and pathogenicity in Kanagawa phenomenon-positive *Vibrio parahaemolyticus* strains. *Infect Immun* 76:1016-23.
- Jacobs RR, Heederik D, Douwes J und Zähringer U, 1997. Endotoxin structure. *Int J Occup Environ Med* 3:6-7.
- Jani AJ und Cotter PA, 2010. Type VI secretion: not just for pathogenesis anymore. *Cell Host Microbe* 8:2-6.
- Jebbar M, vonBlohn C und Bremer E, 1997. Ectoine functions as an osmoprotectant in *Bacillus subtilis* and is accumulated via the ABC-transport system OpuC. *Fems Microbiology Letters* 154:325-30.
- Jensen RV, Depasquale SM, Harbolick EA, Hong T, Kernell AL, Kruchko DH, Modise T, Smith CE, McCarter LL und Stevens AM, 2013. Complete genome sequence of pre-pandemic *Vibrio parahaemolyticus* BB22OP. *Genome Announc* 1.
- Jiang W, Hou Y und Inouye M, 1997. CspA, the major cold-shock protein of *Escherichia coli*, is an RNA chaperone. *J Biol Chem* 272:196-202.
- Jiang X und Chai TJ, 1996. Survival of *Vibrio parahaemolyticus* at low temperatures under starvation conditions and subsequent resuscitation of viable, nonculturable cells. *Appl Environ Microbiol* 62:1300-5.
- Johnson CN, Flowers AR, Young VC, Gonzalez-Escalona N, DePaola A, Noriega NF, 3rd und Grimes DJ, 2009. Genetic relatedness among *tdh+* and *trh+* *Vibrio parahaemolyticus* cultured from Gulf of Mexico oysters (*Crassostrea virginica*) and surrounding water and sediment. *Microb Ecol* 57:437-43.
- Johnson DE und Calia FM, 1981. Hemolytic reaction of clinical and environmental strains of *Vibrio vulnificus*. *J Clin Microbiol* 14:457-9.

- Johnston MD und Brown MH, 2002. An investigation into the changed physiological state of *Vibrio* bacteria as a survival mechanism in response to cold temperatures and studies on their sensitivity to heating and freezing. *J Appl Microbiol* 92:1066-77.
- Jolley KA, Chan MS und Maiden MC, 2004. mlstdbNet - distributed multi-locus sequence typing (MLST) databases. *BMC Bioinformatics* 5:86.
- Jolley KA, Feil EJ, Chan MS und Maiden MC, 2001. Sequence type analysis and recombinational tests (START). *Bioinformatics* 17:1230-1.
- Jones PG, Cashel M, Glaser G und Neidhardt FC, 1992. Function of a relaxed-like state following temperature downshifts in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 174:3903-14.
- Jones PG und Inouye M, 1994. The cold-shock response--a hot topic. *Mol Microbiol* 11:811-8.
- Jones PG und Inouye M, 1996. RbfA, a 30S ribosomal binding factor, is a cold-shock protein whose absence triggers the cold-shock response. *Mol Microbiol* 21:1207-18.
- Joseph SW, Colwell RR und Kaper JB, 1982. *Vibrio parahaemolyticus* and related halophilic Vibrios. *Crit Rev Microbiol* 10:77-124.
- Judek K, Graubaum D, Buhler C, Krampitz C und Alter T, 2008. Untersuchungen zur mikrobiologischen Qualität von Muscheln unter besonderer Berücksichtigung der *Campylobacter* spp.- und *Vibrio* spp.-Population, 49. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der DVG. DVG, Garmisch-Partenkirchen.
- Kalburge SS, Whitaker WB und Boyd EF, 2014. High-salt preadaptation of *Vibrio parahaemolyticus* enhances survival in response to lethal environmental stresses. *J Food Prot* 77:246-53.
- Kandror O und Goldberg AL, 1997. Trigger factor is induced upon cold shock and enhances viability of *Escherichia coli* at low temperatures. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:4978-81.
- Kaneko T und Colwell RR, 1973. Ecology of *Vibrio parahaemolyticus* in Chesapeake Bay. *J Bacteriol* 113:24-32.
- Kaper JB, Remmers EF, Lockman H und Colwell RR, 1981. Distribution of *Vibrio parahaemolyticus* in Chesapeake Bay during summer season. *Estuaries* 4:321-27.
- Kapfhammer D, Karatan E, Pflughoeft KJ und Watnick PI, 2005. Role for glycine betaine transport in *Vibrio cholerae* osmoadaptation and biofilm formation within microbial communities. *Appl Environ Microbiol* 71:3840-7.
- Karl DM und Dore JE, 2001. Microbial ecology at sea: sampling, subsampling and incubation considerations. *Methods in Microbiology, Vol 30* 30:13-39.
- Kaysner CA, Abeyta C, Jr., Trost PA, Wetherington JH, Jinneman KC, Hill WE und Wekell MM, 1994. Urea hydrolysis can predict the potential pathogenicity of *Vibrio parahaemolyticus* strains isolated in the Pacific Northwest. *Appl Environ Microbiol* 60:3020-2.
- Kaysner CA, Abeyta C, Jr., Wekell MM, DePaola A, Jr., Stott RF und Leitch JM, 1987. Virulent strains of *Vibrio vulnificus* isolated from estuaries of the United States West Coast. *Appl Environ Microbiol* 53:1349-51.
- Kaysner CA und DePaola A, 2004. *Vibrio*. In: FDA (Hrsg.), Bacteriological Analytical Manual Revision A. U.S. Food and Drug Administration, Arlington.
- Kazmierczak MJ, Wiedmann M und Boor KJ, 2005. Alternative sigma factors and their roles in bacterial virulence. *Microbiol Mol Biol Rev* 69:527-43.
- Kelly MT, 1982. Effect of temperature and salinity on *Vibrio (Beneckeia) vulnificus* occurrence in a Gulf Coast environment. *Appl Environ Microbiol* 44:820-4.
- Khan AA, McCarthy S, Wang RF und Cerniglia CE, 2002. Characterization of United States outbreak isolates of *Vibrio parahaemolyticus* using enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC) PCR and development of a rapid PCR method for detection of O3:K6 isolates. *FEMS Microbiol Lett* 206:209-14.
- Kilstrup M, Jacobsen S, Hammer K und Vogensen FK, 1997. Induction of heat shock proteins DnaK, GroEL, and GroES by salt stress in *Lactococcus lactis*. *Appl Environ Microbiol* 63:1826-37.
- Kimura B, Sekine Y, Takahashi H, Tanaka Y, Obata H, Kai A, Morozumi S und Fujii T, 2008. Multiple-locus variable-number of tandem-repeats analysis distinguishes *Vibrio parahaemolyticus* pandemic O3:K6 strains. *J Microbiol Methods* 72:313-20.
- Kishishita M, Matsuoka N, Kumagai K, Yamasaki S, Takeda Y und Nishibuchi M, 1992. Sequence variation in the thermostable direct hemolysin-related hemolysin (*trh*) gene of *Vibrio parahaemolyticus*. *Appl Environ Microbiol* 58:2449-57.
- Klein SL, Gutierrez West CK, Mejia DM und Lovell CR, 2013. Genes similar to the *Vibrio parahaemolyticus* virulence-related genes *tdh*, *tlh*, and *vscC2* occur in other *Vibrionaceae* species isolated from a pristine estuary. *Appl Environ Microbiol*.
- Kodama T, Gotoh K, Hiyoshi H, Morita M, Izutsu K, Akeda Y, Park KS, Cantarelli VV, Dryselius R, Iida T und Honda T, 2010. Two regulators of *Vibrio parahaemolyticus* play important roles in enterotoxicity by controlling the expression of genes in the Vp-PAI region. *PLoS One* 5:e8678.

- Kodama T, Rokuda M, Park KS, Cantarelli VV, Matsuda S, Iida T und Honda T, 2007. Identification and characterization of VopT, a novel ADP-ribosyltransferase effector protein secreted via the *Vibrio parahaemolyticus* type III secretion system 2. *Cell Microbiol* 9:2598-609.
- Koga T, Katagiri T, Hori H und Takumi K, 2002. Alkaline adaptation induces cross-protection against some environmental stresses and morphological change in *Vibrio parahaemolyticus*. *Microbiol Res* 157:249-55.
- Koga T, Sakamoto F, Yamoto A und Takumi K, 1999. Acid adaptation induces cross-protection against some environmental stresses in *Vibrio parahaemolyticus*. *J Gen Appl Microbiol* 45:155-61.
- Koga T und Takumi K, 1995. Nutrient starvation induces cross protection against heat, osmotic, or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> challenge in *Vibrio parahaemolyticus*. *Microbiol Immunol* 39:213-5.
- Kong IS, Bates TC, Hulsmann A, Hassan H, Smith BE und Oliver JD, 2004. Role of catalase and oxyR in the viable but nonculturable state of *Vibrio vulnificus*. *FEMS Microbiol Ecol* 50:133-42.
- Kong RY, Lee SK, Law TW, Law SH und Wu RS, 2002. Rapid detection of six types of bacterial pathogens in marine waters by multiplex PCR. *Water Res* 36:2802-12.
- Koo J, Jahncke ML, Reno PW, Hu X und Mallikarjunan P, 2006. Inactivation of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* in phosphate-buffered saline and in inoculated whole oysters by high-pressure processing. *J Food Prot* 69:596-601.
- Koralage MS, 2011. Prevalence and molecular characterization of *Vibrio* species in shrimps in Northwestern province of Sri Lanka. Chiang Mai University und Freie Universität Berlin, Masterarbeit.
- Koralage MS, Alter T, Pichpol D, Strauch E, Zessin KH und Huehn S, 2012. Prevalence and molecular characteristics of *Vibrio* spp. isolated from preharvest shrimp of the North Western Province of Sri Lanka. *J Food Prot* 75:1846-50.
- Krachler AM, Ham H und Orth K, 2011. Outer membrane adhesion factor multivalent adhesion molecule 7 initiates host cell binding during infection by gram-negative pathogens. *Proc Natl Acad Sci USA* 108:11614-9.
- Krachler AM und Orth K, 2011. Functional characterization of the interaction between bacterial adhesin multivalent adhesion molecule 7 (MAM7) protein and its host cell ligands. *J Biol Chem* 286:38939-47.
- Krantz GE, Colwell RR und Lovelace E, 1969. *Vibrio parahaemolyticus* from the blue crab *Callinectes sapidus* in Chesapeake Bay. *Science* 164:1286-7.
- Krzywinski MI, Schein JE, Birol I, Connors J, Gascoyne R, Horsman D, Jones SJ und Marra MA, 2009. CircoS: An information aesthetic for comparative genomics. *Genome Res*.
- Kuehl CJ und Crosa JH, 2010. The TonB energy transduction systems in *Vibrio* species. *Future Microbiol* 5:1403-12.
- Kung C, Martinac B und Sukharev S, 2010. Mechanosensitive channels in microbes. *Annu Rev Microbiol* 64:313-29.
- Kural AG und Chen H, 2008. Conditions for a 5-log reduction of *Vibrio vulnificus* in oysters through high hydrostatic pressure treatment. *Int J Food Microbiol* 122:180-7.
- Kuroda T, Mizushima T und Tsuchiya T, 2005. Physiological roles of three Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporters in the halophilic bacterium *Vibrio parahaemolyticus*. *Microbiol Immunol* 49:711-9.
- Kustusich RJ, Kuehl CJ und Crosa JH, 2011. Power plays: iron transport and energy transduction in pathogenic vibrios. *Biometals* 24:559-66.
- Lamark T, Kaasen I, Eshoo MW, Falkenberg P, McDougall J und Strom AR, 1991. DNA sequence and analysis of the *bet* genes encoding the osmoregulatory choline-glycine betaine pathway of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 5:1049-64.
- Lange R und Hengge-Aronis R, 1991. Identification of a central regulator of stationary-phase gene expression in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 5:49-59.
- Langer T, Lu C, Echols H, Flanagan J, Hayer MK und Hartl FU, 1992. Successive action of DnaK, DnaJ and GroEL along the pathway of chaperone-mediated protein folding. *Nature* 356:683-9.
- Laskowski-Arce MA und Orth K, 2008. *Acanthamoeba castellanii* promotes the survival of *Vibrio parahaemolyticus*. *Appl Environ Microbiol* 74:7183-8.
- Lawrence JR, Korber DR und Caldwell DE, 1992. Behavioral analysis of *Vibrio parahaemolyticus* variants in high- and low-viscosity microenvironments by use of digital image processing. *J Bacteriol* 174:5732-9.
- Lawrence JR, Korber DR, Hoyle BD, Costerton JW und Caldwell DE, 1991. Optical sectioning of microbial biofilms. *J Bacteriol* 173:6558-67.
- Lawrence MC, Jivan A, Shao C, Duan L, Goad D, Zaganjor E, Osborne J, McGlynn K, Stippec S, Earnest S, Chen W und Cobb MH, 2008. The roles of MAPKs in disease. *Cell Res* 18:436-42.
- Lee SJ, Xie A, Jiang W, Etchegaray JP, Jones PG und Inouye M, 1994. Family of the major cold-shock protein, CspA (CS7.4), of *Escherichia coli*, whose members show a high sequence similarity with the eukaryotic Y-box binding proteins. *Mol Microbiol* 11:833-9.

- Lehmacher A und Hansen B, 2007. Real-time PCR of virulent *Vibrio parahaemolyticus* in fish and crustacean products. *J Verbr Lebensm* 2:213-17.
- Lesser MP, 2006. Oxidative stress in marine environments: biochemistry and physiological ecology. *Annu Rev Physiol* 68:253-78.
- Levina N, Totemeyer S, Stokes NR, Louis P, Jones MA und Booth IR, 1999. Protection of *Escherichia coli* cells against extreme turgor by activation of MscS and MscL mechanosensitive channels: identification of genes required for MscS activity. *EMBO J* 18:1730-7.
- Lhafi SK und Kuhne M, 2007. Occurrence of *Vibrio* spp. in blue mussels (*Mytilus edulis*) from the German Wadden Sea. *Int J Food Microbiol* 116:297-300.
- Lightner DV, Redman RM, Poulos BT, Nunan LM, Mari JL und Hasson KW, 1997. Risk of spread of penaeid shrimp viruses in the Americas by the international movement of live and frozen shrimp. *Rev Sci Tech* 16:146-60.
- Limthammahisorn S, Brady YJ und Arias CR, 2008. Gene expression of cold shock and other stress-related genes in *Vibrio vulnificus* grown in pure culture under shellstock temperature control conditions. *J Food Prot* 71:157-64.
- Limthammahisorn S, Brady YJ und Arias CR, 2009. *In vivo* gene expression of cold shock and other stress-related genes in *Vibrio vulnificus* during shellstock temperature control conditions in oysters. *J Appl Microbiol* 106:642-50.
- Lin C, Yu RC und Chou CC, 2004. Susceptibility of *Vibrio parahaemolyticus* to various environmental stresses after cold shock treatment. *Int J Food Microbiol* 92:207-15.
- Lin Z, Kumagai K, Baba K, Mekalanos JJ und Nishibuchi M, 1993. *Vibrio parahaemolyticus* has a homolog of the *Vibrio cholerae* *toxRS* operon that mediates environmentally induced regulation of the thermostable direct hemolysin gene. *J Bacteriol* 175:3844-55.
- Lindquist S und Craig EA, 1988. The heat-shock proteins. *Annu Rev Genet* 22:631-77.
- Liverman AD, Cheng HC, Trosky JE, Leung DW, Yarbrough ML, Burdette DL, Rosen MK und Orth K, 2007. Arp2/3-independent assembly of actin by *Vibrio* type III effector VopL. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:17117-22.
- LPSN, 1998. List of prokaryotic names with standing in nomenclature; www.bacterio.net zuletzt zugegriffen am 15.09.2014
- Lucht JM und Bremer E, 1994. Adaptation of *Escherichia coli* to high osmolarity environments: osmoregulation of the high-affinity glycine betaine transport system proU. *FEMS Microbiol Rev* 14:3-20.
- Ludeke CH, Fischer M, Lafon P, Cooper K und Jones JL, 2014. Suitability of the molecular subtyping methods intergenic spacer region, direct genome restriction analysis, and pulsed-field gel electrophoresis for clinical and environmental *Vibrio parahaemolyticus* isolates. *Foodborne Pathog Dis*.
- Luong P, Kinch LN, Brautigam CA, Grishin NV, Tomchick DR und Orth K, 2010. Kinetic and structural insights into the mechanism of AMPylation by VopS Fic domain. *J Biol Chem* 285:20155-63.
- Lynch T, Livingstone S, Buenaventura E, Lutter E, Fedwick J, Buret AG, Graham D und DeVinney R, 2005. *Vibrio parahaemolyticus* disruption of epithelial cell tight junctions occurs independently of toxin production. *Infect Immun* 73:1275-83.
- Ma C, Deng XL, Ke CW, He DM, Liang ZM, Li W, Ke BX, Li BS, Zhang YH, Ng L und Cui ZG, 2014. Epidemiology and etiology characteristics of foodborne outbreaks caused by *Vibrio parahaemolyticus* during 2008-2010 in Guangdong Province, China. *Foodborne Pathog Dis* 11:21-29.
- Ma L, Zhang Y, Yan X, Guo L, Wang L, Qiu J, Yang R und Zhou D, 2012. Expression of the type VI secretion system 1 component Hcp1 is indirectly repressed by OpaR in *Vibrio parahaemolyticus*. *ScientificWorldJournal* 2012:982140.
- Maddocks SE und Oyston PC, 2008. Structure and function of the LysR-type transcriptional regulator (LTTR) family proteins. *Microbiology* 154:3609-23.
- Mahoney JC, Gerding MJ, Jones SH und Whistler CA, 2010. Comparison of the pathogenic potentials of environmental and clinical *Vibrio parahaemolyticus* strains indicates a role for temperature regulation in virulence. *Appl Environ Microbiol* 76:7459-65.
- Maiden MC, Bygraves JA, Feil E, Morelli G, Russell JE, Urwin R, Zhang Q, Zhou J, Zurth K, Caugant DA, Feavers IM, Achtman M und Spratt BG, 1998. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:3140-5.
- Makino K, Oshima K, Kurokawa K, Yokoyama K, Uda T, Tagomori K, Iijima Y, Najima M, Nakano M, Yamashita A, Kubota Y, Kimura S, Yasunaga T, Honda T, Shinagawa H, Hattori M und Iida T, 2003. Genome sequence of *Vibrio parahaemolyticus*: a pathogenic mechanism distinct from that of *V. cholerae*. *Lancet* 361:743-9.
- Mallett JC, Beghian LE und Metcalf T, 1991. Potential of irradiation technology for improved shellfish sanitation. *J Food Saf*:247-58.

- Mann KH, 2009. *Ecology of coastal waters: with implications for management*. John Wiley & Sons, Hoboken, NJ, Vereinigte Staaten.
- Marshall S, Clark CG, Wang G, Mulvey M, Kelly MT und Johnson WM, 1999. Comparison of molecular methods for typing *Vibrio parahaemolyticus*. *J Clin Microbiol* 37:2473-8.
- Martinez-Urtaza J, Blanco-Abad V, Rodriguez-Castro A, Ansede-Bermejo J, Miranda A und Rodriguez-Alvarez MX, 2011. Ecological determinants of the occurrence and dynamics of *Vibrio parahaemolyticus* in offshore areas. *ISME J*.
- Martinez-Urtaza J, Bowers JC, Trinanes J und DePaola A, 2010. Climate anomalies and the increasing risk of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* illnesses. *Food Res Int* 43:1780-90.
- Martinez-Urtaza J, Lozano-Leon A, DePaola A, Ishibashi M, Shimada K, Nishibuchi M und Liebana E, 2004. Characterization of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* isolates from clinical sources in Spain and comparison with Asian and North American pandemic isolates. *J Clin Microbiol* 42:4672-8.
- Martinez-Urtaza J, Simental L, Velasco D, DePaola A, Ishibashi M, Nakaguchi Y, Nishibuchi M, Carrera-Flores D, Rey-Alvarez C und Pousa A, 2005. Pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6, Europe. *Emerg Infect Dis* 11:1319-20.
- Mathur J, Davis BM und Waldor MK, 2007. Antimicrobial peptides activate the *Vibrio cholerae* sigmaE regulon through an OmpU-dependent signalling pathway. *Mol Microbiol* 63:848-58.
- Mathur J und Waldor MK, 2004. The *Vibrio cholerae* ToxR-regulated porin OmpU confers resistance to antimicrobial peptides. *Infect Immun* 72:3577-83.
- Mathur P und Schaffner DW, 2013. Effect of lime juice on *Vibrio parahaemolyticus* and *Salmonella enterica* inactivation during the preparation of the raw fish dish ceviche. *J Food Prot* 76:1027-30.
- Matlawska-Wasowska K, Finn R, Mustel A, O'Byrne CP, Baird AW, Coffey ET und Boyd A, 2010. The *Vibrio parahaemolyticus* Type III Secretion Systems manipulate host cell MAPK for critical steps in pathogenesis. *BMC Microbiol* 10:329.
- Matsuda S, Kodama T, Okada N, Okayama K, Honda T und Iida T, 2010. Association of *Vibrio parahaemolyticus* thermostable direct hemolysin with lipid rafts is essential for cytotoxicity but not hemolytic activity. *Infect Immun* 78:603-10.
- Matsuda S, Okada N, Kodama T, Honda T und Iida T, 2012. A cytotoxic type III secretion effector of *Vibrio parahaemolyticus* targets vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase subunit c and ruptures host cell lysosomes. *PLoS Pathog* 8:e1002803.
- Matsumoto C, Okuda J, Ishibashi M, Iwanaga M, Garg P, Rammamurthy T, Wong HC, DePaola A, Kim YB, Albert MJ und Nishibuchi M, 2000. Pandemic spread of an O3:K6 clone of *Vibrio parahaemolyticus* and emergence of related strains evidenced by arbitrarily primed PCR and toxRS sequence analyses. *J Clin Microbiol* 38:578-85.
- Matsuo T, Nakamura K, Kodama T, Mikami T, Hiyoshi H, Tsuchiya T, Ogawa W und Kuroda T, 2013. Characterization of all RND-type multidrug efflux transporters in *Vibrio parahaemolyticus*. *Microbiologyopen*.
- Matsuo T, Ogawa W, Tsuchiya T und Kuroda T, 2014. Overexpression of vmeTUV encoding a multidrug efflux transporter of *Vibrio parahaemolyticus* causes bile acid resistance. *Gene* 541:19-25.
- Matsuyama J, Yoh M und Honda T, 2008. [Isolation of *Vibrio parahaemolyticus* having new combination of O and K serotypes from traveler's diarrheal patients]. *Kansenshogaku Zasshi* 82:471-2.
- Matz C, Nouri B, McCarter L und Martinez-Urtaza J, 2011. Acquired type III secretion system determines environmental fitness of epidemic *Vibrio parahaemolyticus* in the interaction with bacterivorous protists. *PLoS One* 6:e20275.
- Maurelli AT, Blackmon B und Curtiss R, 3rd, 1984. Temperature-dependent expression of virulence genes in *Shigella* species. *Infect Immun* 43:195-201.
- McCarter L, 1999. The multiple identities of *Vibrio parahaemolyticus*. *J Mol Microbiol Biotechnol* 1:51-7.
- McLaggan D, Naprstek J, Buurman ET und Epstein W, 1994. Interdependence of K<sup>+</sup> and glutamate accumulation during osmotic adaptation of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 269:1911-7.
- McLaughlin JB, DePaola A, Bopp CA, Martinek KA, Napolilli NP, Allison CG, Murray SL, Thompson EC, Bird MM und Middaugh JP, 2005. Outbreak of *Vibrio parahaemolyticus* gastroenteritis associated with Alaskan oysters. *N Engl J Med* 353:1463-70.
- McLaughlin JC, 1995. *Vibrio*, S. 465-76. In: JoBaron, E., Pfaller, M.A., Tenover, F.C., Tenover, R.H. und Murray, P.R. (Hrsgg.), *Manual of Clinical Microbiology*. American Society for Microbiology (ASM) Press, Washington D.C.

- Meador CE, Parsons MM, Bopp CA, Gerner-Smidt P, Painter JA und Vora GJ, 2007. Virulence gene- and pandemic group-specific marker profiling of clinical *Vibrio parahaemolyticus* isolates. *J Clin Microbiol* 45:1133-9.
- Meghji S, White PA, Nair SP, Reddi K, Heron K, Henderson B, Zaliani A, Fossati G, Mascagni P, Hunt JF, Roberts MM und Coates AR, 1997. *Mycobacterium tuberculosis* chaperonin 10 stimulates bone resorption: a potential contributory factor in Pott's disease. *J Exp Med* 186:1241-6.
- Merrell DS, Bailey C, Kaper JB und Camilli A, 2001. The ToxR-mediated organic acid tolerance response of *Vibrio cholerae* requires OmpU. *J Bacteriol* 183:2746-54.
- Merrell DS und Camilli A, 1999. The *cadA* gene of *Vibrio cholerae* is induced during infection and plays a role in acid tolerance. *Mol Microbiol* 34:836-49.
- Merrell DS und Camilli A, 2000. Regulation of *Vibrio cholerae* genes required for acid tolerance by a member of the "ToxR-like" family of transcriptional regulators. *J Bacteriol* 182:5342-50.
- Merrell DS und Camilli A, 2002. Acid tolerance of gastrointestinal pathogens. *Curr Opin Microbiol* 5:51-5.
- Messelhauser U, Colditz J, Tharigen D, Kleih W, Holler C und Busch U, 2010. Detection and differentiation of *Vibrio* spp. in seafood and fish samples with cultural and molecular methods. *Int J Food Microbiol* 142:360-4.
- Miller MB und Bassler BL, 2001. Quorum sensing in bacteria. *Annu Rev Microbiol* 55:165-99.
- Miller VL und Mekalanos JJ, 1984. Synthesis of cholera toxin is positively regulated at the transcriptional level by *toxR*. *Proc Natl Acad Sci USA* 81:3471-5.
- Miller VL und Mekalanos JJ, 1988. A novel suicide vector and its use in construction of insertion mutations: Osmoregulation of outer membrane proteins and virulence determinants in *Vibrio cholerae* requires *toxR*. *J Bacteriol* 170:2575-83.
- Miller VL, Taylor RK und Mekalanos JJ, 1987. Cholera toxin transcriptional activator *toxR* is a transmembrane DNA binding protein. *Cell* 48:271-9.
- Miraglia AG, Travaglione S, Meschini S, Falzano L, Matarrese P, Quaranta MG, Viora M, Fiorentini C und Fabbri A, 2007. Cytotoxic necrotizing factor 1 prevents apoptosis via the Akt/IkappaB kinase pathway: role of nuclear factor-kappaB and Bcl-2. *Mol Biol Cell* 18:2735-44.
- Miyamoto Y, Kato T, Obara Y, Akiyama S, Takizawa K und Yamai S, 1969. *In vitro* hemolytic characteristic of *Vibrio parahaemolyticus*: its close correlation with human pathogenicity. *J Bacteriol* 100:1147-9.
- Miyasaka J, Yahiro S, Arahira Y, Tokunaga H, Katsuki K und Hara-Kudo Y, 2006. Isolation of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* from wild aquatic birds in Japan. *Epidemiol Infect* 134:780-5.
- Miyata ST, Kitaoka M, Wieteska L, Frech C, Chen N und Pukatzki S, 2010. The *Vibrio cholerae* type VI secretion system: evaluating its role in the human disease cholera. *Front Microbiol* 1:117.
- Miyoshi S, Nitanda Y, Fujii K, Kawahara K, Li T, Maehara Y, Ramamurthy T, Takeda Y und Shinoda S, 2008. Differential gene expression and extracellular secretion of the collagenolytic enzymes by the pathogen *Vibrio parahaemolyticus*. *FEMS Microbiol Lett* 283:176-81.
- Miyoshi SI, 2013. Extracellular proteolytic enzymes produced by human pathogenic species. *Front Microbiol* 4:339.
- Molenda JR, Johnson WG, Fishbein M, Wentz B, Mehlman IJ und Dadisman TA, Jr., 1972. *Vibrio parahaemolyticus* gastroenteritis in Maryland: laboratory aspects. *Appl Microbiol* 24:444-8.
- Mols M und Abee T, 2011. Primary and secondary oxidative stress in *Bacillus*. *Environ Microbiol* 13:1387-94.
- Morita MT, Tanaka Y, Kodama TS, Kyogoku Y, Yanagi H und Yura T, 1999. Translational induction of heat shock transcription factor sigma32: evidence for a built-in RNA thermosensor. *Genes Dev* 13:655-65.
- Motes ML, DePaola A, Cook DW, Veazey JE, Hunsucker JC, Garthright WE, Blodgett RJ und Chirtel SJ, 1998. Influence of water temperature and salinity on *Vibrio vulnificus* in Northern Gulf and Atlantic Coast oysters (*Crassostrea virginica*). *Appl Environ Microbiol* 64:1459-65.
- Nair GB, Ramamurthy T, Bhattacharya SK, Dutta B, Takeda Y und Sack DA, 2007. Global dissemination of *Vibrio parahaemolyticus* serotype O3:K6 and its serovariants. *Clin Microbiol Rev* 20:39-48.
- Nair S, Kitatsukamoto K und Simidu U, 1988. Bacterial-flora of healthy and abnormal chaetognaths. *Nippon Suisan Gakkaishi* 54:491-96.
- Nakamaru Y, Takahashi Y, Unemoto T und Nakamura T, 1999. Mechanosensitive channel functions to alleviate the cell lysis of marine bacterium, *Vibrio alginolyticus*, by osmotic downshock. *FEBS Lett* 444:170-2.
- Nakashima K, Kanamaru K, Mizuno T und Horikoshi K, 1996. A novel member of the *cspA* family of genes that is induced by cold shock in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 178:2994-7.

- Namgoong S, Boczkowska M, Glista MJ, Winkelman JD, Rebowski G, Kovar DR und Dominguez R, 2011. Mechanism of actin filament nucleation by *Vibrio* VopL and implications for tandem W domain nucleation. *Nat Struct Mol Biol* 18:1060-7.
- Nasu H, Iida T, Sugahara T, Yamaichi Y, Park KS, Yokoyama K, Makino K, Shinagawa H und Honda T, 2000. A filamentous phage associated with recent pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 strains. *J Clin Microbiol* 38:2156-61.
- Naughton LM, Blumerman SL, Carlberg M und Boyd EF, 2009. Osmoadaptation among *Vibrio* species and unique genomic features and physiological responses of *Vibrio parahaemolyticus*. *Appl Environ Microbiol* 75:2802-10.
- Nei M und Gojobori T, 1986. Simple methods for estimating the numbers of synonymous and nonsynonymous nucleotide substitutions. *Mol Biol Evol* 3:418-26.
- Nelson D und Cox M, 2008. *Lehninger Principles of Biochemistry*. W.H. Freeman and Company, New York.
- Newton AE, Garrett N, Stroika SG, Halpin JL, Turnsek M und Mody RK, 2014. Increase in *Vibrio parahaemolyticus* infections associated with consumption of Atlantic Coast shellfish - 2013. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 63:335-6.
- Nielsen AT, Dolganov NA, Otto G, Miller MC, Wu CY und Schoolnik GK, 2006. RpoS controls the *Vibrio cholerae* mucosal escape response. *PLoS Pathog* 2:e109.
- Nikaido H, 2003. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol Mol Biol Rev* 67:593-656.
- Nishibuchi M, Ishibashi M, Takeda Y und Kaper JB, 1985. Detection of the thermostable direct hemolysin gene and related DNA sequences in *Vibrio parahaemolyticus* and other *vibrio* species by the DNA colony hybridization test. *Infect Immun* 49:481-6.
- Nishibuchi M, Janda JM und Ezaki T, 1996. The thermostable direct hemolysin gene (*tdh*) of *Vibrio hollisae* is dissimilar in prevalence to and phylogenetically distant from the *tdh* genes of other vibrios: implications in the horizontal transfer of the *tdh* gene. *Microbiol Immunol* 40:59-65.
- Nishibuchi M und Kaper JB, 1990. Duplication and variation of the thermostable direct haemolysin (*tdh*) gene in *Vibrio parahaemolyticus*. *Mol Microbiol* 4:87-99.
- Nishibuchi M und Kaper JB, 1995. Thermostable direct hemolysin gene of *Vibrio parahaemolyticus*: a virulence gene acquired by a marine bacterium. *Infect Immun* 63:2093-9.
- Nishibuchi M, Taniguchi T, Misawa T, Khaeomanee-lam V, Honda T und Miwatani T, 1989. Cloning and nucleotide sequence of the gene (*trh*) encoding the hemolysin related to the thermostable direct hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus*. *Infect Immun* 57:2691-7.
- Nishikawa Y, Ogasawara J und Kimura T, 1993. Heat and acid sensitivity of motile *Aeromonas*: a comparison with other food-poisoning bacteria. *Int J Food Microbiol* 18:271-8.
- Nolan CM, Ballard J, Kaysner CA, Lilja JL, Williams LP, Jr. und Tenover FC, 1984. *Vibrio parahaemolyticus* gastroenteritis. An outbreak associated with raw oysters in the Pacific northwest. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2:119-28.
- Nydam SD, Shah DH und Call DR, 2014. Transcriptome analysis of *Vibrio parahaemolyticus* in type III secretion system 1 inducing conditions. *Front Cell Infect Microbiol* 4:1.
- O'Malley SM, Mouton SL, Occhino DA, Deanda MT, Rashidi JR, Fuson KL, Rashidi CE, Mora MY, Payne SM und Henderson DP, 1999. Comparison of the heme iron utilization systems of pathogenic Vibrios. *J Bacteriol* 181:3594-8.
- O'Neill KR, Jones SH und Grimes DJ, 1992. Seasonal incidence of *Vibrio vulnificus* in the Great Bay estuary of New Hampshire and Maine. *Appl Environ Microbiol* 58:3257-62.
- O'Toole G, Kaplan HB und Kolter R, 2000. Biofilm formation as microbial development. *Annu Rev Microbiol* 54:49-79.
- Oberbeckmann S, Wichels A, Maier T, Kostrzewa M, Raffelberg S und Gerdts G, 2011a. A polyphasic approach for the differentiation of environmental *Vibrio* isolates from temperate waters. *FEMS Microbiol Ecol* 75:145-62.
- Oberbeckmann S, Wichels A, Wiltshire KH und Gerdts G, 2011b. Occurrence of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio alginolyticus* in the German Bight over a seasonal cycle. *Anton Leeuw Int J G* 100:291-307.
- Ohnishi K, Nakahira K, Unzai S, Mayanagi K, Hashimoto H, Shiraki K, Honda T und Yanagihara I, 2011. Relationship between heat-induced fibrillogenicity and hemolytic activity of thermostable direct hemolysin and a related hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus*. *FEMS Microbiol Lett* 318:10-7.
- Okabe S, 1974. Statistical review of food poisoning in Japan, especially that by *Vibrio parahaemolyticus*. , S. 5-8. In: Fujino, T., Sakaguchi, G., Sakazaki, R. und Takeda, Y. (Hrsgg.), International symposium on *Vibrio parahaemolyticus*. Saikon Publishing Co., Tokyo.
- Okada K, Iida T, Kita-Tsukamoto K und Honda T, 2005. Vibrios commonly possess two chromosomes. *J Bacteriol* 187:752-7.



- Okada N, Iida T, Park KS, Goto N, Yasunaga T, Hiyoshi H, Matsuda S, Kodama T und Honda T, 2009. Identification and characterization of a novel type III secretion system in *trh*-positive *Vibrio parahaemolyticus* strain TH3996 reveal genetic lineage and diversity of pathogenic machinery beyond the species level. *Infect Immun* 77:904-13.
- Okuda J, Ishibashi M, Hayakawa E, Nishino T, Takeda Y, Mukhopadhyay AK, Garg S, Bhattacharya SK, Nair GB und Nishibuchi M, 1997. Emergence of a unique O3:K6 clone of *Vibrio parahaemolyticus* in Calcutta, India, and isolation of strains from the same clonal group from Southeast Asian travelers arriving in Japan. *J Clin Microbiol* 35:3150-5.
- Okura M, Osawa R, Iguchi A, Arakawa E, Terajima J und Watanabe H, 2003. Genotypic analyses of *Vibrio parahaemolyticus* and development of a pandemic group-specific multiplex PCR assay. *J Clin Microbiol* 41:4676-82.
- Olafsen JA, Mikkelsen HV, Gjaever HM und Hovik Hansen G, 1993. Indigenous bacteria in hemolymph and tissues of marine bivalves at low temperatures. *Appl Environ Microbiol* 59:1848-54.
- Oliver JD, 2000. In: Colwell, R.R. und Grimes, D.J. (Hrsgg.), Nonculturable microorganisms in the environment. ASM Press, Washington, D.C.
- Oliver JD, 2010. Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 34:415-25.
- Oliver JD und Bockian R, 1995. *In vivo* resuscitation, and virulence towards mice, of viable but nonculturable cells of *Vibrio vulnificus*. *Appl Environ Microbiol* 61:2620-3.
- Oliver JD und Kaper JB, 1997. *Vibrio* species. In: Doyle, M.P., Beuchat, L.R. und Montville, T.J. (Hrsgg.), Foodmicrobiology: Fundamentals and Frontiers. ASM Press, Washington DC, USA.
- Oliver JD, Warner RA und Cleland DR, 1982. Distribution and ecology of *Vibrio vulnificus* and other lactose-fermenting marine vibrios in coastal waters of the southeastern United States. *Appl Environ Microbiol* 44:1404-14.
- Ongagna-Yhombi SY und Boyd EF, 2013. The biosynthesis of the osmoprotectant ectoine but not glycine betaine is critical for the survival of osmotically stressed *Vibrio parahaemolyticus* cells. *Appl Environ Microbiol*.
- Ono T, Park KS, Ueta M, Iida T und Honda T, 2006. Identification of proteins secreted via *Vibrio parahaemolyticus* type III secretion system 1. *Infect Immun* 74:1032-42.
- Ophir T und Gutnick DL, 1994. A role for exopolysaccharides in the protection of microorganisms from desiccation. *Appl Environ Microbiol* 60:740-5.
- Osawa R, Arakawa E, Okitsu T, Yamai S und Watanabe H, 2002a. Levels of thermostable direct hemolysin produced by *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 and other serovars grown anaerobically with the presence of a bile acid. *Curr Microbiol* 44:302-5.
- Osawa R, Iguchi A, Arakawa E und Watanabe H, 2002b. Genotyping of pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 still open to question. *J Clin Microbiol* 40:2708-9.
- Osawa R und Yamai S, 1996. Production of thermostable direct hemolysin by *Vibrio parahaemolyticus* enhanced by conjugated bile acids. *Appl Environ Microbiol* 62:3023-5.
- Osorio J, Carvajal A, Naharro G, La T, Phillips ND, Rubio P und Hampson DJ, 2012. Dissemination of clonal groups of *Brachyspira hyodysenteriae* amongst pig farms in Spain, and their relationships to isolates from other countries. *PLoS One* 7:e39082.
- Otta SK, Karunasagar I und Karunasagar I, 1999. Bacterial flora associated with shrimp culture ponds growing *Panaeus monodon* in India. *Journal of Aquaculture in Tropics* 14:309-18.
- Otta SK, Karunasagar I und Karunasagar I, 2001. Bacteriological study of shrimp, *Penaeus monodon* Fabricius, hatcheries in India. *J Appl Ichthyol* 17:59-63.
- Ottemann KM und Mekalanos JJ, 1995. Analysis of *Vibrio cholerae* ToxR function by construction of novel fusion proteins. *Mol Microbiol* 15:719-31.
- Oxley AP, Shipton W, Owens L und McKay D, 2002. Bacterial flora from the gut of the wild and cultured banana prawn, *Penaeus merguensis*. *J Appl Microbiol* 93:214-23.
- Pacini F, 1854. Osservazione microscopiche e deduzioni patologiche sul cholera asiatico. *Gazette Medica de Italiana Toscano Firenze* 6:405-12.
- Pan TM, Chiou CS, Hsu SY, Huang HC, Wang TK, Chiu SI, Yea HL und Lee CL, 1996. Food-borne disease outbreaks in Taiwan, 1994. *J Formos Med Assoc* 95:417-20.
- Pan TM, Wang TK, Lee CL, Chien SW und Horng CB, 1997. Food-borne disease outbreaks due to bacteria in Taiwan, 1986 to 1995. *J Clin Microbiol* 35:1260-2.
- Panicker G, Call DR, Krug MJ und Bej AK, 2004. Detection of pathogenic *Vibrio* spp. in shellfish by using multiplex PCR and DNA microarrays. *Appl Environ Microbiol* 70:7436-44.
- Paranjpye R, Hamel O, Stojanovski A und Liermann M, 2012. Genetic diversity of clinical and environmental *Vibrio parahaemolyticus* strains from the Pacific Northwest. *Appl Environ Microbiol*.

- Park KS, Iida T, Yamaichi Y, Oyagi T, Yamamoto K und Honda T, 2000. Genetic characterization of DNA region containing the *trh* and *ure* genes of *Vibrio parahaemolyticus*. *Infect Immun* 68:5742-8.
- Park KS, Ono T, Rokuda M, Jang MH, Iida T und Honda T, 2004a. Cytotoxicity and enterotoxicity of the thermostable direct hemolysin-deletion mutants of *Vibrio parahaemolyticus*. *Microbiol Immunol* 48:313-8.
- Park KS, Ono T, Rokuda M, Jang MH, Okada K, Iida T und Honda T, 2004b. Functional characterization of two type III secretion systems of *Vibrio parahaemolyticus*. *Infect Immun* 72:6659-65.
- Park S, You X und Imlay JA, 2005. Substantial DNA damage from submicromolar intracellular hydrogen peroxide detected in Hpx<sup>-</sup> mutants of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:9317-22.
- Parvathi A, Kumar HS, Bhanumathi A, Ishibashi M, Nishibuchi M und Karunasagar I, 2006. Molecular characterization of thermostable direct haemolysin-related haemolysin (TRH)-positive *Vibrio parahaemolyticus* from oysters in Mangalore, India. *Environ Microbiol* 8:997-1004.
- Pazhani GP, Bhowmik SK, Ghosh S, Guin S, Dutta S, Rajendran K, Saha DR, Nandy RK, Bhattacharya MK, Mukhopadhyay AK und Ramamurthy T, 2014. Trends in the epidemiology of pandemic and non-pandemic strains of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from diarrheal patients in Kolkata, India. *PLoS Negl Trop Dis* 8:e2815.
- Perez-Losada M, Browne EB, Madsen A, Wirth T, Viscidi RP und Crandall KA, 2006. Population genetics of microbial pathogens estimated from multilocus sequence typing (MLST) data. *Infect Genet Evol* 6:97-112.
- Peters S, Baross JA und Morita RY, 1982. Partial purification and characterization of hemolysin from a psychrotrophic kanagawa-positive marine *Vibrio*. *Appl Environ Microbiol* 43:39-49.
- Pflughoeft KJ, Kierek K und Watnick PI, 2003. Role of ectoine in *Vibrio cholerae* osmoadaptation. *Appl Environ Microbiol* 69:5919-27.
- Phadtare S, 2004. Recent developments in bacterial cold-shock response. *Curr Issues Mol Biol* 6:125-36.
- Phadtare S, 2011. Unwinding activity of cold shock proteins and RNA metabolism. *RNA Biol* 8:394-7.
- Phadtare S, Alsina J und Inouye M, 1999. Cold-shock response and cold-shock proteins. *Curr Opin Microbiol* 2:175-80.
- Phadtare S und Inouye M, 2004. Genome-wide transcriptional analysis of the cold shock response in wild-type and cold-sensitive, quadruple-*csp*-deletion strains of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 186:7007-14.
- Phadtare S und Severinov K, 2005. Extended -10 motif is critical for activity of the *cspA* promoter but does not contribute to low-temperature transcription. *J Bacteriol* 187:6584-9.
- Phadtare S, Yamanaka K und Inouye M, 2000. The cold shock response, S. 33-46. In: Storz, G. und Hengge-Aronis, R. (Hrsgg.), *Bacterial Stress Response*. ASM Press, Washington, DC.
- Pineyro P, Zhou X, Orfe LH, Friel PJ, Lahmers K und Call DR, 2010. Development of two animal models to study the function of *Vibrio parahaemolyticus* type III secretion systems. *Infect Immun* 78:4551-9.
- Pinto AC, Melo-Barbosa HP, Miyoshi A, Silva A und Azevedo V, 2011. Application of RNA-seq to reveal the transcript profile in bacteria. *Genet Mol Res* 10:1707-18.
- Provenzano D und Klose KE, 2000. Altered expression of the ToxR-regulated porins OmpU and OmpT diminishes *Vibrio cholerae* bile resistance, virulence factor expression, and intestinal colonization. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:10220-4.
- Provenzano D, Schuhmacher DA, Barker JL und Klose KE, 2000. The virulence regulatory protein ToxR mediates enhanced bile resistance in *Vibrio cholerae* and other pathogenic *Vibrio* species. *Infect Immun* 68:1491-7.
- Quilici ML, Robert-Pillot A, Picart J und Fournier JM, 2005. Pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 spread, France. *Emerg Infect Dis* 11:1148-9.
- Raghunath P, 2011. Genetic markers of pandemic *Vibrio parahaemolyticus*: Are they truly unique? *Foodborne Pathog Dis* 8:653-4.
- Rahman KM, Duggal P, Harris JB, Saha SK, Streatfield PK, Ryan ET, Calderwood SB, Qadri F, Yunus M und LaRocque RC, 2009. Familial aggregation of *Vibrio cholerae*-associated infection in Matlab, Bangladesh. *J Health Popul Nutr* 27:733-8.
- Randt S, Huehn S, Herrfurth D, Pund R, Strauch E und Alter T, 2011. Die lebensmittelhygienische Bedeutung des Vorkommens von Vibriolen in Muscheln. *RFL* 63:93-96.
- Rappuoli R, Arico B und Scarlato V, 1992. Thermoregulation and reversible differentiation in Bordetella: a model for pathogenic bacteria. *Mol Microbiol* 6:2209-11.
- Rashid HO, Ito H und Ishigaki I, 1992. Distribution of pathogenic vibrios and other bacteria in imported frozen shrimps and their decontamination by gamma-irradiation. *World J Microbiol Biotechnol* 8:494-99.

- Ratledge C und Dover LG, 2000. Iron metabolism in pathogenic bacteria. *Annu Rev Microbiol* 54:881-941.
- Records AR, 2011. The type VI secretion system: a multipurpose delivery system with a phage-like machinery. *Mol Plant Microbe Interact* 24:751-7.
- Reen F und Boyd E, 2005. *Vibrio* species: pathogenesis and stress response. In: Griffiths, M. (Hrsg.), Understanding pathogen behaviour - virulence, stress response and resistance. Woodhead Publishing Limited, Cambridge England
- Reen FJ, Almagro-Moreno S, Ussery D und Boyd EF, 2006. The genomic code: inferring *Vibrionaceae* niche specialization. *Nat Rev Microbiol* 4:697-704.
- Ripabelli G, Sammarco ML, Grasso GM, Fanelli I, Caprioli A und Luzzi I, 1999. Occurrence of *Vibrio* and other pathogenic bacteria in *Mytilus galloprovincialis* (mussels) harvested from Adriatic Sea, Italy. *Int J of Food Microbiol* 49:43-48.
- Rippey SR, 1994. Infectious diseases associated with molluscan shellfish consumption. *Clin Microbiol Rev* 7:419-25.
- Ritchie JM, Rui H, Zhou X, Iida T, Kodoma T, Ito S, Davis BM, Bronson RT und Waldor MK, 2012. Inflammation and disintegration of intestinal villi in an experimental model for *Vibrio parahaemolyticus*-induced diarrhea. *PLoS Pathog* 8:e1002593.
- Rivera IN, Souza KM, Souza CP und Lopes RM, 2012. Free-living and plankton-associated vibrios: assessment in ballast water, harbor areas, and coastal ecosystems in Brazil. *Front Microbiol* 3:443.
- Roberts MF, 2004. Osmoadaptation and osmoregulation in archaea: update 2004. *Front Biosci* 9:1999-2019.
- Rodrigues DF und Tiedje JM, 2008. Coping with our cold planet. *Appl Environ Microbiol* 74:1677-86.
- Rodriguez-Romo LA und Yousef AE, 2002. Microbial stress adaptation and safety of produce, S. 95-114. In: Gorny, J.R., Yousef, A.E. und Sapers, G.M. (Hrsgg.), Microbiology of fruits and vegetables. CRC Press, Boca Raton, USA.
- Roland FP, 1970. Leg gangrene and endotoxin shock due to *Vibrio parahaemolyticus* - an infection acquired in New England coastal waters. *N Engl J Med* 282:1306.
- Romano S, Aujoulat F, Jumas-Bilak E, Masnou A, Jeannot JL, Falsen E, Marchandin H und Teyssier C, 2009. Multilocus sequence typing supports the hypothesis that *Ochrobactrum anthropi* displays a human-associated subpopulation. *BMC Microbiol* 9:267.
- Rouquette C, de Chastellier C, Nair S und Berche P, 1998. The ClpC ATPase of *Listeria monocytogenes* is a general stress protein required for virulence and promoting early bacterial escape from the phagosome of macrophages. *Mol Microbiol* 27:1235-45.
- Rouquette C, Ripio MT, Pellegrini E, Bolla JM, Tascon RI, Vazquez-Boland JA und Berche P, 1996. Identification of a ClpC ATPase required for stress tolerance and *in vivo* survival of *Listeria monocytogenes*. *Mol Microbiol* 21:977-87.
- Rowe I, Elahi M, Huq A und Sukharev S, 2013. The mechano-electrical response of the cytoplasmic membrane of *Vibrio cholerae*. *J Gen Physiol* 142:75-85.
- Ruiz GM, Rawlings TK, Dobbs FC, Drake LA, Mullady T, Huq A und Colwell RR, 2000. Global spread of microorganisms by ships. *Nature* 408:49-50.
- Sakazaki R, Iwanami S und Fukumi H, 1963. Studies on the enteropathogenic, facultatively halophilic bacteria, *Vibrio parahaemolyticus*. I. Morphological, cultural and biochemical properties and its taxonomical position. *Jpn J Med Sci Biol* 16:161-88.
- Sakurai J, Matsuzaki A und Miwatani T, 1973. Purification and characterization of thermostable direct hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus*. *Infect Immun* 8:775-80.
- Salomon D, Gonzalez H, Updegraff BL und Orth K, 2013a. *Vibrio parahaemolyticus* type VI secretion system 1 is activated in marine conditions to target bacteria, and is differentially regulated from system 2. *PLoS One* 8:e61086.
- Salomon D, Guo Y, Kinch LN, Grishin NV, Gardner KH und Orth K, 2013b. Effectors of animal and plant pathogens use a common domain to bind host phosphoinositides. *Nat Commun* 4:2973.
- Salomon D, Klimko JA und Orth K, 2014. H-NS regulates the *Vibrio parahaemolyticus* type VI secretion system 1. *Microbiology*.
- Salotra P, Singh DK, Seal KP, Krishna N, Jaffe H und Bhatnagar R, 1995. Expression of DnaK and GroEL homologs in *Leuconostoc esenteroides* in response to heat shock, cold shock or chemical stress. *FEMS Microbiol Lett* 131:57-62.
- Santos H und da Costa MS, 2002. Compatible solutes of organisms that live in hot saline environments. *Environ Microbiol* 4:501-9.
- Sarkar BL, Nair GB, Sircar BK und Pal SC, 1983. Incidence and level of *Vibrio parahaemolyticus* associated with freshwater plankton. *Appl Environ Microbiol* 46:288-90.
- Scallan E, Hoekstra RM, Angulo FJ, Tauxe RV, Widdowson MA, Roy SL, Jones JL und Griffin PM, 2011. Foodborne illness acquired in the United States - major pathogens. *Emerg Infect Dis* 17:7-15.

- Segal G und Ron EZ, 1998. Regulation of heat-shock response in bacteria. *Ann N Y Acad Sci* 851:147-51.
- Shimohata T, Nakano M, Lian X, Shigeyama T, Iba H, Hamamoto A, Yoshida M, Harada N, Yamamoto H, Yamato M, Mawatari K, Tamaki T, Nakaya Y und Takahashi A, 2011. *Vibrio parahaemolyticus* infection induces modulation of IL-8 secretion through dual pathway via VP1680 in Caco-2 cells. *J Infect Dis* 203:537-44.
- Shimohata T und Takahashi A, 2010. Diarrhea induced by infection of *Vibrio parahaemolyticus*. *J Med Invest* 57:179-82.
- Shinoda S, 2011. Sixty years from the discovery of *Vibrio parahaemolyticus* and some recollections. *Biocontrol Sci* 16:129-37.
- Shirliff ME, Mader JT und Camper AK, 2002. Molecular interactions in biofilms. *Chem Biol* 9:859-71.
- Sieffert M und Stolle A, 2002. Nachweis und Differenzierung von *Vibrio* spp. in Krusten- und Schalentieren. *Bundesgesundheitsbl - Gesundheitsforsch - Gesundheitsschutz* 45:507-13.
- Silverman JM, Brunet YR, Cascales E und Mougous JD, 2012. Structure and regulation of the type VI secretion system. *Annu Rev Microbiol* 66:453-72.
- Simpson LM, White VK, Zane SF und Oliver JD, 1987. Correlation between virulence and colony morphology in *Vibrio vulnificus*. *Infect Immun* 55:269-72.
- Sinensky M, 1974. Homeoviscous adaptation - a homeostatic process that regulates the viscosity of membrane lipids in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 71:522-5.
- Skowrya D, Georgopoulos C und Zylicz M, 1990. The *E. coli* *dnaK* gene product, the hsp70 homolog, can reactivate heat-inactivated RNA polymerase in an ATP hydrolysis-dependent manner. *Cell* 62:939-44.
- Slayton RB, Newton AE, Depaola A, Jones JL und Mahon BE, 2013. Clam-associated vibriosis, USA, 1988-2010. *Epidemiol Infect*:1-6.
- Sleator RD und Hill C, 2002. Bacterial osmoadaptation: the role of osmolytes in bacterial stress and virulence. *FEMS Microbiol Rev* 26:49-71.
- Smith A, Hooper NI, Shipulina N und Morgan WT, 1996. Heme binding by a bacterial repressor protein, the gene product of the ferric uptake regulation (*fur*) gene of *Escherichia coli*. *J Protein Chem* 15:575-83.
- Smith B und Oliver JD, 2006. *In situ* and *in vitro* gene expression by *Vibrio vulnificus* during entry into, persistence within, and resuscitation from the viable but nonculturable state. *Appl Environ Microbiol* 72:1445-51.
- Smith JM, Feil EJ und Smith NH, 2000. Population structure and evolutionary dynamics of pathogenic bacteria. *Bioessays* 22:1115-22.
- Smith JM, Smith NH, O'Rourke M und Spratt BG, 1993. How clonal are bacteria? *Proc Natl Acad Sci USA* 90:4384-8.
- Smyth GK, 2004. Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Stat Appl Genet Mol Biol* 3:Article3.
- Sochard MR und Colwell RR, 1976. Tolerance and other biological properties of *Vibrio parahaemolyticus* endotoxins. *Jpn J Microbiol* 20:309-19.
- Sochard MR und Colwell RR, 1979. Analysis of *Vibrio parahaemolyticus* soluble antigens by employing passive hemagglutination. *J Clin Microbiol* 10:890-6.
- Somerville GA und Proctor RA, 2009. At the crossroads of bacterial metabolism and virulence factor synthesis in Staphylococci. *Microbiol Mol Biol Rev* 73:233-48.
- Spratt BG, 1999. Multilocus sequence typing: molecular typing of bacterial pathogens in an era of rapid DNA sequencing and the internet. *Curr Opin Microbiol* 2:312-6.
- Spratt BG und Maiden MC, 1999. Bacterial population genetics, evolution and epidemiology. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 354:701-10.
- Straley SC und Perry RD, 1995. Environmental modulation of gene expression and pathogenesis in *Yersinia*. *Trends Microbiol* 3:310-7.
- Strauch E und Dieckmann R, 2012. Nachweis und Identifizierung von Vibrionen, S. 46-68. In: Alter, T., Huehn, S., Strauch, E. und Dieckmann, R. (Hrsgg.), Pathogene Mikroorganismen - Vibrio. Behr's Verlag, Hamburg.
- Strom MS und Paranjpye RN, 2000. Epidemiology and pathogenesis of *Vibrio vulnificus*. *Microbes Infect* 2:177-88.
- Sturn A, Quackenbush J und Trajanoski Z, 2002. Genesis: cluster analysis of microarray data. *Bioinformatics* 18:207-8.
- Su YC und Liu C, 2007. *Vibrio parahaemolyticus*: a concern of seafood safety. *Food Microbiol* 24:549-58.
- Suffredini E, Lopez-Joven C, Maddalena L, Croci L und Roque A, 2011. Pulsed-Field Gel Electrophoresis and PCR Characterization of Environmental *Vibrio parahaemolyticus* Strains of Different Origins. *Appl Environ Microbiol* 77:6301-4.

- Suffredini E, Mioni R, Mazzette R, Bordin P, Serratore P, Fois F, Piano A, Cozzi L und Croci L, 2014. Detection and quantification of *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish from Italian production areas. *Int J Food Microbiol*.
- Tada J, Ohashi T, Nishimura N, Shirasaki Y, Ozaki H, Fukushima S, Takano J, Nishibuchi M und Takeda Y, 1992. Detection of the thermostable direct hemolysin gene (tdh) and the thermostable direct hemolysin-related hemolysin gene (trh) of *Vibrio parahaemolyticus* by polymerase chain reaction. *Mol Cell Probes* 6:477-87.
- Tamplin M, Rodrick GE, Blake NJ und Cuba T, 1982. Isolation and characterization of *Vibrio vulnificus* from two Florida estuaries. *Appl Environ Microbiol* 44:1466-70.
- Tamplin ML und Capers GM, 1992. Persistence of *Vibrio vulnificus* in tissues of Gulf Coast oysters, *Crassostrea virginica*, exposed to seawater disinfected with UV light. *Appl Environ Microbiol* 58:1506-10.
- Tanabe T, Funahashi T, Nakao H, Miyoshi S, Shinoda S und Yamamoto S, 2003. Identification and characterization of genes required for biosynthesis and transport of the siderophore vibrioferrin in *Vibrio parahaemolyticus*. *J Bacteriol* 185:6938-49.
- Tanabe T, Funahashi T, Okajima N, Nakao H, Takeuchi Y, Miyamoto K, Tsujibo H und Yamamoto S, 2011. The *Vibrio parahaemolyticus* *pvuA1* gene (formerly termed *psuA*) encodes a second ferric vibrioferrin receptor that requires *tonB2*. *FEMS Microbiol Lett* 324:73-9.
- Tanabe T, Funahashi T, Shiuchi K, Okajima N, Nakao H, Miyamoto K, Tsujibo H und Yamamoto S, 2012. Characterization of *Vibrio parahaemolyticus* genes encoding the systems for utilization of enterobactin as a xenosiderophore. *Microbiology* 158:2039-49.
- Tanabe T, Takata N, Naka A, Moon YH, Nakao H, Inoue Y, Narimatsu S und Yamamoto S, 2005. Identification of an AraC-like regulator gene required for induction of the 78-kDa ferrioxamine B receptor in *Vibrio vulnificus*. *FEMS Microbiol Lett* 249:309-14.
- Tanaka Y, Kimura B, Takahashi H, Watanabe T, Obata H, Kai A, Morozumi S und Fujii T, 2008. Lysine decarboxylase of *Vibrio parahaemolyticus*: kinetics of transcription and role in acid resistance. *J Appl Microbiol* 104:1283-93.
- Taniguchi H, Hirano H, Kubomura S, Higashi K und Mizuguchi Y, 1986. Comparison of the nucleotide sequences of the genes for the thermostable direct hemolysin and the thermolabile hemolysin from *Vibrio parahaemolyticus*. *Microb Pathog* 1:425-32.
- Taniguchi H, Sato K, Ogawa M, Udou T und Mizuguchi Y, 1984. Isolation and characterization of a filamentous phage, Vf33, specific for *Vibrio parahaemolyticus*. *Microbiol Immunol* 28:327-37.
- Theethakaew C, Feil EJ, Castillo-Ramirez S, Aanensen DM, Suthienkul O, Neil DM und Davies RL, 2013. Genetic relationships of *Vibrio parahaemolyticus* isolates from clinical, human carrier and environmental sources in Thailand determined by multilocus sequence analysis. *Appl Environ Microbiol* 79:2358-70.
- Thompson FL, Iida T und Swings J, 2004. Biodiversity of vibrios. *Microbiol Mol Biol Rev* 68:403-31.
- Thompson FL und Swings J, 2006. Taxonomy of the vibrios, S. 29-43. In: Thompson, F.L., Austin, B. und Swings, J. (Hrsgg.), The biology of vibrios. ASM Press, Washington DC.
- Thongjun J, Mittraparp-Arthorn P, Yingkajorn M, Kongreung J, Nishibuchi M und Vuddhakul V, 2013. The trend of *Vibrio parahaemolyticus* infections in southern Thailand from 2006 to 2010. *Trop Med Health* 41:151-6.
- Trevors JT, Bej AK, Mojib N, van Elsas JD und Van Overbeek L, 2012. Bacterial gene expression at low temperatures. *Extremophiles*.
- Trosky JE, Li Y, Mukherjee S, Keitany G, Ball H und Orth K, 2007. VopA inhibits ATP binding by acetylating the catalytic loop of MAPK kinases. *J Biol Chem* 282:34299-305.
- Trosky JE, Mukherjee S, Burdette DL, Roberts M, McCarter L, Siegel RM und Orth K, 2004. Inhibition of MAPK signaling pathways by VopA from *Vibrio parahaemolyticus*. *J Biol Chem* 279:51953-7.
- Turner JW, Malayil L, Guadagnoli D, Cole D und Lipp EK, 2013a. Detection of *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus* and *Vibrio cholerae* with respect to seasonal fluctuations in temperature and plankton abundance. *Environ Microbiol*.
- Turner JW, Paranjpye RN, Landis ED, Biryukov SV, Gonzalez-Escalona N, Nilsson WB und Strom MS, 2013b. Population structure of clinical and environmental *Vibrio parahaemolyticus* from the Pacific Northwest Coast of the United States. *PLoS One* 8:e55726.
- van Belkum A, Tassios PT, Dijkshoorn L, Haeggman S, Cookson B, Fry NK, Fussing V, Green J, Feil E, Gerner-Smidt P, Brisse S und Struelens M, 2007. Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. *Clin Microbiol Infect* 13 Suppl 3:1-46.
- Vandenbergh J, Verdonck L, Robles-Arozarena R, Rivera G, Bolland A, Balladares M, Gomez-Gil B, Calderon J, Sorgeloos P und Swings J, 1999. Vibrios associated with *Litopenaeus vannamei* larvae, postlarvae, broodstock, and hatchery probionts. *Appl Environ Microbiol* 65:2592-7.

- Vanderzant C und Nickelson R, 1972. Survival of *Vibrio parahaemolyticus* in shrimp tissue under various environmental conditions. *Appl Microbiol* 23:34-7.
- Vaseeharan B und Ramasamy P, 2003. Abundance of potentially pathogenic micro-organisms in *Penaeus monodon* larvae rearing systems in India. *Microbiol Res* 158:299-308.
- Vasudevan P und Venkitanarayanan K, 2006. Role of the *rpoS* gene in the survival of *Vibrio parahaemolyticus* in artificial seawater and fish homogenate. *J Food Prot* 69:1438-42.
- Velazquez-Roman J, Leon-Sicairos N, de Jesus Hernandez-Diaz L und Canizalez-Roman A, 2014. Pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 on the American continent. *Front Cell Infect Microbiol* 3:110.
- Visca P, Leoni L, Wilson MJ und Lamont IL, 2002. Iron transport and regulation, cell signalling and genomics: lessons from *Escherichia coli* and *Pseudomonas*. *Mol Microbiol* 45:1177-90.
- von Bodman SB, Willey JM und Diggle SP, 2008. Cell-cell communication in bacteria: united we stand. *J Bacteriol* 190:4377-91.
- Vora GJ, Meador CE, Bird MM, Bopp CA, Andreadis JD und Stenger DA, 2005. Microarray-based detection of genetic heterogeneity, antimicrobial resistance, and the viable but nonculturable state in human pathogenic *Vibrio* spp. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:19109-14.
- Vorachek-Warren MK, Carty SM, Lin S, Cotter RJ und Raetz CR, 2002. An *Escherichia coli* mutant lacking the cold shock-induced palmitoleoyltransferase of lipid A biosynthesis: absence of unsaturated acyl chains and antibiotic hypersensitivity at 12 degrees C. *J Biol Chem* 277:14186-93.
- Vos M und Didelot X, 2009. A comparison of homologous recombination rates in bacteria and archaea. *ISME J* 3:199-208.
- Wagatsuma S, 1968. A medium for the test of the hemolytic activity of *Vibrio parahaemolyticus*. *Media Circle* 13:159-62.
- Waldor MK und Mekalanos JJ, 1996. Lysogenic conversion by a filamentous phage encoding cholera toxin. *Science* 272:1910-4.
- Walecka E und Bania J, 2012. Stress Response in *Listeria monocytogenes*, S. 91-24. In: Requena, J.M. (Hrsg.), Stress response in Microbiology. Caister Academic Press, Norfolk, UK.
- Walsh NP, Alba BM, Bose B, Gross CA und Sauer RT, 2003. OMP peptide signals initiate the envelope-stress response by activating DegS protease via relief of inhibition mediated by its PDZ domain. *Cell* 113:61-71.
- Wang H, Chen S, Zhang J, Rothenbacher FP, Jiang T, Kan B, Zhong Z und Zhu J, 2012. Catalases promote resistance of oxidative stress in *Vibrio cholerae*. *PLoS One* 7:e53383.
- Wang JJ, Zhang ZH, Li JB, Lin T, Pan YJ und Zhao Y, 2014. Modeling *Vibrio parahaemolyticus* inactivation by acidic electrolyzed water on cooked shrimp using response surface methodology. *Food Control* 36:273-79.
- Wang JY und Syvanen M, 1992. DNA twist as a transcriptional sensor for environmental changes. *Mol Microbiol* 6:1861-6.
- Wang L, Ling Y, Jiang H, Qiu Y, Qiu J, Chen H, Yang R und Zhou D, 2013. AphA is required for biofilm formation, motility, and virulence in pandemic *Vibrio parahaemolyticus*. *Int J Food Microbiol* 160:245-51.
- Wang N, Yamanaka K und Inouye M, 1999. CspI, the ninth member of the CspA family of *Escherichia coli*, is induced upon cold shock. *J Bacteriol* 181:1603-9.
- Waterman SR und Small PL, 1998. Acid-sensitive enteric pathogens are protected from killing under extremely acidic conditions of pH 2.5 when they are inoculated onto certain solid food sources. *Appl Environ Microbiol* 64:3882-6.
- Waters CM und Bassler BL, 2005. Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21:319-46.
- Watnick PI, Eto T, Takahashi H und Calderwood SB, 1997. Purification of *Vibrio cholerae* fur and estimation of its intracellular abundance by antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay. *J Bacteriol* 179:243-7.
- Weber MH und Marahiel MA, 2003. Bacterial cold shock responses. *Sci Prog* 86:9-75.
- Weiss J, Elsbach P, Olsson I und Odeberg H, 1978. Purification and characterization of a potent bactericidal and membrane active protein from the granules of human polymorphonuclear leukocytes. *J Biol Chem* 253:2664-72.
- Welsh DT, 2000. Ecological significance of compatible solute accumulation by micro-organisms: from single cells to global climate. *FEMS Microbiol Rev* 24:263-90.
- Whitaker WB und Boyd EF, 2012. Adaptation to environmental changes: stress response mechanisms among *Vibrio* species, S. 201-28. In: Requena, J.M. (Hrsg.), Stress response in Microbiology. Caister Academic Press, Norfolk, UK.
- Whitaker WB, Parent MA, Naughton LM, Richards GP, Blumberman SL und Boyd EF, 2010. Modulation of responses of *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 to pH and temperature stresses by growth at different salt concentrations. *Appl Environ Microbiol* 76:4720-9.

- Whitesides MD und Oliver JD, 1997. Resuscitation of *Vibrio vulnificus* from the viable but nonculturable state. *Appl Environ Microbiol* 63:1002-5.
- Wilson M, 2001. Bacterial biofilms and human disease. *Sci Prog* 84:235-54.
- Wilson M, McNab R und Henderson B, 2002. *Bacterial Disease Mechanisms: An Introduction to Cellular Microbiology*. University Press, Cambridge.
- Wiltshire KH und Manly BFJ, 2004. The warming trend at Helgoland Roads, North Sea: phytoplankton response. *Helgoland Marine Research* 58:269-73.
- Woese CR, 1965. Order in the genetic code. *Proc Natl Acad Sci USA* 54:71-5.
- Wolf PW und Oliver JD, 1992. Temperature effects on the viable but non-culturable state of *Vibrio vulnificus*. *FEMS Microbiol Ecol* 101:33-39.
- Wong HC, Chen MC, Liu SH und Liu DP, 1999a. Incidence of highly genetically diversified *Vibrio parahaemolyticus* in seafood imported from Asian countries. *Int J Food Microbiol* 52:181-8.
- Wong HC und Lee YS, 1994. Regulation of iron on bacterial growth and production of thermostable direct hemolysin by *Vibrio parahaemolyticus* in intraperitoneal infected mice. *Microbiol Immunol* 38:367-71.
- Wong HC und Lin CH, 2001. Evaluation of typing of *Vibrio parahaemolyticus* by three PCR methods using specific primers. *J Clin Microbiol* 39:4233-40.
- Wong HC, Liu CC, Pan TM, Wang TK, Lee CL und Shih DY, 1999b. Molecular typing of *Vibrio parahaemolyticus* isolates, obtained from patients involved in food poisoning outbreaks in Taiwan, by random amplified polymorphic DNA analysis. *J Clin Microbiol* 37:1809-12.
- Wong HC, Liu SH, Ku LW, Lee IY, Wang TK, Lee YS, Lee CL, Kuo LP und Shih DY, 2000a. Characterization of *Vibrio parahaemolyticus* isolates obtained from foodborne illness outbreaks during 1992 through 1995 in Taiwan. *J Food Prot* 63:900-6.
- Wong HC, Liu SH, Wang TK, Lee CL, Chiou CS, Liu DP, Nishibuchi M und Lee BK, 2000b. Characteristics of *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 from Asia. *Appl Environ Microbiol* 66:3981-6.
- Wong HC, Lu KT, Pan TM, Lee CL und Shih DY, 1996. Subspecies typing of *Vibrio parahaemolyticus* by pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Microbiol* 34:1535-9.
- Wong HC, Peng PY, Han JM, Chang CY und Lan SL, 1998. Effect of mild acid treatment on the survival, enteropathogenicity, and protein production in *Vibrio parahaemolyticus*. *Infect Immun* 66:3066-71.
- Wong HC, Peng PY, Lan SL, Chen YC, Lu KH, Shen CT und Lan SF, 2002. Effects of heat shock on the thermotolerance, protein composition, and toxin production of *Vibrio parahaemolyticus*. *J Food Prot* 65:499-507.
- Wong HC, Shen CT, Chang CN, Lee YS und Oliver JD, 2004a. Biochemical and virulence characterization of viable but nonculturable cells of *Vibrio parahaemolyticus*. *J Food Prot* 67:2430-5.
- Wong HC und Wang P, 2004. Induction of viable but nonculturable state in *Vibrio parahaemolyticus* and its susceptibility to environmental stresses. *J Appl Microbiol* 96:359-66.
- Wong HC, Wang P, Chen SY und Chiu SW, 2004b. Resuscitation of viable but non-culturable *Vibrio parahaemolyticus* in a minimum salt medium. *FEMS Microbiol Lett* 233:269-75.
- Wood JM, 2011. Bacterial osmoregulation: a paradigm for the study of cellular homeostasis. *Annu Rev Microbiol* 65:215-38.
- Wood RR und Arias CR, 2011. Evaluation of global gene expression during cold shock in the human pathogen *Vibrio vulnificus*. *Mar Biotechnol (NY)*.
- Wright AC, Hill RT, Johnson JA, Roghman MC, Colwell RR und Morris JG, Jr., 1996. Distribution of *Vibrio vulnificus* in the Chesapeake Bay. *Appl Environ Microbiol* 62:717-24.
- Wright AC, Powell JL, Kaper JB und Morris JG, Jr., 2001. Identification of a group 1-like capsular polysaccharide operon for *Vibrio vulnificus*. *Infect Immun* 69:6893-901.
- Xu C, Ren H, Wang S und Peng X, 2004. Proteomic analysis of salt-sensitive outer membrane proteins of *Vibrio parahaemolyticus*. *Res Microbiol* 155:835-42.
- Xu M, Wang J und Mou H, 2013. Fatty acid profiles of *Vibrio parahaemolyticus* and its changes with environment. *J Basic Microbiol*.
- Xu M, Yamamoto K, Honda T und Ming X, 1994. Construction and characterization of an isogenic mutant of *Vibrio parahaemolyticus* having a deletion in the thermostable direct hemolysin-related hemolysin gene (trh). *J Bacteriol* 176:4757-60.
- Yamanaka K, Fang L und Inouye M, 1998. The CspA family in *Escherichia coli*: multiple gene duplication for stress adaptation. *Mol Microbiol* 27:247-55.
- Yamanaka K und Inouye M, 1997. Growth-phase-dependent expression of *cspD*, encoding a member of the CspA family in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 179:5126-30.
- Yan Y, Cui Y, Han H, Xiao X, Wong HC, Tan Y, Guo Z, Liu X, Yang R und Zhou D, 2011. Extended MLST-based population genetics and phylogeny of *Vibrio parahaemolyticus* with high levels of recombination. *Int J Food Microbiol* 145:106-12.

- Yanagihara I, Nakahira K, Yamane T, Kaieda S, Mayanagi K, Hamada D, Fukui T, Ohnishi K, Kajiyama S, Shimizu T, Sato M, Ikegami T, Ikeguchi M, Honda T und Hashimoto H, 2010. Structure and functional characterization of *Vibrio parahaemolyticus* thermostable direct hemolysin. *J Biol Chem* 285:16267-74.
- Yang L, Zhan L, Han H, Gao H, Guo Z, Qin C, Yang R, Liu X und Zhou D, 2010. The low-salt stimulon in *Vibrio parahaemolyticus*. *Int J Food Microbiol* 137:49-54.
- Yang L, Zhou D, Liu X, Han H, Zhan L, Guo Z, Zhang L, Qin C, Wong HC und Yang R, 2009. Cold-induced gene expression profiles of *Vibrio parahaemolyticus*: a time-course analysis. *FEMS Microbiol Lett* 291:50-8.
- Yano Y, Hamano K, Satomi M, Tsutsui I, Ban M und Aue-Umneyoy D, 2014. Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Vibrio* species related to food safety isolated from shrimp cultured at inland ponds in Thailand. *Food Control* 38:30-36.
- Yarbrough ML, Li Y, Kinch LN, Grishin NV, Ball HL und Orth K, 2009. AMPylation of Rho GTPases by *Vibrio* VopS disrupts effector binding and downstream signaling. *Science* 323:269-72.
- Yeung PS und Boor KJ, 2004. Epidemiology, pathogenesis, and prevention of foodborne *Vibrio parahaemolyticus* infections. *Foodborne Pathog Dis* 1:74-88.
- Yeung PS, Hayes MC, DePaola A, Kaysner CA, Kornstein L und Boor KJ, 2002. Comparative phenotypic, molecular, and virulence characterization of *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 isolates. *Appl Environ Microbiol* 68:2901-9.
- Yildiz FH und Schoolnik GK, 1998. Role of *rpoS* in stress survival and virulence of *Vibrio cholerae*. *J Bacteriol* 180:773-84.
- Yoh M, Honda T und Miwatani T, 1985. Production by non-O1 *Vibrio cholerae* of hemolysin related to thermostable direct hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus*. *FEMS Microbiol Lett* 29:197-200.
- Yoshida S, Ogawa M und Mizuguchi Y, 1985. Relation of capsular materials and colony opacity to virulence of *Vibrio vulnificus*. *Infect Immun* 47:446-51.
- Yoshimizu M, Kimura T und Sakai M, 1976. Studies on intestinal microflora of salmonids. 1. intestinal microflora of fish reared in fresh-water and sea-water. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* 42:91-99.
- Yu B, Cheng HC, Brautigam CA, Tomchick DR und Rosen MK, 2011a. Mechanism of actin filament nucleation by the bacterial effector VopL. *Nat Struct Mol Biol* 18:1068-74.
- Yu Y, Hu W, Wu B, Zhang P, Chen J, Wang S und Fang W, 2011b. *Vibrio parahaemolyticus* isolates from southeastern Chinese coast are genetically diverse with circulation of clonal complex 3 strains since 2002. *Foodborne Pathog Dis* 8:1169-76.
- Yu Y, Yang H, Li J, Zhang P, Wu B, Zhu B, Zhang Y und Fang W, 2012. Putative type VI secretion systems of *Vibrio parahaemolyticus* contribute to adhesion to cultured cell monolayers. *Arch Microbiol*.
- Yura T, Nagai H und Mori H, 1993. Regulation of the heat-shock response in bacteria. *Annu Rev Microbiol* 47:321-50.
- Zahm JA, Padrick SB, Chen Z, Pak CW, Yunus AA, Henry L, Tomchick DR und Rosen MK, 2013. The bacterial effector VopL organizes actin into filament-like structures. *Cell* 155:423-34.
- Zarei M, Jamnejad A und Khajehali E, 2014. Antibacterial effect of silver nanoparticles against four foodborne pathogens. *Jundishapur Journal of Microbiology* 7.
- Zhang H, Sun S, Shi W, Cui L und Gu Q, 2013. Serotype, virulence, and genetic traits of foodborne and clinical *Vibrio parahaemolyticus* isolates in Shanghai, China. *Foodborne Pathog Dis* 10:796-804.
- Zhang L, Krachler AM, Broberg CA, Li Y, Mirzaei H, Gilpin CJ und Orth K, 2012. Type III effector VopC mediates invasion for *Vibrio* species. *Cell Rep* 1:453-60.
- Zhang L und Orth K, 2013. Virulence determinants for *Vibrio parahaemolyticus* infection. *Curr Opin Microbiol*.
- Zhang W, Jayarao BM und Knabel SJ, 2004. Multi-virulence-locus sequence typing of *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol* 70:913-20.
- Ziegler C, Bremer E und Kramer R, 2010. The BCCT family of carriers: from physiology to crystal structure. *Mol Microbiol* 78:13-34.
- Zimmerman AM, DePaola A, Bowers JC, Krantz JA, Nordstrom JL, Johnson CN und Grimes DJ, 2007. Variability of total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* densities in northern Gulf of Mexico water and oysters. *Appl Environ Microbiol* 73:7589-96.



## 8 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen ganz herzlich danken, die mich bei der Erstellung dieser Arbeit unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Thomas Alter für die Ermöglichung und die Betreuung meiner Dissertation. Mit freundlicher Unterstützung, informativen Gesprächen und Diskussionen wurde ich in meiner Arbeit stets ermutigt und bestätigt.

Außerdem gilt mein herzlicher Dank Prof. Dr. Rupert Mutzel für die Übernahme der Zweitkorrektur.

Bedanken möchte ich mich bei allen ehemaligen und derzeitigen Mitarbeitern des Instituts für Lebensmittelhygiene für die gute Zusammenarbeit. Allen voran Dr. Stephan Hühn für die kompetente Betreuung und fachliche Unterstützung sowie Dr. Greta Gölz für die vielen konstruktiven Tipps und Tricks und das stets offene Ohr. Bei Kathrin Oeleker bedanke ich mich für ihren unermüdlichen Einsatz bei der Laborarbeit. Doreen Herrfurth möchte ich für die intensive Einarbeitung, tatkräftige Unterstützung sowie die Kaffeepausen in der Sonne und ihre Freundschaft danken. Mein Dank geht auch an Katharina, Linda und Romy für ihre Hilfsbereitschaft, die freundschaftlichen Gespräche und das schöne Miteinander.

Für die gute und immer nette Zusammenarbeit möchte ich mich bei Tommi Aho und seinen Mitarbeitern bedanken. Auch Lisa Sperling, die mir Isolate zur Verfügung gestellt hat, danke ich. Danke auch dem gesamten VibrioNet für die kollegiale und konstruktive Zusammenarbeit.

Für die uneingeschränkte und liebevolle Unterstützung während meines Studiums und der Promotionszeit möchte ich meinen Eltern danken. Außerdem dafür, dass sie sich mit Korrekturlesen und Duden-Recherche für meine Arbeit eingesetzt haben. Auch meinem Freund Johannes danke ich, dass er mir stets zur Seite stand und für mich da war.

Ein ganz herzlicher Dank geht an alle, die mich während der letzten Jahre durch Höhen und Tiefen begleitet haben und damit einen Anteil an dem erfolgreichen Abschluss dieser Dissertation hatten.

## 9 Verzeichnis der Publikationen

Im Rahmen dieser Dissertation wurden die gewonnenen Ergebnisse auf nationalen und internationalen Kongressen als Poster präsentiert. Die Poster sind als pdf-Datei auf dem Server des Instituts für Lebensmittelhygiene der FU Berlin hinterlegt (<http://www.vetmed.fu-berlin.de/einrichtungen/institute/we08/vortraege/index.html>).

- „Multi-Locus Sequence-Typing zur Genotypisierung von *Vibrio parahaemolyticus*“ beim „13. Fachsymposium Lebensmittelmikrobiologie der VAAM“ in Stuttgart (03/2012)
- „Multilocus sequence typing for genotyping of *Vibrio parahaemolyticus*“ beim „International Symposium: Pathogenic *Vibrio* spp. in Northern European Waters“ in Koblenz (05/2012)
- „Multilocus sequence typing for genotyping of *Vibrio parahaemolyticus*“ beim „National Symposium on Zoonoses Research“ in Berlin (10/2012)
- „Veränderung der globalen Genexpressionsmuster bei *Vibrio parahaemolyticus* unter Hitze- und Kältestress“ beim „14. Fachsymposium Lebensmittelmikrobiologie der VAAM“ in Tutzing (4/2013)
- „Patterns of global expression changes during heat- and cold-stress in *Vibrio parahaemolyticus*“ beim „National Symposium on Zoonoses Research“ in Berlin 09/2013)
- „Global gene expression patterns of *Vibrio parahaemolyticus* under heat- and cold-stress“ bei der internationalen Tagung „VIBRIO 2014“ in Edinburgh (04/2014)
- „Globale Genexpression von *Vibrio parahaemolyticus* bei Hitze- und Kältestress“ bei der „DVG-Fachtagung der Fachgruppe Bakteriologie und Mykologie“ zum Thema Zoonosen in Freising (05/2014)

Außerdem wurden drei Research-Paper eingereicht bzw. publiziert:

- „Population analysis of *Vibrio parahaemolyticus* originating from different geographical regions demonstrates a high genetic diversity“ bei „BMC Microbiology“ 2014, 14:59 (doi:10.1186/1471-2180-14-59)
- „Pathogenic vibrios in environmental, seafood and clinical sources in Germany“ beim „International Journal of Medical Microbiology“ 2014, im Druck (doi:10.1016/j.ijmm.2014.07.010)
- „Changes in global gene expression of *Vibrio parahaemolyticus* induced by cold- and heat-stress“ eingereicht bei PLOS ONE

## 10 Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version  
aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

## 11 Anhang

Tabelle A1: Auswahl von Studien zur molekularen Typisierung von <i>V. parahaemolyticus</i> .....	145
Tabelle A2: Im Rahmen dieser Arbeit verwendete <i>V. parahaemolyticus</i> -Stämme .....	150
Tabelle A3: Zusammenstellung der untersuchten Garnelen- und Krabbenproben.....	154
Tabelle A4: Anzahl (#) und Häufigkeiten (%) der Sequenztypen und Allele .....	159
Tabelle A5: Anzahl (#) und Häufigkeiten (%) der Peptid-Sequenztyp und Allele .....	160
Tabelle A6: Peptid-Sequenztypen aller Sequenztypen der pubMLST-Datenbank .....	161
Tabelle A7: Allele der AA-MLST-Loki .....	163
Tabelle A8: Konzentration und Ausbeute der isolierten Nukleinsäuren, RNAs, cDNAs und cRNAs sowie Einbaurate von Cyanin-3. ....	174
Tabelle A9: DAVID-Kategorien.....	175

Auf dem Server des Instituts für Lebensmittelhygiene wurden die mit „S“ gekennzeichneten Tabellen hinterlegt. Sie können über folgenden Link geöffnet werden:

<http://www.vetmed.fu-berlin.de/einrichtungen/institute/we08/diss/index.html>

Tabelle S1: Position der Sonden auf dem Array und Sequenzen der Sonden

Tabelle S2: Zuordnung zu funktionalen Kategorien und differentielle Genexpression bei 4 °C, 15 °C, 20 °C und 42 °C

**Tabelle A1:** Auswahl von Studien zur molekularen Typisierung von *V. parahaemolyticus*

<b>Methode(n)</b>	<b>Ergebnisse</b>
PFGE	130 ausbruchassoziierte Isolate, v. a. aus Taiwan 1993-1994 Erste PFGE-Studie bei <i>V. parahaemolyticus</i> . Lokale klinische Stämme (Taiwan) in mehrere PFGE-Typen unterteilt. Diese PFGE-Typen zeigten nur geringe Ähnlichkeit zu Typen von klinischen Stämmen anderer Herkunft oder lokalen Umweltstämmen. Stamm aus Japan besitzt allerdings ähnliches Muster wie Stämme aus Taiwan, daher ggf. Gruppierung von Stämmen nach unterschiedlicher geographischer Herkunft möglich. Nur wenige Umweltstämme bzw. Stämme anderer Herkunft untersucht. Es konnte kein Zusammenhang zwischen PFGE-Typen und Serotypen, Ausbruch, KP-Phänomen oder TDH festgestellt werden (WONG <i>et al.</i> , 1996).
PFGE	121 lebensmittelassoziierte <i>V. parahaemolyticus</i> aus verschiedenen asiatischen Ländern Lebensmittelassoziierte <i>V. parahaemolyticus</i> zeigen hohe genetische Diversität. Nach Clustering der PFGE-Muster können keine Rückschlüsse auf Matrix oder Herkunft des Stammes gezogen werden (WONG <i>et al.</i> , 1999a).
PFGE, RAPD	308 klinische Isolate aus Taiwan 5 Haupt-Typen (von insgesamt 16 Typen aus 41 unterschiedlichen RAPD-Mustern) ähnlicher untereinander als zu den selteneren Typen. Weder geographischer oder Umwelt-Ursprung hatten signifikanten Einfluss auf die Gruppierung der RAPD-Typen. Den einzelnen RAPD-Typen konnten dominante PFGE-Muster zugewiesen werden. D. h. partielle Übereinstimmung/Korrelation der beiden Methoden, allerdings hat PFGE höheres Auflösungsvermögen (ist aber aufwändiger). Bei Umweltstämmen keine Korrelation mit geographischer Herkunft (WONG <i>et al.</i> , 1999b).
PFGE	Pandemische Serovare und neue Serovare zeigen nahezu identische PFGE-Muster (ARAKAWA <i>et al.</i> , 1999).
ERIC-PCR, PFGE, Ribotyping, <i>FlaA</i> -Typing	60 umweltassoziierte und klinische Stämme aus Kanada ERIC-PCR und Ribotyping besonders in Kombination hoch diskriminatorisch. Mittels PFGE konnten häufig keine Ergebnisse erzielt werden, da die DNA bei der Analyse degradierte. Übereinstimmung von Ribotypen, PFGE-Typen und <i>flaA</i> -Typen gut im Vergleich zu heterogenen Umweltstämmen. Geringe Übereinstimmung mit ERIC-PCR. Ribotyping eher zum Vergleich von Stämmen, die zeitlich und geographisch getrennt aufgetreten sind. Ein Umweltstamm war identisch mit mehreren klinischen Stämmen. Der Ursprung der Infektion lag daher vermutlich in der Umwelt. Da die verschiedenen Methoden die genetische Verwandtschaft unterschiedlich messen, ist keine Methode allein ausreichend, um alle Aspekte der genetischen Verwandtschaft abzubilden (MARSHALL <i>et al.</i> , 1999).
Plasmid-Typing	24 alte und neue O3:K6-Stämme Neue O3:K6 besitzen ein gemeinsames Plasmid, das vom Phagen f237 stammt. Das Gen <i>orf8</i> des Phagen dient als Typisierungsmerkmal für pandemische (nach 1996) O3:K6-Stämme (NASU <i>et al.</i> , 2000).
AP-PCR, <i>toxRS</i> - Sequenzierung	<i>ToxRS</i> besitzt bei pandemischen O3:K6, O4:K68 und O1:Kut identische Sequenz (wird als <i>toxRS/new</i> bezeichnet) und ist unterschiedlich zu der Sequenz nicht-pandemischer Stämme. Unterschiedliche AP-Muster von Stämmen, die vor bzw. nach 1996 isoliert wurde. AP-PCR Muster der pandemischen Serotypen O4:K68 und O1:Kut waren nahezu identisch mit dem des O3:K6-Klon und haben sich vermutlich aus diesem durch Serotyp-Wechsel gebildet (MATSUMOTO <i>et al.</i> , 2000).
Ribotyping, PFGE	48 pandemische und nicht-pandemische Stämme Ribo-Muster der pandemischen Stämme verschiedener Serotypen sind ähnlich, deutliche Unterschiede zu den heterogenen Mustern der nicht-pandemischen Stämme. Alle O3:K6 haben nahezu identische PFGE-Muster. Muster der pandemischen Serotypen O4:K68 und O1:Kut aus

Method(e)n	Ergebnisse
	diversen geographischen Regionen sind untereinander identisch und sehr ähnlich aber unterscheidbar zum Muster der O3:K6-Stämme. Nur kleine Unterschiede zwischen den pandemischen Serotypen, daher vermutlich Abstammung von einem gemeinsamen Vorfahren. Die nicht-pandemischen Serotypen zeigen sehr heterogene Muster, die unterschiedlich zu den Mustern pandemischer Stämme waren (CHOWDHURY <i>et al.</i> , 2000).
PFGE	205 O3:K6 Isolate davon 139 aus Taiwan Auflösung zwischen O3:K6, die vor bzw. nach 1996 isoliert wurden. Gruppe der nach 1996 isolierten Stämme genetisch ähnlich unabhängig von ihrer Herkunft. Diese Stämme bilden den pandemischen Klon unterscheiden sich aber hinsichtlich anderer biologischer Eigenschaften (Toxinproduktion, Überleben unter verschiedenen Bedingungen). Stämme der Untergruppe der nach 1996 isolierten Stämme stammen aus ganz Asien. (WONG <i>et al.</i> , 2000b).
RS-, REP-ERIC-PCR, PFGE, Ribotyping	Die drei PCR-basierten Methoden sind zur Spezies- und Intraspezies-Differenzierung geeignet. REP- und ERIC-PCR zeigten die besten diskriminatorischen Eigenschaften, REP-PCR höhere Rate reproduzierbarer Fingerprints. RS-PCR war einfacher zu interpretieren, aber daher auch weniger diskriminatorisch. Für verschiedene Ausbrüche stimmen Zuordnungen der PCR-Methoden teils gut bis sehr gut mit PFGE überein (WONG und LIN, 2001).
ERIC-PCR	Stämme aus Texas und New York besaßen spezifisches DNA-Fragment, das nicht bei Stämmen der pazifischen Nordwest-Küste identifiziert wurde. Dieses war spezifisch für O3:K6-Stämme. D. h. sehr verschiedene Muster zwischen pandemischen und nicht-pandemischen O3:K6-Stämmen. ERIC-PCR wurde erfolgreich eingesetzt, um Ausbruchsstämme mit solchen in Meeresfrüchten zu vergleichen (KHAN <i>et al.</i> , 2002).
PFGE, Ribotyping	Mehrere PFGE-Subtypen der O3:K6 Stämme, unterschiedlich zu nicht-O3:K6; neue O3:K6 ähnlicher untereinander als zu alten O3:K6. Ribotyping weniger diskriminatorisch. Heterogenität der non-O3:K6-Stämme (YEUNG <i>et al.</i> , 2002).
Serotyping, GS-PCR, <i>orf8</i> , AP-PCR	66 klinische Stämme 9 der identifizierten GS-PCR <sup>+</sup> Stämme codierten nicht <i>orf8</i> . Demnach ist <i>orf8</i> kein stabiler Marker für pandemische Stämme (teilweiser oder kompletter Verlust des f237 Genoms möglich). AP-PCR und Ribotyping ordnen alle Stämme dem gleichen Typ zu (BHUIYAN <i>et al.</i> , 2002).
AP-PCR, RFLP-PFGE	<i>Tdh</i> <sup>+</sup> und GS-PCR <sup>+</sup> Stämme hatten mit AP-PCR das gleiche Muster wie pandemische Referenzstämme. Mit PFGE konnten pandemische Stämme in mehrere Gruppen unterteilt werden, d. h. ggf. Weiterentwicklung des ursprünglichen pandemischen Klons. Dagegen waren <i>tdh</i> <sup>-</sup> und GS-PCR <sup>+</sup> -Stämme weiter entfernt. Dies war auch mittels AP-PCR sichtbar. <i>Tdh</i> <sup>-</sup> -Stämme waren weiter entfernt von <i>tdh</i> <sup>+</sup> -Stämmen und alle <i>tdh</i> <sup>+</sup> -Stämme lagen unabhängig vom Serotyp nah aneinander (HARA-KUDO <i>et al.</i> , 2003).
Sero- und Ribotyping	178 pathogene umweltassoziierte und klinische Stämme Kein Zusammenhang zwischen Ribo- und Serotyp eines Isolates. Bestimmte Ribo- bzw. Serotypen bei umweltassoziierten und klinischen Isolaten, während einige spezifisch für Umweltisolate waren, d. h. bestimmte Sero-/Ribotypen sind relevanter für Pathogenität. Mehrere Ribotypen bei pandemischen Stämmen. Kombinationen von Ribo- und Serotyp unterschieden sich zwischen Stämmen der Pazifikküste gegenüber Stämmen aus dem Atlantik und von der Golfküste (USA) (DEPAOLA <i>et al.</i> , 2003b).
PFGE, AP-PCR, <i>toxRS</i> , <i>orf8</i> , GS-PCR	54 Stämme (vor/nach 1996, diverse Serotypen) Alle Stämme des pandemischen Klons bilden eine abgegrenzte Gruppe mittels PFGE und AP-PCR. Gene <i>orf8</i> und <i>toxRS/new</i> <sup>+</sup> waren als Marker für pandemische Stämme nicht verlässlich, da pandemische Stämme identifiziert wurden, die <i>orf8</i> <sup>-</sup> oder <i>tdh</i> <sup>-</sup> und <i>toxRS/new</i> <sup>+</sup> waren. Entwicklung

Methode(n)	Ergebnisse
	einer neuen multiplex PCR mit <i>tdh</i> und <i>toxRS/new</i> (GS-PCR) zur Identifizierung von Stämmen des pandemischen Klons. Deutlich heterogenere Ribo- und Serogruppen bei Umweltstämmen als bei pandemischen Stämmen (OKURA <i>et al.</i> , 2003).
Serotyping, PFGE, Plasmid- Analyse	29 klinische und umweltassoziierte Stämme v. a. aus Spanien sowie weltweite pandemische Referenzstämme Plasmid-Analyse liefert kein Clustering. PFGE-Patterns (GS-PCR und Serotyping) trennen europäische von amerikanischen und asiatischen pandemischen Stämmen. Demnach scheint in Europa ein spezifischer Klon mit Infektionen assoziiert zu sein. Umweltstämmen zeigen individuelle Patterns und Serotypen. Ergebnisse von PFGE korrelieren nicht mit denen aus Serotyping und Plasmid-Analyse (MARTINEZ-URTAZA <i>et al.</i> , 2004).
RAPD, PCR- RFLP	27 <i>trh</i> <sup>+</sup> -Stämme aus Indien Große Ähnlichkeit in RAPD trotz unterschiedlicher Serotypen. Keine Ähnlichkeit zu O3:K6-Referenzstamm. 100 % Korrelation von <i>trh</i> <sup>+</sup> und <i>ure</i> <sup>+</sup> . Alle getesteten Stämme waren GS-PCR <sup>-</sup> , <i>orf8</i> <sup>-</sup> . Die meisten Stämme hatten das gleiche RFLP-Muster. Kein Zusammenhang zwischen Toxinen, Serotyp und RFLP-Typ (PARVATHI <i>et al.</i> , 2006).
DGREA	Stämme, die mit einem Ausbruch in Chile im Jahr 2006 assoziiert waren Trennschärfe von DGREA ähnlich zu der von PFGE. Vergleichsweise niedrigere Kosten und schnellere Analyse der DGREA. Der pandemische Klon bildet eine geschlossene Gruppe mittels DGREA, zweite Gruppe von O3:K6 unterscheidet sich leicht und beinhaltet vermutlich mutierte Stämme. Nicht-pandemische Stämme gehören zu diversen DGREA-Gruppen (FUENZALIDA <i>et al.</i> , 2006).
Protein- Profiling, RAPD, ERIC-PCR	71 Stämme aus Meeresfrüchten aus Indien Protein-Profilierung zeigt zwar Intraspezies-Variationen, diese sind aber kleiner als bei DNA-Fingerprinting-Methoden und ermöglichen keine klare Gruppenbildung. Zusätzlich scheinen die identifizierten Proteine mit der Isolationsmatrix zu korrelieren. RAPD-Muster korrelieren mit dem Ursprung der Stämme. Mit ERIC-PCR konnten keine Gruppen gebildet werden, allerdings kann die höhere Trennschärfe zur Verfolgung von Ausbruchs-Stämmen verwendet werden. Mittels RAPD und ERIC wurden Spezies-spezifische Banden identifiziert, die zum Spezies-Nachweis eingesetzt werden könnten (BHOWMICK <i>et al.</i> , 2008).
PFGE, AP-PCR	58 Isolate aus Mozambique AP-PCR gruppiert die pandemischen Serotypen in eine Gruppe mit identischem Muster. Nicht-pandemische Isolate in mehrere Gruppen, die alle unterschiedlich zur pandemischen Gruppe waren. Mittels PFGE wurden die unterschiedlichen Serotypen i. d. R. unterschiedlichen Mustern zugewiesen. Serotypen des pandemischen Klons besaßen ähnliche aber unterscheidbare PFGE-Muster (ANSARUZZAMAN <i>et al.</i> , 2008).
MLVA	34 pandemische Stämme (klinisch) und nicht-pandemische (Umwelt) O3:K6 Stämme Jeder Stamm hatte einzigartiges MLVA-Muster. Mit anderen Methoden sind Stämme des pandemischen Serovars O3:K6 nicht unterscheidbar. MLVA- und PFGE-Gruppierung stimmen gut überein. Nachweis für genetische Heterogenität des bislang als uniform geltenden pandemischen Genotyps. Allerdings könnten sich die VNTR-Loki so schnell verändern, dass sich innerhalb eines Ausbruchs neue Typen bilden. Daher Methode nur sinnvoll zur Identifizierung einzelner Stämme, und nicht für globale bzw. Langzeit-Studien (KIMURA <i>et al.</i> , 2008).

Method(e)n	Ergebnisse
DGREA, multicolor capillary MLVA	113 klinische und muschelassoziierte Stämme aus Chile Klonale Gruppen mittels DGREA konnten durch MLVA aufgetrennt werden. Alle unterscheidbaren MLVA-Typen waren auch mittels DGREA unterschiedlich. Höhere Trennschärfe von MLVA. Einige Umweltstämme, die <i>tdh</i> <sup>+</sup> oder <i>orf8</i> <sup>+</sup> waren, lagen näher an pandemischen Stämmen als an anderen Umweltstämmen. Verfolgung der globalen, regionalen und lokalen Verteilung einzelner Isolate möglich (HARTH-CHU <i>et al.</i> , 2009).
MALDI-TOF MS, Serotyping, PFGE, MLSA	20 klinische und umweltassoziierte Stämme Spezies-Identifikation auch nah verwandter Spezies mittels MALDI-TOF möglich. Unterscheidung zwischen pandemischen Stämmen, die vor bzw. nach 1996 isoliert wurden. Umweltstämme besaßen einzigartige Muster. Teilweise Serotyp-spezifische Peaks (O4:K12). Geographische Gruppierung der O3:K6-Stämme möglich. Identifikation von Biomarkern. Gruppierung mit PFGE und MLSA korreliert teils mit Serotyp (HAZEN <i>et al.</i> , 2009).
RAPD	341 lebensmittelassoziierte und klinische Stämme (China) Die meisten <i>tdh</i> <sup>+</sup> - und alle <i>orf8</i> <sup>+</sup> -Stämme waren in eine RAPD-Gruppe eingeordnet. Alle anderen <i>tdh</i> <sup>+</sup> -Stämme waren gemeinsam in einer weiteren Gruppe. <i>Trh</i> <sup>+</sup> -Stämme waren selten, aber auch diese wurden einer gemeinsamen Gruppe zugeordnet (CHAO <i>et al.</i> , 2009).
DGREA	Klinische und umweltassoziierte Stämme aus Süd-Chile assoziiert mit Ausbrüchen; eine Auswahl wurde mittels DGREA untersucht Hohe Anzahl verschiedener DGREA-Muster bei muschelassoziierten Umweltstämmen. Pandemischer Klon und nicht-pandemische klinische Isolate ( <i>tdh</i> <sup>+</sup> und <i>trh</i> <sup>+</sup> ) gehörten zu zwei unterscheidbaren DGREA-Mustern (GARCIA <i>et al.</i> , 2009).
MALDI-TOF MS, 16S rRNA- und <i>rpoB</i> -Sequenzierung, REP-PCRs,	(Je nach Methode unterschiedliche Anzahl) Umweltstämme aus der Nordsee MALDI-TOF zur Klassifizierung der Isolate (bei Umweltproben nicht 100 % zuverlässig), Sequenzierung zur Spezies-Identifikation (16S-Sequenzierung keine gute Trennung zwischen <i>V. parahaemolyticus</i> und <i>V. alginolyticus</i> ; <i>rpoB</i> -Sequenzierung stimmt mit Ergebnissen des <i>toxR</i> -Nachweises bei <i>V. parahaemolyticus</i> überein). REP-PCR zur genomischen Analyse, dabei besaß ERIC-PCR höchste Trennschärfe (Trennung <i>V. parahaemolyticus</i> von <i>V. alginolyticus</i> , eine Gruppe mit Hybridspezies aus beiden). Obwohl keine <i>tdh</i> <sup>+</sup> -Stämme identifiziert wurden, waren einige der <i>tliH</i> <sup>+</sup> -Stämmen auch KP <sup>+</sup> . Mehrstufige Identifikation von umweltassoziierten <i>V. parahaemolyticus</i> empfohlen (OBERBECKMANN <i>et al.</i> , 2011a).
PFGE	96 europäische umweltassoziierte und klinische Isolate Hohe Diversität der Umweltstämme auch in kleinem geographischem Raum. Ähnliche PFGE-Typen in weit entfernten Regionen und mit verschiedenen Toxin-Genen. Alle klinischen Isolate in einer Gruppe. Stämme mit gleichen Toxinen nicht zusammen gruppiert (SUFFREDINI <i>et al.</i> , 2011).
Eric-PCR, REP-PCR, PFGE	58 Umweltstämme (Wasser, Sediment, Plankton) aus der Lagune von Venedig Die meisten Stämme haben mit allen drei Methoden einzigartige Muster. Zuordnung zu Klonen teils nur mit einer der drei Methoden. Die Stämme passen aber hinsichtlich Zeit und Ort der Isolation und genetischer Ausstattung zusammen. Gruppierung korreliert in einigen Fällen mit allen drei Methoden. Persistente Gruppen/Klone identifiziert. Mit PFGE konnte eine temporale Sequenz beobachtet werden: ein bestimmtes genetisches Profil wird mit der Zeit durch ein anderes ersetzt. Assoziation zwischen einem bestimmten genetischen Profil und der Isolationsquelle (Sediment). Alle drei Methoden zeigten eine ähnliche Reproduzierbarkeit und Trennschärfe (CABURLOTTO <i>et al.</i> , 2011).
VNTR	Verschiedene Stammsammlungen von pandemischen O3:K6 mit weltweiter Herkunft



Method(e)n	Ergebnisse
	Gruppierung nach geographischem Ursprung. Subkultivierte Klone waren mit ihren Ausgangs-Stämmen gruppiert. Geeignet zur Verfolgen der Ausbreitung von pandemischen <i>V. parahaemolyticus</i> (GARCIA <i>et al.</i> , 2012).
Ribotyping, ERIC-PCR, PFGE, <i>gyrB</i> - Sequenzierung	56 epidemiologisch nicht verwandte klinische und umweltassoziierte Stämme Je nach Methode entstehen unterschiedliche Gruppierungen. Unterschiede im pathogenen Potential zwischen umweltassoziierten und klinischen Stämmen, aber auch Umweltstämme mit pathogenem Potential. Diskriminatorisch am besten war ERIC-PCR, am schlechtesten <i>gyrB</i> -Sequenzierung, die empfohlene Methode (verlässlich und schnell) ist Kombination aus ERIC-PCR und <i>gyrB</i> -Sequenzierung (CHEN <i>et al.</i> , 2012b).
PFGE	251 repräsentative klinische und lebensmittelassoziierte Stämme Pandemische Stämme formen eine Gruppe, dagegen sind nicht-pandemische Stämme divers. Ähnliche Stämme hinsichtlich Serotyp und Virulenzgen-Profil hatten identische oder ähnliche PFGE-Muster. Aber auch Stämme mit unterschiedlichen Serotypen in einer PFGE-Gruppe. Ähnliche PFGE-Muster bei Stämmen (klinisch und umweltassoziiert) mit unterschiedlichem Ursprung (ZHANG <i>et al.</i> , 2013).
FA-Profil	Unter standardisierten Kulturbedingungen lassen sich reproduzierbare Ergebnisse erzielen. Alle <i>V. parahaemolyticus</i> besitzen gleiches FA-Profil. Zur Bestimmung der Spezies geeignet. Ggf. lassen sich Unterschiede zwischen pathogenen und apathogenen Bakterien erkennen. Je enger die untersuchten Bakterien verwandt sind, desto ähnlicher sind die FA-Profile (XU <i>et al.</i> , 2013).
PFGE, Serotyping	Lebensmittelassoziierte und klinische Stämme aus mehreren Ausbrüchen in China 2008-2010 Mittels PFGE waren Stämme der verschiedenen Ausbrüche unterscheidbar. Die meisten Ausbrüche wurden von Stämmen mit verschiedenen Serotypen ausgelöst (pandemische Serotypen und ein neuer). Es konnten genetische Unterschiede bei Stämmen eines Ausbruchs und des gleichen Serotyps nachgewiesen werden. Außerdem gehörten verschiedene Stämme des gleichen Ausbruchs aber mit verschiedenen Serotypen (lebensmittelassoziiert und klinisch) zum gleichen Serotyp. Nachweis des identischen PFGE-Musters bei Stämmen aus Meeresfrüchten, gesalzenen Lebensmitteln und klinischen Proben (MA <i>et al.</i> , 2014).
ISR, DGREA, PFGE	144 klinische und austernassoziierte Stämme Clustering der Isolate mittels ISR nach Ursprung (klinisch vs. austernassoziiert). DGREA kein Clustering nach irgendeiner Eigenschaft (Herkunft, Serotyp, Virulenzgene) und ca. 15 % der Isolate waren nicht typisierbar. PFGE (Kombination mit 2 Enzymen) clustert Stämme nach Serotyp unabhängig von Herkunft oder Virulenzgenen. Mittels ISR demnach Einschätzung des pathogenen Potentials möglich (LUDEKE <i>et al.</i> , 2014).
PFGE	Klinische Stämme aus Indien Clustering der pandemischen Stämme in 2 Cluster. Dabei bildeten die alten pandemischen Serotypen (O3:K6, O1:K25, O4:K68 und O1:Kut) und neue pandemische Serotypen (O10:K60, O4:K13 und O1:K30) jeweils ein eigenes Cluster. Die Ähnlichkeit der PFGE-Muster betrug ca. 50 % (PAZHANI <i>et al.</i> , 2014).

PFGE, Pulsfeldgelelektrophorese; RAPD, Random Amplified Polymorphic DNA; ERIC, Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus; AP, Arbitrarily primed; RS, Ribosomale Spacer Sequenz; REP, Repetitives Element; GS, Gruppen spezifisch; RFLP, Restriction Fragment Length Polymorphism; DGREA, Direct Genome Restriction Enzyme Analysis; MLVA, Multiple-Locus VNTR Analyse; MALDI-TOF MS, Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight Massenspektrometer; MLSA, Multi-Locus-Sequenz-Analyse; VNTR, Variable Number Tandem Repeat; FA, Fettsäure; ISR, intergenic spacer region

**Tabelle A2:** Im Rahmen dieser Arbeit verwendete *V. parahaemolyticus*-Stämme

Angegeben sind Isolat, id, Herkunft, Isolationsjahr und -matrix, sowie die Allel-Profile der mittels MLST analysierten *V. parahaemolyticus*-Stämme. Dargestellt sind die Allel-Profile (auf Nukleotid- bzw. Aminosäuresequenzen basierend), die daraus resultierenden Sequenztypen (STs) bzw. Peptid-Sequenztypen (pSTs). Fett gedruckte Zahlen der Allel-Profile und (p)STs markieren neu beschriebene Allele und (p)STs.

Isolat	id <sup>A</sup>	Land, Region	Jahr	Matrix <sup>B</sup>	Allel-Profil <sup>C</sup>		ST	pST	Stammherkunft <sup>D</sup>
					Nukleotid	Aminosäure			
RIMD 2210633	79	Japan	1996	klinischer Stamm	5-52-27-13-17-25-10	2-1-1-1-5-11	1	125	NASU <i>et al.</i> (2000)
ATCC 17802	80	Japan	1951	klinischer Stamm	3-4-19-4-29-4-22	2-1-1-1-1-1-1	3	2	FUJINO <i>et al.</i> (1953)
1-i	816	Sri Lanka, Chillaw	2010	Garnele	11-75-64-50-26-7-50	2-1-1-1-1-1-1	<b>409</b>	2	KORALAGE <i>et al.</i> (2012)
2-i	817	Sri Lanka, Chillaw	2010	Garnele	11-75-64-50-26-7-50	2-1-1-1-1-1-1	<b>409</b>	2	KORALAGE <i>et al.</i> (2012)
4-i	794	Sri Lanka, Chillaw	2010	Garnele	<b>166-211-162-183-50-3-57</b>	1-1-1-1-1-2-1	<b>394</b>	3	KORALAGE <i>et al.</i> (2012)
5-1-iii	818	Sri Lanka, Chillaw	2010	Garnele	11-75-64-50-26-7-50	2-1-1-1-1-1-1	<b>409</b>	2	KORALAGE <i>et al.</i> (2012)
5-2-i	795	Sri Lanka, Chillaw	2010	Garnele	<b>169-104-151-73-26-46-94</b>	1-1-1-1-1-3-1	<b>395</b>	4	KORALAGE <i>et al.</i> (2012)
6-1-iii	796	Sri Lanka, Chillaw	2010	Garnele	<b>9-213-165-185-2-46-1</b>	2-1-1-1-2-3-1	<b>396</b>	20	KORALAGE <i>et al.</i> (2012)
6-2-iv	791	Sri Lanka, Chillaw	2010	Garnele	<b>9-213-165-185-2-46-1</b>	2-1-1-1-2-3-1	<b>396</b>	20	KORALAGE <i>et al.</i> (2012)
7-ii	797	Sri Lanka, Chillaw	2010	Garnele	26- <b>218</b> -124-94-23-119-13	1-1-1-1-1-1-1	<b>397</b>	1	KORALAGE <i>et al.</i> (2012)
8-1-ii	819	Sri Lanka, Chillaw	2010	Garnele	26- <b>218</b> -124-94-23-119-13	1-1-1-1-1-1-1	<b>397</b>	1	KORALAGE <i>et al.</i> (2012)
8-2-ii	792	Sri Lanka, Chillaw	2010	Garnele	26- <b>218</b> -124-94-23-119-13	1-1-1-1-1-1-1	<b>397</b>	1	KORALAGE <i>et al.</i> (2012)
15-2-i	798	Sri Lanka, Chillaw	2010	Garnele	<b>165-22-70-177-39-11-115</b>	1-1-1- <b>9</b> -1-1-1	<b>398</b>	<b>85</b>	KORALAGE <i>et al.</i> (2012)
19-D-iv	820	Sri Lanka, Puttalam	2011	Garnele	153-191-70-19-23-8-1	1-1-1-1-1-1-1	355	1	KORALAGE <i>et al.</i> (2012)
19-E-iv	821	Sri Lanka, Puttalam	2011	Garnele	<b>166-211-162-183-50-3-57</b>	1-1-1-1-1-2-1	<b>394</b>	3	KORALAGE <i>et al.</i> (2012)
20-A2-iii	822	Sri Lanka, Puttalam	2011	Garnele	<b>166-211-162-183-50-3-57</b>	1-1-1-1-1-2-1	<b>394</b>	3	KORALAGE <i>et al.</i> (2012)
20-D-i	799	Sri Lanka, Puttalam	2011	Garnele	<b>166-211-162-183-50-3-57</b>	1-1-1-1-1-2-1	<b>394</b>	3	KORALAGE <i>et al.</i> (2012)
20-E-ii	823	Sri Lanka, Puttalam	2011	Garnele	153-58-70-19-23-8-1	1-1-1-1-1-1-1	<b>410</b>	1	KORALAGE <i>et al.</i> (2012)
21-C-i	914	Sri Lanka, Puttalam	2011	Garnele	<b>166-211-162-183-50-3-57</b>	1-1-1-1-1-2-1	<b>394</b>	3	KORALAGE <i>et al.</i> (2012)
22-2-i	800	Sri Lanka, Puttalam	2011	Garnele	153- <b>216</b> -70-19-23-8-1	1-1-1-1-1-1-1	<b>399</b>	1	KORALAGE <i>et al.</i> (2012)
23-1-v	801	Sri Lanka, Puttalam	2011	Garnele	<b>12-208-159-133-28-128-86</b>	2-1-1-1-1-1-1	<b>400</b>	2	KORALAGE <i>et al.</i> (2012)
23-2-v	824	Sri Lanka, Puttalam	2011	Garnele	<b>166-211-162-183-50-3-57</b>	1-1-1-1-1-2-1	<b>394</b>	3	KORALAGE <i>et al.</i> (2012)
23-3-ii	802	Sri Lanka, Puttalam	2011	Garnele	<b>112-217-145-178-111-160-116</b>	1-1-1-1- <b>13</b> -1-1	<b>401</b>	<b>69</b>	KORALAGE <i>et al.</i> (2012)
24-1-iii	825	Sri Lanka, Puttalam	2011	Garnele	26- <b>218</b> -124-94-23-119-13	1-1-1-1-1-1-1	<b>397</b>	1	KORALAGE <i>et al.</i> (2012)
24-2-iv	803	Sri Lanka, Puttalam	2011	Garnele	80-25- <b>160-179-26-10-117</b>	1-1-1-1-1-1- <b>20</b>	<b>402</b>	<b>39</b>	KORALAGE <i>et al.</i> (2012)
25-G-ii	826	Sri Lanka, Puttalam	2011	Garnele	26- <b>218</b> -124-94-23-119-13	1-1-1-1-1-1-1	<b>397</b>	1	KORALAGE <i>et al.</i> (2012)
26-B-ii	804	Sri Lanka, Puttalam	2011	Garnele	<b>167-25-25-91-18-57</b>	2-1-1-1-1-1-1	<b>403</b>	2	KORALAGE <i>et al.</i> (2012)
27-2-iv	827	Sri Lanka, Puttalam	2011	Garnele	<b>166-211-162-183-50-3-57</b>	1-1-1-1-1-2-1	<b>394</b>	3	KORALAGE <i>et al.</i> (2012)
32-3-i	915	Sri Lanka, Puttalam	2011	Garnele	<b>166-211-162-183-50-3-57</b>	1-1-1-1-1-2-1	<b>394</b>	3	KORALAGE <i>et al.</i> (2012)
39-1-ii	828	Sri Lanka, Madurankuliya	2011	Garnele	<b>169-104-151-73-26-46-94</b>	1-1-1-1-1-3-1	<b>395</b>	4	KORALAGE <i>et al.</i> (2012)
39-2-iv	916	Sri Lanka, Madurankuliya	2011	Garnele	<b>26-218-124-94-23-119-13</b>	1-1-1-1-1-1-1	<b>397</b>	1	KORALAGE <i>et al.</i> (2012)
40-2-iii	917	Sri Lanka, Madurankuliya	2011	Garnele	<b>169-104-151-73-26-46-94</b>	1-1-1-1-1-3-1	<b>395</b>	4	KORALAGE <i>et al.</i> (2012)
41-4-i	793	Sri Lanka, Madurankuliya	2011	Garnele	<b>112-217-145-178-111-160-116</b>	1-1-1-1- <b>13</b> -1-1	<b>401</b>	<b>69</b>	KORALAGE <i>et al.</i> (2012)

Isolat	id <sup>A</sup>	Land, Region	Jahr	Matrix <sup>B</sup>	Allel-Profil <sup>C</sup>		ST	pST	Stammherkunft <sup>D</sup>
					Nukleotid	Aminosäure			
42-1-i	829	Sri Lanka, Puttalam	2011	Garnele	<b>169-104-151-73-26-46-94</b>	1-1-1-1-1-3-1	<b>395</b>	4	KORALAGE <i>et al.</i> (2012)
46-1-ii	918	Sri Lanka, Madurankuliya	2011	Garnele	<b>166-211-162-183-50-3-57</b>	1-1-1-1-1-2-1	<b>394</b>	3	KORALAGE <i>et al.</i> (2012)
46-3-ii	919	Sri Lanka, Madurankuliya	2011	Garnele	<b>26-220-168-159-11-168-122</b>	1-1-1-1-1-1-1	<b>419</b>	1	KORALAGE <i>et al.</i> (2012)
46-6-iii	920	Sri Lanka, Madurankuliya	2011	Garnele	<b>169-104-151-73-26-46-94</b>	1-1-1-1-1-3-1	<b>395</b>	4	KORALAGE <i>et al.</i> (2012)
46-7-ii	921	Sri Lanka, Madurankuliya	2011	Garnele	153-191-70-19-23-8-1	1-1-1-1-1-1-1	355	1	KORALAGE <i>et al.</i> (2012)
47-H1-iv	922	Sri Lanka, Puttalam	2011	Garnele	<b>131-221-163-150-114-163-26</b>	1-1-1-1-1-1-1	<b>420</b>	1	KORALAGE <i>et al.</i> (2012)
47-N1-v	830	Sri Lanka, Puttalam	2011	Garnele	<b>26-218-124-94-23-119-13</b>	1-1-1-1-1-1-1	<b>397</b>	1	KORALAGE <i>et al.</i> (2012)
49-A-i	923	Sri Lanka, Puttalam	2011	Garnele	153-191-70-19-23-8-1	1-1-1-1-1-1-1	355	1	KORALAGE <i>et al.</i> (2012)
51-iii	924	Sri Lanka, Madurankuliya	2011	Garnele	153-191-70-19-23-8-1	1-1-1-1-1-1-1	355	1	KORALAGE <i>et al.</i> (2012)
53-D-ii	925	Sri Lanka, Puttalam	2011	Garnele	<b>11-117-123-184-159-169-57</b>	2-1-1-1-34-1-1	673	<b>136</b>	KORALAGE <i>et al.</i> (2012)
54-3-iii	926	Sri Lanka, Madurankuliya	2012	Garnele	<b>169-104-151-73-26-46-94</b>	1-1-1-1-1-3-1	<b>395</b>	4	KORALAGE <i>et al.</i> (2012)
54-3-v	927	Sri Lanka, Madurankuliya	2012	Garnele	<b>169-104-151-73-26-46-94</b>	1-1-1-1-1-3-1	<b>395</b>	4	KORALAGE <i>et al.</i> (2012)
SR31	808	Pazifik	2010	Muschel	<b>5-215-19-120-46-110-23</b>	2-1-1-1-1-2-1	<b>404</b>	5	IFH
MH24	928	Thailand	2008	Garnele	5-84-115-74-63-159-84	2-1-1-1-1-1-1	392	2	LGL
MH25	929	Bangladesch	2008	Garnele	<b>157-124-135-73-19-170-123</b>	1-1-1-1-1-1-1	<b>422</b>	1	LGL
MH33	930	Vietnam	2008	Garnele	51-4-77-67-60-8-24	2-1-1-1-1-1-1	<b>423</b>	2	LGL
MH38	931	Indien	2008	Garnele	<b>170-224-75-139-117-18-124</b>	1-1-1-1-1-1-1	<b>424</b>	1	LGL
MH41	1059	Indischer Ozean	2008	Garnele	<b>166-211-162-183-50-3-57</b>	1-1-1-1-1-2-1	<b>394</b>	3	LGL
MH48	932	Bangladesch	2008	Garnele	121-50- <b>169</b> -91-10-73-73	2-1-1-1-1-1-1	<b>425</b>	2	LGL
MH51	831	Thailand	2008	Garnele	55-15-31-55-18-58-46	1-1-1-1-1-5-1	114	10	LGL
MH55	933	Honduras	2008	Garnele	<b>158-223-75-12-26-171-125</b>	2-1-1-1-1-1-21	<b>426</b>	<b>100</b>	LGL
MH66	934	Honduras	2008	Garnele	33-87-24-5-10-5-1	1-1-1-1-1-1-1	246	1	LGL
MH70	935	Vietnam	2009	Garnele	<b>171-222-113-126-4-62-23</b>	2-1-1-1-1-1-1	<b>428</b>	2	LGL
MH78	832	Thailand	2009	Garnele	119-152-135-29-23-11-61	2-1-1-1-1-1-1	<b>391</b>	2	LGL
MH86	805	Bangladesch	2010	Garnele	33-22-24-5-10-5-1	1-1-1-1-1-1-1	56	1	LGL
MH91	833	Vietnam	2010	Garnele	2-113-72-94-26-83-23	1-1-1-1-1-2-1	<b>411</b>	3	LGL
33173	810	Bangladesch	2011	Garnele	31-4-60- <b>180</b> -31-62- <b>120</b>	1-1-1-1-1-1-2	<b>405</b>	6	IFH
34711549	812	Thailand	2011	Garnele	<b>168-210-161-182-61-162-38</b>	2-1-1-1-1-1-1	<b>406</b>	2	IFH
505	1046	Niederlande, Nordsee	2011	Miesmuschel	<b>221-298-31-226-26-171-37</b>	2-1-1-1-1-1-1	<b>545</b>	2	IFH
509	1047	Dänemark	2011	Muschel	119-151- <b>197</b> -79-4- <b>205</b> -105	2-1-1-1-1-1-1	<b>537</b>	2	IFH
510	1048	Dänemark	2011	Muschel	119-151- <b>197</b> -79-4- <b>205</b> -105	2-1-1-1-1-1-1	<b>537</b>	2	IFH
529	1049	Dänemark	2011	Miesmuschel	119-151- <b>168</b> -201-4- <b>205</b> -105	2-1-1-1-1-1-1	<b>538</b>	2	IFH
577	813	Vietnam	2011	Garnele	<b>102-212-91-182-61-162-38</b>	2-1-1-1-1-1-1	<b>407</b>	2	IFH
660	814	China	2011	Garnele	<b>111-188-164-149-115-164-118</b>	1-1-1-1-1-36-1	<b>408</b>	<b>60</b>	IFH
663	834	Vietnam	2011	Garnele	109-136-114-121-83-107-83	2-1-1-1-1-2-1	233	5	IFH
672	835	Ecuador	2011	Garnele	142-29-10-7-14-24-20	1-1-1-1-1-1-2	<b>412</b>	6	IFH
673	836	Bangladesch	2011	Garnele	35-154-25-50-73-35-23	1-1-1-1-1-4-1	253	11	IFH
692	837	Deutschland, Ostsee	2011	Wasser	3-2-82-50-4-78-66	2-1-1-1-1-1-1	121	2	IFH

Isolat	id <sup>A</sup>	Land, Region	Jahr	Matrix <sup>B</sup>	Allel-Profil <sup>C</sup>			pST	Stammherkunft <sup>D</sup>
					Nukleotid	Aminosäure	ST		
759	838	Deutschland, Ostsee	2011	Seegras	35-43-38-21-31-35-37	1-1-1-1-1-4-1	79	11	IFH
766	839	Deutschland, Ostsee	2011	Sand	3-2-82-50-4-78-66	2-1-1-1-1-1-1	121	2	IFH
767	840	Deutschland, Ostsee	2011	Wasser	3-2-82-50-4-78-66	2-1-1-1-1-1-1	121	2	IFH
768	841	Deutschland, Ostsee	2011	Wasser	3-2-82-50-4-78-66	2-1-1-1-1-1-1	121	2	IFH
906	1050	Ecuador	2011	Garnele	31- <b>299-198</b> -19-26- <b>206</b> -18	1-1-1-1-1-2-1	<b>539</b>	3	IFH
907	1051	Ecuador	2011	Garnele	42- <b>223</b> -31-12-26- <b>171</b> -57	2-1-1-1-1-1-1	<b>540</b>	2	IFH
1038	1052	NO-Atlantik	2011	Muschel	17- <b>296</b> -13- <b>224</b> -95-31-26	1-1-1-1-1-1-1	<b>541</b>	1	IFH
1121	1053	Niederlande, Nordsee	2011	Miesmuschel	175-16- <b>195-187</b> -31- <b>165</b> -17	1-1-1-1-1- <b>21</b> -1	<b>542</b>	<b>54</b>	IFH
A <sub>2</sub> 2,2	1054	Ecuador, Machala	2012	Garnele	188-106- <b>199-225</b> -2-3-1	2-1-1-1-2-2-1	<b>543</b>	<b>123</b>	IFH
2/3,3	1055	Ecuador, Machala	2012	Garnele	42- <b>297-196</b> -19- <b>137-204</b> -57	2-1-1-1- <b>15</b> -1-1	<b>544</b>	<b>129</b>	IFH
3/4,2	1056	Ecuador, Machala	2012	Garnele	42- <b>297-196</b> -19- <b>137-204</b> -57	2-1-1-1- <b>15</b> -1-1	<b>544</b>	<b>129</b>	IFH
4/5,5	1137	Ecuador, Machala	2012	Garnele	111-7- <b>232</b> -12- <b>166-257-182</b>	1-1-1-1- <b>35-3-24</b>	<b>718</b>	<b>79</b>	IFH
5/2,5	1057	Ecuador, Machala	2012	Garnele	42- <b>223</b> -31-12-26- <b>171</b> -57	2-1-1-1-1-1-1	<b>540</b>	2	IFH
6/4,9	1138	Ecuador, Machala	2012	Garnele	58- <b>332</b> -10-8-28-33- <b>183</b>	1-1-1-1-1-1-1	<b>719</b>	1	IFH
7/4,2	1139	Ecuador, Machala	2012	Garnele	<b>236</b> -40-38-209-28-190-94	<b>15</b> -1-1-3-1-18-1	<b>720</b>	<b>164</b>	IFH
8/4,6	1140	Ecuador, Machala	2012	Garnele	60-143- <b>233</b> -29-47-78-17	1-1-1-1-1-1-1	<b>721</b>	1	IFH
9/3,5	1141	Ecuador, Machala	2012	Garnele	26-16- <b>234</b> -7-18-32-7	1-1-1-1-1-1-1	<b>722</b>	1	IFH
I-5,1	1142	Ecuador, Balao	2012	Garnele	232-141-3-54-160- <b>258</b> -90	2-1-1-1-1-1-6	<b>723</b>	<b>95</b>	IFH
I-17,2	1143	Ecuador, Balao	2012	Garnele	42- <b>333</b> -74- <b>288</b> -24-171-13	2-1-1-1-1-1-1	<b>724</b>	2	IFH
II-1,6	1207	Ecuador, Machala	2012	Garnele	28-84-217- <b>290</b> -28- <b>260-184</b>	1-1-1-1-1-1- <b>25</b>	<b>756</b>	<b>41</b>	IFH
II-2,8	1145	Ecuador, Machala	2012	Garnele	26-16- <b>234</b> -7-18-32-7	1-1-1-1-1-1-1	<b>722</b>	1	IFH
II-15,4	1146	Ecuador, Machala	2012	Garnele	26-16- <b>234</b> -7-18-32-7	1-1-1-1-1-1-1	<b>722</b>	1	IFH
II-21,1	1147	Ecuador, Machala	2012	Garnele	47- <b>335</b> -61- <b>289</b> -114-78-26	1-1-1-1-1-1-1	<b>725</b>	1	IFH
II-26,4	1149	Ecuador, Machala	2012	Garnele	<b>170-224</b> -75-139- <b>117</b> -18- <b>124</b>	1-1-1-1-1-1-1	<b>424</b>	1	IFH
II-30,4	1148	Ecuador, Machala	2012	Garnele	31- <b>334</b> -3-55-4- <b>259</b> -23	1-1-1-1-1-3-1	<b>755</b>	4	IFH
III-1,3	1150	Ecuador, Guayaquil	2012	Garnele	26-16- <b>234</b> -7-18-32-7	1-1-1-1-1-1-1	<b>722</b>	1	IFH
III-2,3	1151	Ecuador, Guayaquil	2012	Garnele	<b>237</b> -165-98- <b>291-167</b> -11-77	1-1-1-1-1-1-1	<b>726</b>	1	IFH
III-3,1	1152	Ecuador, Guayaquil	2012	Garnele	31-115-200-12- <b>168</b> -91-68	1-1-1-1-1-12-1	<b>727</b>	17	IFH
III-4,5	1153	Ecuador, Guayaquil	2012	Garnele	31-115-200-12- <b>168</b> -91-68	1-1-1-1-1-12-1	<b>727</b>	17	IFH
III-5,4	1154	Ecuador, Guayaquil	2012	Garnele	28-84-217- <b>290</b> -28- <b>260-184</b>	1-1-1-1-1-1- <b>25</b>	<b>756</b>	<b>41</b>	IFH
III-7,4	1155	Ecuador, Guayaquil	2012	Garnele	5-25-19-61-4-11-24	2-1-1-1-1-1-1	430	2	IFH
III-9,2	1156	Ecuador, Guayaquil	2012	Garnele	25-322-13-282-33-32-2	1-1-1-1-1-1-1	711	1	IFH
III-13,2	1157	Ecuador, Guayaquil	2012	Garnele	196-84-80-124-128-158-12	2-1-1-1-1-14-1	<b>757</b>	<b>29</b>	IFH
III-14,2	1158	Ecuador, Guayaquil	2012	Garnele	26-16- <b>234</b> -7-18-32-7	1-1-1-1-1-1-1	<b>722</b>	1	IFH
III-16,4	1159	Ecuador, Guayaquil	2012	Garnele	232-56-3-23-56-11-36	2-1-1-1-4-1-1	<b>728</b>	14	IFH
VN-2667	1211	Deutschland, Nordsee	2011	Wasser	<b>238</b> -106-75-123-30-11-46	<b>9</b> -1-1-1-1-1-1	<b>758</b>	<b>158</b>	AWI
VN-2890	1212	Deutschland, Nordsee	2011	Wasser	<b>239</b> -16-13-8-49- <b>261</b> -23	4-1-1-1-1-1-1	<b>759</b>	<b>151</b>	AWI
VN-2941	1213	Deutschland, Nordsee	2011	Wasser	142-16-10-7-14-24-20	1-1-1-1-1-1-2	<b>760</b>	6	AWI

Isolat	id <sup>A</sup>	Land, Region	Jahr	Matrix <sup>B</sup>	Allel-Profil <sup>C</sup>			ST	pST	Stammherkunft <sup>D</sup>
					Nukleotid	Aminosäure				
VN-2948	1214	Deutschland, Ostsee	2011	Wasser	4-13-11-91-18-9-23	2-1-1-1-1-7-1	481	19	AWI	
VN-2971	1215	Deutschland, Ostsee	2011	Wasser	4-13-11-91-18-9-23	2-1-1-1-1-7-1	481	19	AWI	
VN-2979	1216	Deutschland, Ostsee	2011	Wasser	47-52-19-287-24-43-37	1-1-1-1-1-1-1	<b>761</b>	1	AWI	
VN-2981	1217	Deutschland, Ostsee	2011	Wasser	<b>240-337-240-19-169-262-185</b>	4-1-1-1-1-6-1	<b>762</b>	<b>152</b>	AWI	
VN-2983	1218	Deutschland, Ostsee	2011	Wasser	33-280- <b>239-292-23-263</b> -83	1-1-1-1-1-1-1	<b>763</b>	1	AWI	
VN-2989	1219	Deutschland, Nordsee	2011	Wasser	142-16-10-7-14-24-20	1-1-1-1-1-1-2	<b>760</b>	6	AWI	
VN-3101	1220	Deutschland, Nordsee	2011	Wasser	142-16-10-7-14-24-20	1-1-1-1-1-1-2	<b>760</b>	6	AWI	
VN-3106	1221	Deutschland, Nordsee	2011	Wasser	27-327-13-23-33-32-2	1-1-1-1-1-1-1	<b>764</b>	1	AWI	
VN-3107	1222	Deutschland, Nordsee	2011	Phytopl.	27-327-13-23-33-32-2	1-1-1-1-1-1-1	<b>764</b>	1	AWI	
VN-3109	1223	Dänemark, Skagerrak	2011	Wasser	61-117-35-19-26-92- <b>186</b>	1-1-1-1-1-13-1	<b>765</b>	<b>48</b>	AWI	
VN-3116	1224	Dänemark, Kattegat	2011	Wasser	26-330-223- <b>293-28-264</b> -104	1-1-1-1-1-2-1	<b>774</b>	3	AWI	
VN-3130	1225	Dänemark, Kattegat	2011	Zoopl.	22- <b>338-241</b> -205-4- <b>265</b> -86	2-1-1-1-1- <b>41</b> -1	<b>766</b>	<b>119</b>	AWI	
VN-3133	1226	Dänemark, Kattegat	2011	Phytopl.	111-239-205-195-28-46-23	1-1-1-1-1-3-1	<b>767</b>	4	AWI	
VN-3140	1227	Deutschland, Ostsee	2011	Wasser	29- <b>339</b> -75-123-30-18-46	1-1-1-1-1-1-1	<b>768</b>	1	AWI	
VN-3146	1228	Deutschland, Ostsee	2011	Zoopl.	17-16-13-7-24-16-20	1-1-1-1-1-1-2	28	6	AWI	
VN-3148	1229	Deutschland, Ostsee	2011	Sediment	196-84-80- <b>294-170</b> -158-12	2-1-1-1-1-14-1	<b>769</b>	<b>29</b>	AWI	
VN-3151	1230	Deutschland, Ostsee	2011	Wasser	4-13-11-91-18-9-23	2-1-1-1-1-7-1	481	19	AWI	
VN-3153	1231	Deutschland, Ostsee	2011	Wasser	97-287-150-243-142-229- <b>187</b>	2-1-1-1-1-1-1	<b>770</b>	2	AWI	
VN-3168	1232	Deutschland, Ostsee	2011	Phytopl.	20- <b>296</b> -3-187-26-6-2	1-1-1-1-1-5-1	<b>771</b>	10	AWI	
VN-2994	1233	Deutschland, Ostsee	2011	Wasser	47-58-53-19-50-37-26	1-1-1-1-1-2-1	162	3	AWI	
VN-3005	1234	Deutschland, Ostsee	2011	Wasser	17- <b>340</b> -6- <b>295</b> -94-23-7	1-1-1-1-1-1-1	<b>773</b>	1	AWI	
VN-3008	1235	Deutschland, Ostsee	2011	Wasser	4-13-11-91-18-9-23	2-1-1-1-1-7-1	481	19	AWI	
VN-3018	1236	Deutschland, Nordsee	2011	Wasser	<b>238</b> -106-75-123-30-11-46	<b>9</b> -1-1-1-1-1-1	<b>758</b>	<b>158</b>	AWI	

<sup>A</sup> id, die dem Isolat in der pubMLST-Datenbank zugewiesen wurde.

<sup>B</sup> Phytopl., Phytoplankton; Zoopl., Zooplankton

<sup>C</sup> Allel-Profile basierend auf den Nukleotid- bzw. Aminosäuresequenzen. Die Reihenfolge der Fragmente entspricht denen der pubMLST-Datenbank (*dnaE*, *gyrB*, *recA*, *dtdS*, *pntA*, *pyrC*, *tnaA* bzw. p\_dnaE, p\_gyrB, p\_recA, p\_dtdS, p\_pyrC, p\_tnaA).

<sup>D</sup> IFH, Stammsammlung des Instituts für Lebensmittelhygiene der FU Berlin; LGL, Stämme der Stammsammlung des Bayrischen Landesamtes für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit; AWI, Stammsammlung der Biologische Anstalt Helgoland der Stiftung Alfred-Wegener-Institut, Helmholtz-Zentrum für Polar- und Meeresforschung

**Tabelle A3:** Zusammenstellung der untersuchten Garnelen- und Krabbenproben

Angegeben ist die id der Probe, die Spezies der untersuchten Probe, die Art der Aufzucht, die Herkunft der Proben sowie die detektierten *Vibrio* spp. und die nachgewiesenen Toxine von *V. parahaemolyticus*.

id	Garnelen Spezies <sup>1</sup>	Aufzucht	Herkunft laut Produkt	Herkunft für Auswertung	<i>Vibrio</i> spp. <sup>2</sup>	Vp Toxine
149	n. A.	Aquakultur	Vietnam	Vietnam		
189/1	<i>Penaeus</i> spp.	Aquakultur	Indonesien/Indien	Südostasien		
189/2	<i>Crangon crangon</i>	Wildfang	Nordostatlantik (Nordsee)	Nordsee		
189/3	<i>Penaeidea</i>	Wildfang	Indischer/Pazifischer Ozean	Indischer/Pazifischer Ozean		
216/1	<i>Penaeus</i> spp.	Aquakultur	Ecuador	Ecuador		
216/2	<i>Penaeus</i> spp.	Wildfang	Indischer Ozean	Indischer Ozean		
216/3	<i>Litopenaeus vannamei</i>	Aquakultur	Ecuador	Ecuador		
216/4	<i>Litopenaeus vannamei</i>	Aquakultur	Ecuador	Ecuador		
216/5	<i>Penaeus</i> spp.	Aquakultur	Vietnam	Vietnam		
223/1	<i>Litopenaeus vannamei</i>	Aquakultur	Indonesien (Sumatra)	Indonesien		
223/2	<i>Litopenaeus vannamei</i>	Aquakultur	Indonesien (Sumatra)	Indonesien		
223/3	<i>Pandalus borealis</i>	Wildfang	Nordwestatlantik	Atlantik		
226/3	n. A.		unbekannt	unbekannt		
230/2	<i>Pandalus borealis</i>	Wildfang	Nordwestatlantik	Atlantik		
230/3	<i>Litopenaeus vannamei</i>	Aquakultur	China, Thailand oder Vietnam	Südostasien		
230/4	n. A.		Thailand	Thailand	Va	
230/5	n. A.		Indonesien	Indonesien		
271/1	<i>Pandalus borealis</i>	Wildfang	Nordwestatlantik	Atlantik		
271/2	<i>Litopenaeus vannamei</i>	Aquakultur	Thailand	Thailand		
271/3	<i>Penaeidea</i>	Wildfang	Indischer Ozean	Indischer Ozean		
271/4	<i>Penaeidea</i> spp.	Wildfang	Pazifischer Ozean	Pazifischer Ozean		
271/5	<i>Litopenaeus vannamei</i>	Aquakultur	Indonesien	Indonesien		
271/6	<i>Pandalus borealis</i>	Wildfang	Nordwestatlantik (Kanada)	Atlantik	Va, Vv, Vp	
271/7	n. A.	Aquakultur	Thailand	Thailand		
271/8	n. A.	Aquakultur	Vietnam	Vietnam	Vv	
271/9	n. A.	Aquakultur	Thailand	Thailand		
271/10	<i>Pandalus borealis</i>	Wildfang	Nordwest- Nordostatlantik	Atlantik		
271/11	<i>Pandalus borealis</i>	Wildfang	Nordwestatlantik	Atlantik		
271/12	n. A.		Chile	Chile		
271/13	<i>Penaeus monodon</i>	Aquakultur	Vietnam	Vietnam		
271/14	<i>Pandalus borealis</i>	Wildfang	Nordwestatlantik	Atlantik		
271/15	<i>Penaeus monodon</i>	Aquakultur	Bangladesch	Bangladesch	Va, Vp, Vm	trh
271/16	<i>Penaeus monodon</i>	Aquakultur	Bangladesch	Bangladesch		
271/17	<i>Penaeus</i> spp.	Wildfang	Pazifischer Ozean	Pazifischer Ozean		
271/18	<i>Litopenaeus vannamei</i>	Aquakultur	Honduras	Honduras		

id	Garnelen Spezies <sup>1</sup>	Aufzucht	Herkunft laut Produkt	Herkunft für Auswertung	Vibrio spp. <sup>2</sup>	Vp Toxine
271/19	<i>Pandalus borealis</i>	Wildfang	Kanadische Gewässer	Atlantik		
271/20	<i>Litopenaeus vannamei</i>	Aquakultur	Thailand	Thailand	Vp, Vv, Vm	trh
271/21	<i>Litopenaeus vannamei</i>	Aquakultur	Indien	Indien	Vp, Vv, Vc	
271/22	<i>Pandalus borealis</i>	Wildfang	Nordwestatlantik	Atlantik		
289/1	<i>Litopenaeus vannamei</i>	Aquakultur	Indonesien, Thailand	Südostasien		
289/2	<i>Pandalus borealis</i>	Wildfang	Nordwestatlantik	Atlantik		
289/3	<i>Crangon crangon</i>	Wildfang	Nordostatlantik	Atlantik		
289/4	<i>Litopenaeus vannamei</i>	Aquakultur	Ecuador	Ecuador		
289/5	<i>Litopenaeus vannamei</i>	Aquakultur	China, Thailand oder Vietnam	Südostasien		
289/7	<i>Penaeus</i> spp.	Aquakultur	Indonesien	Indonesien	Vp, Vc	
289/8	<i>Litopenaeus vannamei</i>	Aquakultur	Südostasien	Südostasien		
289/9	n. A.	Wildfang	Indischer Ozean	Indischer Ozean		
289/10	<i>Penaeus</i> spp.	Aquakultur	Ecuador	Ecuador		
347/1	n. A.	Wildfang	mittlerer Ostatlantik	Atlantik		
347/2	n. A.	Wildfang	mittlerer Ostatlantik	Atlantik		
347/3	<i>Crangon crangon</i>	Wildfang	Nordost Atlantik (Nordsee)	Atlantik		
347/4	n. A.	Wildfang	Chile	Chile		
347/5	<i>Parapenaeopsis stylifera</i>		Indien	Indien		
347/6	<i>Pandalus borealis</i>	Wildfang	Nordwest-Nordostatlantik	Atlantik		
347/7	<i>Litopenaeus vannamei</i>		Vietnam	Vietnam		
347/8	<i>Penaeus monodon</i>	Aquakultur	Vietnam	Vietnam		
347/9	<i>Penaeus</i> spp.	Aquakultur	Thailand	Thailand		
347/10	<i>Litopenaeus vannamei</i>	Aquakultur	Vietnam	Vietnam	Vp, Va	trh, tdh/trh
347/11	<i>Litopenaeus vannamei</i>	Aquakultur	Thailand	Thailand	Vp, Va	trh
347/12	<i>Litopenaeus vannamei</i>	Aquakultur	Thailand	Thailand	Vp, Vv, Va	trh
347/13	<i>Crangon crangon</i>	Wildfang	Nordostatlantik	Atlantik		
347/14	n. A.	Aquakultur	Thailand	Thailand		
347/15	n. A.	Aquakultur	Thailand	Thailand		
347/16	n. A.	Aquakultur	Vietnam	Vietnam		
571/1	<i>Litopenaeus vannamei</i>	Aquakultur	China	China		
571/2	<i>Litopenaeus vannamei</i>	Aquakultur	China	China	Vp, Vc	
571/3	<i>Litopenaeus vannamei</i>	Aquakultur	China	China		
571/4	<i>Litopenaeus vannamei</i>	Aquakultur	Ecuador	Ecuador	Vc, Vm, Va, Vp	trh
571/5	<i>Penaeus</i> spp.	Wildfang	Indischer/Pazifischer Ozean	Indischer/Pazifischer Ozean		
571/6	<i>Litopenaeus vannamei</i>	Aquakultur	Honduras	Honduras		
571/7	<i>Crangon crangon</i>	Wildfang	Nordostatlantik	Atlantik		
571/8	<i>Litopenaeus vannamei</i>	Aquakultur	Indonesien/Thailand	Südostasien	Vp, Vm	trh
571/9	<i>Penaeidea</i>	Wildfang	Indischer/Pazifischer Ozean	Indischer/Pazifischer Ozean		
571/10	<i>Litopenaeus vannamei</i>	Aquakultur	Ecuador	Ecuador		

id	Garnelen Spezies <sup>1</sup>	Aufzucht	Herkunft laut Produkt	Herkunft für Auswertung	Vibrio spp. <sup>2</sup>	Vp Toxine
571/11	<i>Pandalus jordani</i>	Wildfang	nordöstlicher Pazifik	Pazifischer Ozean		
571/12	n. A.		unbekannt	unbekannt	Vp, Vc	trh
571/13	<i>Penaeus</i> spp.	Aquakultur	Thailand	Thailand		
596/1	<i>Penaeus</i> spp.	Wildfang	Indischer Ozean; Arabisches Meer	Indischer Ozean		
596/2	<i>Penaeus</i> spp.	Aquakultur	Thailand	Thailand		
596/3	<i>Pandalus borealis</i>	Wildfang	Nordwestatlantik	Atlantik	Vp	
596/4	<i>Litopenaeus vannamei</i>	Aquakultur	Thailand	Thailand	Vp	trh
596/5	<i>Litopenaeus vannamei</i>	Aquakultur	Thailand	Thailand		
596/6	<i>Litopenaeus vannamei</i>	Aquakultur	Thailand	Thailand		
596/8	<i>Litopenaeus vannamei</i>	Aquakultur	Indonesien (Sumatra)	Indonesien		
596/9	<i>Litopenaeus vannamei</i>	Aquakultur	China, Thailand oder Vietnam	Südostasien		
596/10	<i>Pandalus borealis</i>	Wildfang	Nordwestatlantik (Vor Labrador)	Atlantik		
596/11	<i>Pandalus borealis</i>	Wildfang	Nordwestatlantik (Kanada)	Atlantik		
596/12	<i>Litopenaeus vannamei</i>	Aquakultur	Thailand	Thailand		
604/1	<i>Litopenaeus vannamei</i>	Aquakultur	China, Thailand oder Vietnam	Südostasien		
604/2	<i>Penaeus</i> spp.	Wildfang	Indischer Ozean	Indischer Ozean		
604/3	<i>Penaeus</i> spp.	Aquakultur	Vietnam	Vietnam	Vp, Vv	trh
651/1	<i>Penaeus</i> spp.	Wildfang	Pazifischer Ozean	Pazifischer Ozean	Vv, Vm	
651/2	<i>Pandalus borealis</i>	Wildfang	Nordwest- Nordostatlantik	Atlantik		
651/3	<i>Penaeus monodon</i>		Vietnam	Vietnam		
651/4	<i>Parapenaeopsis stylifera</i>		unbekannt	unbekannt		
651/5	<i>Penaeus monodon</i>		Bangladesch	Bangladesch		
651/6	<i>Penaeus monodon</i>	Aquakultur	Bangladesch	Bangladesch	Vp, Vv, Vm	
651/7	<i>Penaeus</i> spp.		Mittelmeer/Ostatlantik	Mittelmeer	Vp, Va	
651/9	<i>Penaeus monodon</i>	Aquakultur	Vietnam	Vietnam		
651/10	<i>Penaeus</i> spp.	Wildfang	Pazifischer Ozean	Pazifischer Ozean	Vc	
651/11	<i>Penaeus monodon</i>	Aquakultur	Vietnam	Vietnam		
651/12	<i>Penaeus monodon</i>	Aquakultur	Vietnam	Vietnam		
651/13	<i>Penaeus monodon</i>		Bangladesch	Bangladesch		
651/14	<i>Crangon crangon</i>	Wildfang	Nordsee	Nordsee		
651/15	<i>Penaeus monodon</i>	Aquakultur	Vietnam	Vietnam		
695/1	n. A.		unbekannt	unbekannt	Vp, Vc, Vv	
695/2	n. A.		unbekannt	unbekannt	Va	
695/3	n. A.		unbekannt	unbekannt		
695/4	n. A.	Wildfang	unbekannt	unbekannt	Vv, Vm	
780/1	<i>Penaeus</i> spp.	Aquakultur	Indonesien/Thailand	Südostasien		
780/2	<i>Crangon crangon</i>	Wildfang	Nordostatlantik	Atlantik		
780/4	<i>Pandalus jordani</i>	Wildfang	Pazifischer Ozean	Pazifischer Ozean		
780/5	<i>Litopenaeus vannamei</i>	Aquakultur	Thailand	Thailand		



id	Garnelen Spezies <sup>1</sup>	Aufzucht	Herkunft laut Produkt	Herkunft für Auswertung	Vibrio spp. <sup>2</sup>	Vp Toxine
780/6	<i>Litopenaeus vannamei</i>	Aquakultur	Ecuador	Ecuador		
780/7	<i>Metapenaeus</i> spp.	Wildfang	Indischer Ozean	Indischer Ozean	Va	
780/8	<i>Penaeus</i> spp.	Aquakultur	Ecuador	Ecuador		
780/9	<i>Penaeus</i> spp.	Aquakultur	Indien	Indien		
780/10	<i>Litopenaeus vannamei</i>	Aquakultur	Ecuador	Ecuador		
780/11	<i>Metapenaeus</i> spp.	Wildfang	Indischer Ozean	Indischer Ozean	Vv	
780/12	<i>Litopenaeus vannamei</i>	Aquakultur	Thailand, Indonesien	Südostasien		
787/1	<i>Litopenaeus vannamei</i>	Aquakultur	China	China		
787/2	<i>Penaeidea</i>	Wildfang	Indischer/Pazifischer Ozean	Indischer/Pazifischer Ozean	Vc	
787/3	<i>Pandalus borealis</i>	Wildfang	Nordwestatlantik	Atlantik		
830/1	n. A.	Aquakultur	Indien	Indien	Vv	
830/2	n. A.	Wildfang	Nordostatlantik	Atlantik		
830/3	n. A.	Wildfang	Nordostatlantik	Atlantik		
830/5	n. A.	Aquakultur	Bangladesch	Bangladesch		
830/6	n. A.	Wildfang	Pazifischer Ozean	Pazifischer Ozean		
830/7	n. A.	Wildfang	Nordostatlantik	Atlantik		
830/8	n. A.	Wildfang	Nordwestatlantik	Atlantik		
830/9	n. A.	Wildfang	mittlerer Ostatlantik	Atlantik	Vm	
830/10	n. A.	Aquakultur	unbekannt	unbekannt	Vm, Vv	
830/11	n. A.	Wildfang	Vietnam	Vietnam	Vv	
830/12	n. A.	Aquakultur	Pazifischer Ozean	Pazifischer Ozean		
831/1	n. A.		unbekannt	unbekannt		
831/2	<i>Litopenaeus vannamei</i>	Aquakultur	Thailand	Thailand	Vv, Vm, Vp, Vc	
831/3	<i>Penaeus</i> spp.	Aquakultur	Thailand	Thailand		
955/1	<i>Litopenaeus vannamei</i>	Aquakultur	Ecuador	Ecuador	Vc, Vp	
955/2	<i>Litopenaeus vannamei</i>	Aquakultur	Ecuador	Ecuador	Vc, Va	
955/3	<i>Litopenaeus vannamei</i>	Aquakultur	Bangladesch	Bangladesch		
955/4	<i>Litopenaeus vannamei</i>	Aquakultur	Bangladesch	Bangladesch	Vc, Vv	
955/5	<i>Litopenaeus vannamei</i>	Aquakultur	Bangladesch	Bangladesch		
955/6	n. A.	Wildfang	Pazifischer Ozean	Pazifischer Ozean		
955/7	<i>Metapenaeus monoceros</i>	Wildfang	Pazifischer Ozean	Pazifischer Ozean	Vv	
955/8	n. A.	Wildfang	Pazifischer Ozean	Pazifischer Ozean		
955/9	<i>Litopenaeus vannamei</i>	Aquakultur	unbekannt	unbekannt	Vv	
955/10	<i>Macrobrachium rosenbergii</i>		unbekannt	unbekannt	Vc	
955/12	<i>Penaeus monodon</i>	Aquakultur	Bangladesch	Bangladesch	Va	
955/13	<i>Macrobrachium lanchesteri</i>	Wildfang	Vietnam	Vietnam	Vv, Vc	
959/1	<i>Penaeus monodon</i>	Aquakultur	Bangladesch	Bangladesch	Vv, Va	
959/2	n. A.	Wildfang	Indischer Ozean	Indischer Ozean		
980/1	<i>Penaeus</i> spp.	Aquakultur	unbekannt	unbekannt		

id	Garnelen Spezies <sup>1</sup>	Aufzucht	Herkunft laut Produkt	Herkunft für Auswertung	Vibrio spp. <sup>2</sup>	Vp Toxine
980/2	<i>Pandalus borealis</i>	Wildfang	Nordwestatlantik	Atlantik		
1116/1	<i>Litopenaeus vannamei</i>	Aquakultur	Thailand	Thailand	Vp	
1116/2	<i>Litopenaeus vannamei</i>	Aquakultur	Ecuador	Ecuador		
1116/3	<i>Litopenaeus vannamei</i>	Aquakultur	Indonesien	Indonesien		
1116/4	<i>Litopenaeus vannamei</i>	Aquakultur	Thailand	Thailand		
1116/5	<i>Macrobrachium rosenbergii</i>	Aquakultur	Indien	Indien		
1116/6	<i>Pandalus borealis</i>	Wildfang	Nordatlantik	Atlantik		
1116/7	<i>Pandalus borealis</i>	Wildfang	Nordwestatlantik	Atlantik		
1116/8	<i>Litopenaeus vannamei</i>	Aquakultur	Vietnam	Vietnam	Vc, Vv	
1116/9	<i>Penaeus</i> spp.	Aquakultur	Vietnam	Vietnam	Va, Vv	
1116/10	<i>Litopenaeus vannamei</i>	Aquakultur	Ecuador	Ecuador		
1116/11	<i>Penaeus</i> spp.	Aquakultur	Vietnam	Vietnam	Vv, Vp, Va	
1116/12	<i>Metapenaeus</i> spp.	Wildfang	Indischer Ozean	Indischer Ozean	Vv	
1116/14	<i>Penaeus</i> spp.	Aquakultur	Thailand	Thailand	Va, Vv	
1116/15	<i>Crangon crangon</i>	Aquakultur	Nordostatlantik	Atlantik		

<sup>1</sup> n. A., nicht angegeben

<sup>2</sup> Va, *Vibrio alginolyticus*; Vc, *Vibrio cholerae*; Vm, *Vibrio metschnikovii*; Vp, *Vibrio parahaemolyticus*; Vv, *Vibrio vulnificus*

**Tabelle A4:** Anzahl (#) und Häufigkeiten (%) der Sequenztypen und Allele

Fett markiert sind die Sequenztypen und Allele, die neu im Vergleich zur pubMLST-Datenbank waren.

Sequenztyp	<i>dnaE</i>		<i>gyrB</i>		<i>recA</i>		<i>dtdS</i>		<i>pntA</i>		<i>pyrC</i>		<i>tnaA</i>										
	#	%	#	%	#	%	#	%	#	%	#	%	#	%									
<b>394</b>	10	7,7	26	14	10,8	16	11	8,5	<b>162</b>	<b>10</b>	7,7	19	12	9,2	26	19	14,6	3	11	8,5	57	16	12,3
<b>395</b>	7	5,4	<b>166</b>	10	7,7	<b>211</b>	10	7,7	70	7	5,4	7	10	7,7	23	15	11,5	46	10	7,7	1	11	8,5
<b>397</b>	7	5,4	<b>169</b>	7	5,4	<b>104</b>	7	5,4	124	7	5,4	<b>183</b>	10	7,7	4	11	8,5	32	8	6,2	23	11	8,5
<b>722</b>	5	3,8	153	6	4,6	<b>218</b>	7	5,4	151	7	5,4	50	8	6,2	18	11	8,5	11	7	5,4	13	8	6,2
121	4	3,1	31	5	3,8	84	5	3,8	13	6	4,6	73	8	6,2	50	11	8,5	119	7	5,4	94	8	6,2
355	4	3,1	42	5	3,8	2	4	3,1	75	6	4,6	94	8	6,2	28	7	5,4	8	6	4,6	7	6	4,6
481	4	3,1	3	4	3,1	13	4	3,1	10	5	3,8	12	6	4,6	14	4	3,1	78	6	4,6	20	5	3,8
<b>409</b>	3	2,3	4	4	3,1	191	4	3,1	<b>234</b>	5	3,8	91	6	4,6	2	3	2,3	<b>171</b>	5	3,8	2	4	3,1
<b>760</b>	3	2,3	11	4	3,1	25	3	2,3	3	4	3,1	23	3	2,3	10	3	2,3	9	4	3,1	26	4	3,1
<b>396</b>	2	1,5	119	4	3,1	75	3	2,3	11	4	3,1	123	3	2,3	24	3	2,3	18	4	3,1	46	4	3,1
<b>401</b>	2	1,5	142	4	3,1	106	3	2,3	31	4	3,1	5	2	1,5	30	3	2,3	24	4	3,1	66	4	3,1
<b>424</b>	2	1,5	5	3	2,3	151	3	2,3	82	4	3,1	8	2	1,5	31	3	2,3	7	3	2,3	37	3	2,3
<b>537</b>	2	1,5	17	3	2,3	<b>223</b>	3	2,3	19	3	2,3	29	2	1,5	33	3	2,3	<b>205</b>	3	2,3	50	3	2,3
<b>540</b>	2	1,5	33	3	2,3	4	2	1,5	64	3	2,3	55	2	1,5	61	2	1,5	5	2	1,5	105	3	2,3
<b>544</b>	2	1,5	47	3	2,3	22	2	1,5	24	2	1,5	79	2	1,5	<b>111</b>	2	1,5	35	2	1,5	12	2	1,5
<b>727</b>	2	1,5	111	3	2,3	58	2	1,5	25	2	1,5	139	2	1,5	<b>114</b>	2	1,5	62	2	1,5	17	2	1,5
<b>756</b>	2	1,5	9	2	1,5	115	2	1,5	38	2	1,5	<b>178</b>	2	1,5	<b>117</b>	2	1,5	91	2	1,5	24	2	1,5
<b>758</b>	2	1,5	27	2	1,5	117	2	1,5	80	2	1,5	<b>182</b>	2	1,5	<b>137</b>	2	1,5	158	2	1,5	38	2	1,5
<b>764</b>	2	1,5	28	2	1,5	<b>213</b>	2	1,5	135	2	1,5	<b>185</b>	2	1,5	<b>168</b>	2	1,5	<b>160</b>	2	1,5	68	2	1,5
28	1	0,8	35	2	1,5	<b>217</b>	2	1,5	<b>145</b>	2	1,5	187	2	1,5	11	1	0,8	<b>162</b>	2	1,5	83	2	1,5
56	1	0,8	112	2	1,5	<b>224</b>	2	1,5	<b>165</b>	2	1,5	<b>290</b>	2	1,5	19	1	0,8	<b>204</b>	2	1,5	86	2	1,5
79	1	0,8	<b>170</b>	2	1,5	<b>296</b>	2	1,5	<b>168</b>	2	1,5	21	1	0,8	39	1	0,8	<b>260</b>	2	1,5	<b>116</b>	2	1,5
114	1	0,8	196	2	1,5	<b>297</b>	2	1,5	<b>196</b>	2	1,5	54	1	0,8	46	1	0,8	6	1	0,8	<b>124</b>	2	1,5
162	1	0,8	232	2	1,5	327	2	1,5	<b>197</b>	2	1,5	61	1	0,8	47	1	0,8	10	1	0,8	<b>184</b>	2	1,5
233	1	0,8	<b>238</b>	2	1,5	7	1	0,8	200	2	1,5	67	1	0,8	49	1	0,8	16	1	0,8	18	1	0,8
246	1	0,8	2	1	0,8	15	1	0,8	217	2	1,5	74	1	0,8	56	1	0,8	23	1	0,8	36	1	0,8
253	1	0,8	12	1	0,8	29	1	0,8	6	1	0,8	120	1	0,8	60	1	0,8	31	1	0,8	61	1	0,8
<b>391</b>	1	0,8	20	1	0,8	40	1	0,8	35	1	0,8	121	1	0,8	63	1	0,8	33	1	0,8	73	1	0,8
392	1	0,8	22	1	0,8	43	1	0,8	53	1	0,8	124	1	0,8	73	1	0,8	37	1	0,8	77	1	0,8
<b>398</b>	1	0,8	25	1	0,8	50	1	0,8	60	1	0,8	126	1	0,8	83	1	0,8	43	1	0,8	84	1	0,8
<b>399</b>	1	0,8	29	1	0,8	52	1	0,8	61	1	0,8	133	1	0,8	94	1	0,8	58	1	0,8	90	1	0,8
<b>400</b>	1	0,8	51	1	0,8	56	1	0,8	72	1	0,8	149	1	0,8	95	1	0,8	73	1	0,8	104	1	0,8
<b>402</b>	1	0,8	55	1	0,8	87	1	0,8	74	1	0,8	150	1	0,8	<b>115</b>	1	0,8	83	1	0,8	<b>115</b>	1	0,8
<b>403</b>	1	0,8	58	1	0,8	113	1	0,8	77	1	0,8	159	1	0,8	128	1	0,8	92	1	0,8	<b>117</b>	1	0,8
<b>404</b>	1	0,8	60	1	0,8	124	1	0,8	91	1	0,8	<b>177</b>	1	0,8	142	1	0,8	107	1	0,8	<b>118</b>	1	0,8
<b>405</b>	1	0,8	61	1	0,8	136	1	0,8	98	1	0,8	<b>179</b>	1	0,8	<b>159</b>	1	0,8	110	1	0,8	<b>120</b>	1	0,8
<b>406</b>	1	0,8	80	1	0,8	141	1	0,8	113	1	0,8	<b>180</b>	1	0,8	160	1	0,8	128	1	0,8	<b>122</b>	1	0,8
<b>407</b>	1	0,8	97	1	0,8	143	1	0,8	114	1	0,8	<b>184</b>	1	0,8	<b>166</b>	1	0,8	159	1	0,8	<b>123</b>	1	0,8
<b>408</b>	1	0,8	102	1	0,8	152	1	0,8	115	1	0,8	195	1	0,8	<b>167</b>	1	0,8	<b>163</b>	1	0,8	<b>125</b>	1	0,8
<b>410</b>	1	0,8	109	1	0,8	154	1	0,8	123	1	0,8	201	1	0,8	<b>169</b>	1	0,8	<b>164</b>	1	0,8	<b>182</b>	1	0,8
<b>411</b>	1	0,8	121	1	0,8	165	1	0,8	150	1	0,8	205	1	0,8	<b>170</b>	1	0,8	<b>165</b>	1	0,8	<b>183</b>	1	0,8
<b>412</b>	1	0,8	131	1	0,8	<b>188</b>	1	0,8	<b>159</b>	1	0,8	209	1	0,8				<b>168</b>	1	0,8	<b>185</b>	1	0,8
<b>419</b>	1	0,8	157	1	0,8	<b>208</b>	1	0,8	<b>160</b>	1	0,8	<b>224</b>	1	0,8				<b>169</b>	1	0,8	<b>186</b>	1	0,8
<b>420</b>	1	0,8	158	1	0,8	<b>210</b>	1	0,8	<b>161</b>	1	0,8	<b>225</b>	1	0,8				<b>170</b>	1	0,8	<b>187</b>	1	0,8
<b>422</b>	1	0,8	<b>165</b>	1	0,8	<b>212</b>	1	0,8	<b>163</b>	1	0,8	<b>226</b>	1	0,8				190	1	0,8			
<b>423</b>	1	0,8	<b>167</b>	1	0,8	<b>215</b>	1	0,8	<b>164</b>	1	0,8	243	1	0,8				<b>206</b>	1	0,8			
<b>425</b>	1	0,8	<b>168</b>	1	0,8	<b>216</b>	1	0,8	<b>169</b>	1	0,8	282	1	0,8				229	1	0,8			
<b>426</b>	1	0,8	<b>171</b>	1	0,8	<b>220</b>	1	0,8	<b>195</b>	1	0,8	287	1	0,8				<b>257</b>	1	0,8			
<b>428</b>	1	0,8	175	1	0,8	<b>221</b>	1	0,8	<b>198</b>	1	0,8	<b>288</b>	1	0,8				<b>258</b>	1	0,8			
430	1	0,8	188	1	0,8	<b>222</b>	1	0,8	<b>199</b>	1	0,8	289	1	0,8				<b>259</b>	1	0,8			
<b>538</b>	1	0,8	<b>221</b>	1	0,8	239	1	0,8	205	1	0,8	<b>291</b>	1	0,8				<b>261</b>	1	0,8			
<b>539</b>	1	0,8	<b>236</b>	1	0,8	280	1	0,8	223	1	0,8	<b>292</b>	1	0,8				<b>262</b>	1	0,8			
<b>541</b>	1	0,8	<b>237</b>	1	0,8	287	1	0,8	<b>232</b>	1	0,8	<b>293</b>	1	0,8				<b>263</b>	1	0,8			
<b>542</b>	1	0,8	<b>239</b>	1	0,8	<b>298</b>	1	0,8	<b>233</b>	1	0,8	<b>294</b>	1	0,8				<b>264</b>	1	0,8			
<b>543</b>	1	0,8	<b>240</b>	1	0,8	<b>299</b>	1	0,8	<b>239</b>	1	0,8	<b>295</b>	1	0,8				<b>265</b>	1	0,8			
<b>545</b>	1	0,8				322	1	0,8	<b>240</b>	1	0,8												
<b>673</b>	1	0,8				330	1	0,8	<b>241</b>	1	0,8												
711	1	0,8				<b>332</b>	1	0,8															
<b>718</b>	1	0,8				<b>333</b>	1	0,8															

Sequenztyp			<i>dnaE</i>		<i>gyrB</i>		<i>recA</i>		<i>dtdS</i>		<i>pntA</i>		<i>pyrC</i>		<i>tnaA</i>	
#	%		#	%	#	%	#	%	#	%	#	%	#	%	#	%
719	1	0,8			334	1	0,8									
720	1	0,8			335	1	0,8									
721	1	0,8			337	1	0,8									
723	1	0,8			338	1	0,8									
724	1	0,8			339	1	0,8									
725	1	0,8			340	1	0,8									
726	1	0,8														
728	1	0,8														
755	1	0,8														
757	1	0,8														
759	1	0,8														
761	1	0,8														
762	1	0,8														
763	1	0,8														
765	1	0,8														
766	1	0,8														
767	1	0,8														
768	1	0,8														
769	1	0,8														
770	1	0,8														
771	1	0,8														
773	1	0,8														
774	1	0,8														

**Tabelle A5:** Anzahl (#) und Häufigkeiten (%) der Peptid-Sequenztyp und Allele  
Fett markiert sind die Peptid-Sequenztypen und Allele, die neu im Vergleich zur pubMLST-Datenbank waren.

Peptid-Sequenztyp			p_ <i>dnaE</i>		p_ <i>gyrB</i>		p_ <i>recA</i>		p_ <i>dtdS</i>			p_ <i>pntA</i>			p_ <i>pyrC</i>			p_ <i>tnaA</i>		
#	%		#	%	#	%	#	%	#	%	#	%	#	%	#	%	#	%	#	%
1	37	28,5	1	82	63,1	1	130	100	1	130	100	1	120	92,3	1	83	63,8	1	118	90,8
2	25	19,2	2	43	33,1				3	1	0,8	2	3	2,3	2	17	13,1	2	6	4,6
3	14	10,8	4	2	1,5				9	1	0,8	13	2	1,5	3	12	9,2	25	2	1,5
4	9	6,9	9	2	1,5							15	2	1,5	7	4	3,1	6	1	0,8
6	6	4,6	15	1	0,8							4	1	0,8	4	2	1,5	20	1	0,8
19	4	3,1										34	1	0,8	5	2	1,5	21	1	0,8
5	2	1,5										35	1	0,8	12	2	1,5	24	1	0,8
10	2	1,5													14	2	1,5			
11	2	1,5													6	1	0,8			
17	2	1,5													13	1	0,8			
20	2	1,5													18	1	0,8			
29	2	1,5													21	1	0,8			
41	2	1,5													36	1	0,8			
69	2	1,5													41	1	0,8			
129	2	1,5																		
158	2	1,5																		
14	1	0,8																		
39	1	0,8																		
48	1	0,8																		
54	1	0,8																		
60	1	0,8																		
79	1	0,8																		
85	1	0,8																		
95	1	0,8																		
100	1	0,8																		
119	1	0,8																		
123	1	0,8																		
136	1	0,8																		
151	1	0,8																		
152	1	0,8																		
164	1	0,8																		

**Tabelle A6:** Peptid-Sequenztypen aller Sequenztypen der pubMLST-Datenbank

Angegeben ist das Allel-Profil auf Peptid-Ebene, die Anzahl der Sequenztypen, der Anteil der Sequenztypen (%) sowie welche Sequenztypen den jeweiligen Peptid-Sequenztypen bilden.

Peptid-Sequenztyp	p_dnaE	p_gyrB	p_recA	p_dtdS	p_pntA	p_pyrC	p_tnaA	Anzahl	Anteil [%]	Sequenztyp
1	1	1	1	1	1	1	1	142	24,3	20, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 29, 43, 46, 47, 51, 54, 56, 57, 60, 61, 62, 84, 91, 96, 97, 98, 99, 104, 105, 116, 117, 118, 120, 123, 131, 136, 137, 150, 185, 190, 195, 218, 222, 223, 225, 237, 240, 241, 244, 246, 247, 257, 263, 267, 273, 280, 283, 285, 290, 292, 294, 300, 302, 310, 311, 312, 319, 330, 333, 335, 336, 337, 350, 354, 355, 365, 370, 378, 384, 397, 399, 410, 419, 420, 422, 424, 432, 441, 445, 447, 450, 451, 453, 454, 457, 460, 462, 463, 465, 469, 474, 480, 485, 488, 490, 491, 498, 500, 504, 507, 514, 520, 521, 522, 529, 536, 541, 645, 647, 650, 670, 675, 681, 687, 688, 691, 699, 701, 704, 706, 711, 713, 719, 721, 722, 725, 726, 761, 763, 764, 768, 773, 776, 783, 785
2	2	1	1	1	1	1	1	127	21,7	2, 3, 5, 10, 11, 12, 17, 42, 63, 67, 72, 74, 76, 80, 85, 86, 88, 112, 121, 189, 192, 196, 197, 200, 216, 219, 220, 232, 243, 249, 256, 258, 260, 261, 268, 271, 274, 277, 279, 281, 288, 295, 305, 308, 317, 320, 323, 327, 331, 339, 343, 344, 345, 356, 363, 366, 372, 380, 385, 391, 392, 400, 403, 406, 407, 409, 415, 423, 425, 428, 430, 431, 433, 434, 435, 436, 438, 439, 443, 448, 456, 458, 461, 466, 468, 472, 479, 486, 487, 492, 494, 496, 499, 501, 502, 506, 526, 530, 532, 537, 538, 540, 545, 641, 642, 672, 680, 682, 685, 690, 695, 696, 698, 703, 708, 714, 716, 724, 770, 777, 780, 786, 787, 788, 790, 791, 792
3	1	1	1	1	1	2	1	28	4,8	21, 36, 37, 39, 59, 101, 122, 138, 162, 328, 332, 352, 394, 411, 444, 483, 511, 512, 516, 539, 684, 692, 694, 702, 715, 774, 778, 784
4	1	1	1	1	1	3	1	26	4,5	8, 81, 89, 100, 106, 154, 224, 282, 301, 304, 325, 326, 341, 374, 383, 390, 395, 413, 473, 476, 482, 510, 649, 755, 767, 781
5	2	1	1	1	1	2	1	17	2,9	73, 198, 227, 229, 233, 238, 358, 377, 404, 493, 513, 518, 519, 525, 644, 689, 705
6	1	1	1	1	1	1	2	13	2,2	28, 30, 95, 102, 135, 309, 313, 314, 315, 405, 412, 455, 760
7	2	1	1	1	1	3	1	11	1,9	93, 107, 124, 194, 235, 293, 340, 389, 416, 437, 528
8	1	1	1	1	1	1	3	8	1,4	32, 34, 35, 77, 306, 307, 316, 334
9	1	1	1	1	2	1	1	7	1,2	52, 68, 254, 269, 289, 291, 367
10	1	1	1	1	1	5	1	6	1,0	58, 64, 114, 351, 375, 771
11	1	1	1	1	1	4	1	6	1,0	79, 139, 253, 382, 471, 789
12	1	1	1	1	1	8	1	5	0,9	115, 296, 373, 683, 686
13	1	1	1	1	4	1	1	4	0,7	284, 503, 640, 710
14	2	1	1	1	4	1	1	4	0,7	697, 707, 709, 728
15	1	1	1	1	1	6	1	3	0,5	252, 386, 467
16	1	1	1	1	1	10	1	3	0,5	125, 654, 671
17	1	1	1	1	1	12	1	3	0,5	141, 142, 727
18	1	1	1	1	3	1	1	3	0,5	49, 53, 221
19	2	1	1	1	1	7	1	3	0,5	6, 481, 646
20	2	1	1	1	2	3	1	3	0,5	66, 396, 693
21	2	1	1	1	3	2	1	3	0,5	4, 13, 700
22	2	1	1	1	6	1	1	3	0,5	191, 360, 523
23	1	1	1	1	1	9	1	2	0,3	217, 524
24	1	1	1	1	3	2	1	2	0,3	50, 90
25	1	1	1	1	7	1	1	2	0,3	109, 110
26	2	1	1	1	1	1	4	2	0,3	41, 199
27	2	1	1	1	1	6	1	2	0,3	297, 712
28	2	1	1	1	1	11	1	2	0,3	15, 255
29	2	1	1	1	1	14	1	2	0,3	757, 769
30	2	1	1	1	5	1	5	2	0,3	83, 264
31	3	1	1	1	1	1	1	2	0,3	69, 484
32	5	1	1	1	1	1	1	2	0,3	242, 648
33	6	1	1	1	1	1	1	2	0,3	78, 236
34	7	1	1	1	1	13	1	2	0,3	133, 322
35	1	1	1	1	1	1	6	1	0,2	143
36	1	1	1	1	1	1	9	1	0,2	353
37	1	1	1	1	1	1	11	1	0,2	44
38	1	1	1	1	1	1	12	1	0,2	75

Peptid- Sequenztyp								Anzahl	Anteil [%]	Sequenztyp	Peptid- Sequenztyp								Anzahl	Anteil [%]	Sequenztyp
	p_dnaE	p_gyrB	p_recA	p_dtdS	p_pntA	p_pyrC	p_tnaA					p_dnaE	p_gyrB	p_recA	p_dtdS	p_pntA	p_pyrC	p_tnaA			
39	1	1	1	1	1	1	20	1	0,2	402	103	2	1	1	1	1	2	8	1	0,2	193
40	1	1	1	1	1	1	23	1	0,2	717	104	2	1	1	1	1	3	7	1	0,2	381
41	1	1	1	1	1	1	25	1	0,2	756	105	2	1	1	1	1	4	1	1	0,2	87
42	1	1	1	1	1	2	2	1	0,2	129	106	2	1	1	1	1	9	1	1	0,2	442
43	1	1	1	1	1	2	3	1	0,2	324	107	2	1	1	1	1	10	1	1	0,2	278
44	1	1	1	1	1	2	16	1	0,2	245	108	2	1	1	1	1	15	1	1	0,2	508
45	1	1	1	1	1	3	8	1	0,2	250	109	2	1	1	1	1	16	1	1	0,2	228
46	1	1	1	1	1	7	1	1	0,2	108	110	2	1	1	1	1	22	1	1	0,2	515
47	1	1	1	1	1	11	1	1	0,2	262	111	2	1	1	1	1	23	1	1	0,2	16
48	1	1	1	1	1	13	1	1	0,2	765	112	2	1	1	1	1	25	1	1	0,2	14
49	1	1	1	1	1	15	1	1	0,2	113	113	2	1	1	1	1	28	1	1	0,2	128
50	1	1	1	1	1	16	1	1	0,2	329	114	2	1	1	1	1	29	1	1	0,2	126
51	1	1	1	1	1	17	4	1	0,2	446	115	2	1	1	1	1	35	1	1	0,2	379
52	1	1	1	1	1	17	22	1	0,2	643	116	2	1	1	1	1	38	1	1	0,2	497
53	1	1	1	1	1	20	1	1	0,2	272	117	2	1	1	1	1	39	1	1	0,2	489
54	1	1	1	1	1	21	1	1	0,2	542	118	2	1	1	1	1	40	1	1	0,2	533
55	1	1	1	1	1	27	2	1	0,2	103	119	2	1	1	1	1	41	1	1	0,2	766
56	1	1	1	1	1	30	1	1	0,2	230	120	2	1	1	1	2	1	1	1	0,2	371
57	1	1	1	1	1	31	1	1	0,2	298	121	2	1	1	1	2	1	2	1	0,2	464
58	1	1	1	1	1	33	1	1	0,2	361	122	2	1	1	1	2	1	10	1	0,2	342
59	1	1	1	1	1	34	1	1	0,2	369	123	2	1	1	1	2	2	1	1	0,2	543
60	1	1	1	1	1	36	1	1	0,2	408	124	2	1	1	1	4	3	1	1	0,2	470
61	1	1	1	1	2	1	14	1	0,2	130	125	2	1	1	1	5	1	1	1	0,2	1
62	1	1	1	1	2	2	1	1	0,2	19	126	2	1	1	1	8	37	1	1	0,2	449
63	1	1	1	1	2	3	17	1	0,2	275	127	2	1	1	1	10	1	1	1	0,2	414
64	1	1	1	1	2	9	1	1	0,2	299	128	2	1	1	1	14	1	1	1	0,2	417
65	1	1	1	1	8	3	1	1	0,2	127	129	2	1	1	1	15	1	1	1	0,2	544
66	1	1	1	1	9	1	1	1	0,2	475	130	2	1	1	1	17	1	4	1	0,2	40
67	1	1	1	1	11	1	1	1	0,2	276	131	2	1	1	1	22	1	1	1	0,2	321
68	1	1	1	1	12	1	1	1	0,2	338	132	2	1	1	1	25	1	1	1	0,2	234
69	1	1	1	1	13	1	1	1	0,2	401	133	2	1	1	1	27	1	1	1	0,2	270
70	1	1	1	1	19	2	1	1	0,2	38	134	2	1	1	1	32	1	1	1	0,2	452
71	1	1	1	1	20	1	1	1	0,2	119	135	2	1	1	1	33	1	1	1	0,2	517
72	1	1	1	1	21	1	1	1	0,2	180	136	2	1	1	1	34	1	1	1	0,2	673
73	1	1	1	1	23	1	1	1	0,2	215	137	2	1	1	2	1	1	1	1	0,2	534
74	1	1	1	1	24	1	1	1	0,2	226	138	2	1	1	3	1	18	1	1	0,2	505
75	1	1	1	1	26	2	2	1	0,2	231	139	2	1	1	8	1	1	1	1	0,2	364
76	1	1	1	1	28	2	1	1	0,2	287	140	2	1	2	1	1	1	1	1	0,2	265
77	1	1	1	1	29	32	1	1	0,2	357	141	2	1	3	1	1	1	1	1	0,2	251
78	1	1	1	1	30	1	1	1	0,2	359	142	2	1	7	1	31	14	1	1	0,2	388
79	1	1	1	1	35	3	24	1	0,2	718	143	2	2	1	1	1	1	1	1	0,2	239
80	1	1	1	2	1	1	1	1	0,2	362	144	2	2	1	1	1	4	1	1	0,2	9
81	1	1	1	4	1	1	3	1	0,2	33	145	2	3	1	1	1	1	1	1	0,2	440
82	1	1	1	5	1	1	1	1	0,2	45	146	2	3	1	1	1	6	1	1	0,2	459
83	1	1	1	6	1	1	1	1	0,2	94	147	2	5	1	1	18	7	1	1	0,2	7
84	1	1	1	7	1	1	1	1	0,2	188	148	2	7	1	1	1	1	13	1	0,2	531
85	1	1	1	9	1	1	1	1	0,2	398	149	3	1	1	1	5	1	1	1	0,2	368
86	1	1	4	1	1	1	1	1	0,2	18	150	3	1	2	1	1	1	1	1	0,2	527
87	1	1	5	1	1	1	2	1	0,2	31	151	4	1	1	1	1	1	1	1	0,2	759
88	1	1	6	1	3	1	1	1	0,2	70	152	4	1	1	1	1	6	1	1	0,2	762
89	1	1	8	1	9	1	1	1	0,2	477	153	4	1	1	1	1	19	2	1	0,2	318
90	1	1	9	1	1	1	1	1	0,2	509	154	4	1	1	1	1	26	1	1	0,2	111
91	1	4	1	1	1	2	7	1	0,2	65	155	5	1	1	1	1	2	1	1	0,2	495
92	1	6	1	1	16	24	1	1	0,2	48	156	5	1	1	1	1	4	1	1	0,2	55
93	2	1	1	1	1	1	2	1	0,2	71	157	8	1	1	1	1	1	1	1	0,2	259
94	2	1	1	1	1	1	5	1	0,2	82	158	9	1	1	1	1	1	1	1	0,2	758
95	2	1	1	1	1	1	6	1	0,2	723	159	10	1	1	1	1	1	1	1	0,2	303
96	2	1	1	1	1	1	9	1	0,2	393	160	11	1	1	1	1	3	1	1	0,2	286
97	2	1	1	1	1	1	15	1	0,2	266	161	12	1	1	1	1	3	1	1	0,2	348
98	2	1	1	1	1	1	18	1	0,2	349	162	13	1	1	1	1	1	1	1	0,2	376
99	2	1	1	1	1	1	19	1	0,2	387	163	14	1	1	1	1	1	1	1	0,2	478
100	2	1	1	1	1	1	21	1	0,2	426	164	15	1	1	3	1	18	1	1	0,2	720
101	2	1	1	1	1	2	2	1	0,2	134	165	1	1	1	1	1	40	1	1	0,2	779
102	2	1	1	1	1	2	6	1	0,2	248	166	1	1	1	1	29	1	1	1	0,2	782

**Tabelle A7:** Allele der AA-MLST-Loki

Angegeben sind die Anzahl der veröffentlichten Peptid-Sequenztypen (pSTs), Sequenztypen (STs) und Allele auf Nukleotid-Ebene sowie die Allele auf Nukleotid-Ebene, die durch das Allel auf Peptid-Ebene repräsentiert werden und die Sequenz des Peptid-Allels.

Allel	Vorhanden in			Nukleotid-Allele und Sequenz
	pSTs	STs	Allelen	
<b>p_dnaE1</b>	77	323	104	2, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 33, 34, 35, 36, 37, 39, 40, 41, 45, 47, 49, 50, 52, 53, 54, 55, 57, 58, 59, 60, 61, 63, 64, 70, 71, 79, 80, 81, 85, 89, 91, 95, 96, 99, 100, 105, 106, 108, 110, 111, 112, 115, 116, 118, 120, 126, 128, 130, 131, 134, 135, 137, 139, 140, 142, 143, 146, 149, 152, 153, 154, 155, 157, 159, 165, 166, 169, 170, 172, 175, 176, 177, 180, 183, 187, 191, 193, 195, 205, 206, 225, 226, 227, 229, 234, 237 DIPEALENSVEIAKRCNVTVRLGEYFLPAFPTEGMEETEFLVMKSREGLEERLEFLFPDEEERKKRRPEYDERLQIELDVINQMGGFPGYFLIVMEFIQWS KDNAIPVGPGRGSGAGSLVAYALKITDLDPLEYDLLFERFLNPERVSMDFDVFCDKRDQVIDHVAEMYGRDAVSQIITFGTM
<b>2</b>	69	237	72	1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 22, 38, 42, 44, 48, 51, 62, 69, 73, 82, 83, 84, 92, 93, 94, 97, 98, 101, 102, 103, 107, 109, 117, 119, 121, 123, 127, 129, 132, 133, 138, 141, 144, 145, 147, 150, 156, 158, 161, 162, 163, 167, 168, 171, 173, 174, 178, 179, 181, 182, 186, 188, 189, 190, 194, 196, 221, 230, 232, 233 DIPEALENSVEIAKRCNVTVRLGEYFLPAFPTEGMEETEFLVMKSREGLEERLEFLFPNEEERKKRRPEYDERLQIELDVINQMGGFPGYFLIVMEFIQWS KDNAIPVGPGRGSGAGSLVAYALKITDLDPLEYDLLFERFLNPERVSMDFDVFCDKRDQVIDHVAEMYGRDAVSQIITFGTM
<b>3</b>	3	4	1	43 DIPEALENSVEIAKRCNVTVRLGEYFLPAFPTEGMEETEFLVMKSREGLEERLEFLFPDEEERKKRRPEYDERLQIELDVINQMGGFPGYFLIVMEFIQWS KDNAIPVGPGRGSGAGSLVAYALKITDLDPLEYDLLFERFLNPERVSMDFDVFCDKRDQVIDHVAEMYGRDAVSQIITFGTM
<b>4</b>	4	4	3	56, 239, 240 DIPEALENSVEIAKRCNVTVRLGEYFLPAFPTEGMEETEFLVMKSREGLEERLEFLFPDEEERKKRRPEYDERLQIELDVINQMGGFPGYFLIVMEFIQWS KDNAIPVGPGRGSGAGSLVAYALKITDLDPLEYDLLFERFLNPERVSMDFDVFCDKRDQVIDHVAEMYGRDAVSQIITFGTM
<b>5</b>	3	4	4	32, 113, 192, 228 DIPEALENSVEIAKRCNVTVRLGEYFLPAFPTEGMEETEFLVMKSREGLEERLEFLFPDEEERKKRRPEYDERLQIELDVINQMGGFPGYFLIVMEFIQWS KDNAIPVGPGRGSGAGSLVAYALKITDLDPLEYDLLFERFLNPERVSMDFDVFCDKRDQVIDHVAEMYGRDAVSQIITFGTM
<b>6</b>	1	2	2	46, 114 DIPEALENSVEIAKRCNVTVRLGEYFLPAFPTEGMEETEFLVMKSREGLEERLEFLFPDEEERKKRRPEYDERLQIELDVINQMGGFPGYFLIVMEFIQWS KDNAIPVGPGRGSGAGSLVAYALKITDLDPLEYDLLFERFLNPERVSMDFDVFCDKRDQVIDHVAEMYGRDAVSQIITFGTM
<b>7</b>	1	2	1	86 DIPEALENSVEIAKRCNVTVRLGEYFLPAFPTEGMEETEFLVMKSREGLEERLEFLFPNEEERKKRRPEYDERLQIELDVINQMGGFPGYFLIVMEFIQWS KDNAIPVGPGRGSGAGSLVAYALKITDLDPLEYDLLFERFLNPERVSMDFDVFCDKRDQVIDHVAEMYGRDAVSQIITFGTM
<b>8</b>	1	1	1	122 DIPEALENSVEIAKRCNVTVRLGEYFLPAFPTEGMEETEFLVMKSREGLEERLEFLFPNEEERKKRRPEYDERLQIELDVINQMGGFPGYFLIVMEFIQWS KDNAIPVGPGRGSGAGSLVAYALKITDLDPLEYDLLFERFLNPERVSMDFDVFCDKRDQVIDHVAEMYGRDAVSQIITFGTM
<b>9</b>	1	1	1	238 DIPEALENSVEIAKRCNVTVRLGEYFLPAFPTEGMEETEFLVMKSREGLEERLEFLFPNEEERKNRRPEYDERLQIELDVINQMGGFPGYFLIVMEFIQWS KDNAIPVGPGRGSGAGSLVAYALKITDLDPLEYDLLFERFLNPERVSMDFDVFCDKRDQVIDHVAEMYGRDAVSQIITFGTM
<b>10</b>	1	1	1	125 DIPEALENSVEIAKRCNVTVRLGEYFLPAFPTEGMEETEFLVMKSREGLEERLEFLFPDEEERKKRRPEYDERLQVELDVINQMGGFPGYFLIVMEFIQWS KDNAIPVGPGRGSGAGSLVAYALKITDLDPLEYDLLFERFLNPERVSMDFDVFCDKRDQVIDHVAEMYGRDAVSQIITFGTM
<b>11</b>	1	1	1	136 DIPEALENSVEIAKRCNVTVRLGEYFLPAFPTEGMEETEFLVMKSREGLEERLEFLFPNEEERKKRRPEYDERLQIELDVINQMGGFPGYFLIVMEFIQWS KDNSIPVGPGRGSGAGSLVAYALKITDLDPLEYDLLFERFLNPERVSMDFDVFCDKRDQVIDHVAEMYGRDAVSQIITFGTM
<b>12</b>	1	1	1	151

Allel	Vorhanden in			Nukleotid-Allele und Sequenz
	pSTs	STs	Allelen	
13	1	1	1	DIPEALENSVEIAKRCNVTVRLGEYFLPAFPTEGMEETEFLVMKSREGLEERLEFLFPDEEELKKRRPEYDERLQIELDVINQMGGFPGYFLIVMEFIQWS KDNAIPVGPGRGSGAGSLVAYALKITDLDPLEYDLLFERFLNPERVSMDFDVFDCMDKRDQVIDHVAEMYGRDAVSQIITFGTM 160
				DIPEALENSVEIAKRCNVTVRLGEYFLPAFPTEGMEETEFLVMKSREGLEERLEFLFPDEEERKKRRSEYDERLQIELDVINQMGGFPGYFLIVMEFIQWS KDNAIPVGPGRGSGAGSLVAYALKITDLDPLEYDLLFERFLNPERVSMDFDVFDCMDKRDQVIDHVAEMYGRDAVSQIITFGTM 185
14	1	1	1	DIPEALENSVEIAKRCNVTVRLGEYFLPAFPTEGIEETEFLVMKSREGLEERLEFLFPDEEERKKRRPEYDERLQIELDVINQMGGFPGYFLIVMEFIQWSK DNAIPVGPGRGSGAGSLVAYALKITDLDPLEYDLLFERFLNPERVSMDFDVFDCMDKRDQVIDHVAEMYGRDAVSQIITFGTM 236
				DIPEALENSVEIAKRCNVTVRLGEYFLPAFPTEGMEETEFLVMKSREGLEERLEFLFPDEEERNKRRPEYDERLQIELDVINQMGGFPGYFLIVMEFIQWS KDNAIPVGPGRGSGAGSLVAYALKITDLDPLEYDLLFERFLNPERVSMDFDVFDCMDKRDQVIDHVAEMYGRDAVSQIITFGTM
15	1	1	1	DIPEALENSVEIAKRCNVTVRLGEYFLPAFPTEGMEETEFLVMKSREGLEERLEFLFPDEEERNKRRPEYDERLQIELDVINQMGGFPGYFLIVMEFIQWS KDNAIPVGPGRGSGAGSLVAYALKITDLDPLEYDLLFERFLNPERVSMDFDVFDCMDKRDQVIDHVAEMYGRDAVSQIITFGTM
				1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 10, 11, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 73, 74, 75, 77, 82, 83, 84, 87, 88, 90, 92, 95, 100, 101, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 115, 116, 117, 118, 119, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 245, 246, 247, 248, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 262, 263, 264, 265, 266, 276, 280, 285, 287, 295, 296, 297, 298, 299, 303, 304, 305, 306, 307, 308, 309, 310, 314, 315, 316, 319, 320, 321, 322, 323, 324, 325, 327, 330, 332, 333, 334, 335, 337, 338, 339, 340
p_gyrB1	158	576	267	FVQHLNTNKTPIIEKIFHFDLEREDGISVEVAMQWNDGFQENIFCFTNNIPQRDGGTHLAGFRAALRTLNSFMDKEGFSKAKTATSGDDAREGLTAV VSVKVPDPKFSSQTKDKLVSSEVKS AVESAMGEKLESEFLVENPSEAKMVC SKIIDAARAREAAARKAREMTRRKGALDLAGLPGKLADCQEKDPALSEL 6
				FVQHLNTNKTPIIEKIFHFDLEREDGISVEVAMQWNDGFQENIFCFTNNIPQRDGGTHLAGFRAALRTLNTFMDKEGFSKAKTATSGDDAREGLTAV VSVKVPDPKFSSQTKDKLVSSEVKS AVESAMGEKLESEFLVENPSEAKMVC SKIIDAARAREAAARKAREMTRRKGALDLAGLPGKLADCQEKDPALSEL 233, 244
2	2	2	1	FVQHLNTNKTPIIEKIFHFDLEREDGISVEVAMQWNDGFQENIFCFTNNIPQRDGGTHLAGFRAALRTLNSFMDKEGFSKAKTATSGDDAREGLTAV VSVKVPDPKFSSQTKDKLVSSEVKS AVESAMGEKLESEFLVENPSEAKMVC SKIIDAARAREAAARKAREMTRRKGALDLAGLPGKLADCQKDPALSEL 9
3	2	2	2	FVQHLNTNKTPIIEKIFHFDLEREDGISVEVAMQWNDGFQENIFCFTNNIPQRDGGTHLAGFRAALRTLNSFMDKEGFSKAKTATSGDDAREGLTAV VSVKVPDPKFSSQTKDKLVSSEVKS AVESAMGEKLESEFLVENPSEAKMVC SKIIDAARAREAAARKAREMTRRKGALDLAGLPGKLADCQEKDPALSEL 12
4	1	1	1	FVQHLNTNKTPIIEKIFHFDLEREDGISVEVATQWNDGFQENIFCFTNNIPQRDGGTHLAGFRAALRTLNSFMDKEGFSKAKTATSGDDAREGLTAVV SVKVPDPKFSSQTKDKLVSSEVKS AVESAMGEKLESEFLVENPSEAKMVC SKIIDAARAREAAARKAREMTRRKGALDLAGLPGKLADCQEKDPALSEL 26
5	1	1	1	FVQHLNTNKTPIIEKIFHFDLEREDGISVEVAMQWNDGFQENIFCFTNNIPQRDGGSHLAGFRAALRTLNSFMDKEGFSKAKTATSGDDAREGLTAV VSVKVPDPKFSSQTKDKLVSSEVKS AVESAMGEKLESEFLVENPSEAKMVC SKIIDAARAREAAARKAREMTRRKGALDLAGLPGKLADCQEKDPALSEL 267
6	1	1	1	FVQHLNTNKTPIIEKIFHFDLEREDGISVEVAMQWNDGFQENIFCFTNNIPQRDGGTHLAGFRAALRTLNSFMDKEGFSKAKTATSGDDAREGLTAV VSVKVPDPKFSSQTKDKLVSSEVKS AVESAMGEKLESEFLVENPSEAKMVC SKIIDAARAREAAARKAREMTRRKGALDLAGLPGKLADCQEKDPALSEL 267
7	1	1	1	FVQHLNTNKTPIIEKIFHFDLEREDGISVEVAMQWNDGFQENIFCFTNNIPQRDGGTHLAGFRAALRTLNSFMDKEGFSKAKTATSGDDAREGLTAV VSVKVPDPKFSSQTKDKLVSSEVKS AVESAMGEKLESEFLVENPSEAKMVC SKIIDAARAREAAARKAREMTRRKGALDLAGLPGKLADCQEKDPALSEL
p_recA1	157	575	193	1, 2, 3, 4, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 69, 70, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 80, 81, 82, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 119, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130,



Allel	Vorhanden in			Nukleotid-Allele und Sequenz
	pSTs	STs	Allelen	
				131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 205, 217, 219, 220, 221, 222, 223, 227, 229, 230, 232, 233, 234, 239, 240, 241 LSLDIALGAGGLPMGRIVEIYGPESSGKTTLTLELIAAAQREGKTCAFIDAEHALDPVYAKKLGVDIDALLVSQPDTGEQALEICDALARSGAIDVMVDSV AALTPKAEIEGEMGDSHMGLQARMLSQAMRKLGNLQSNCMCIFINQIRMKIGVMFGNPETTTGGNALKFYASVRLDIRRTGAIKEGDEVVGNETRIK VVKNKIAAPFKEANTQIMYGQGFNREGELIDLGVKHKLVEK
2	2	2	1	107 LSLDIALGAGGLPMGRIVEIFGPESGKTTLTLEVIAAAQKQKGTCAFIDAEHALDPIYAQKLGVNIDELLVSQPDTGEQALEICDALARSGAVDIVVDSV AALTPKAEIEGEMGDSHMGLQARLLSQSMRMTGNLKASNCMCIFINQIRMKIGVMFGNPETTTGGNALKFYASVRLDIRRTGAIKEGDEVVGNETRIK VVKNKIAAPFKEANTQILYGKGFNRYGELIDLGVKHKLVEK
3	1	1	1	120 LSLDIALGAGGLPMGRIVEIFGPESGKTTLTLEVIAAAQKQKGTCAFIDAEHALDPVYAQKLGVNIDELLVSQPDTGEQALEICDALARSGAVDVMVDS VAALTPKAEIEGEMGDSHMGLQARLLSQSMRMTGNLKASNCMCIFINQIRMKIGVMFGNPETTTGGNALKFYASVRLDIRRTGAIKEGDEVVGNETRI KVVKNKIAAPFKEANTQILYGKGFNRYGELIDLGVKHKLVEK
4	1	1	1	5 LSLDIALGAGGLPMGRIVEIYGPESSGKTTLTLELIAAAQREGKTCAFIDAEHALDPVYAKKLGVDIDALLVSQPDTGEQALEICDALTRSGAIDVMVDSV AALTPKAEIEGEMGDSHMGLQARMLSQAMRKLGNLQSNCMCIFINQIRMKIGVMFGNPETTTGGNALKFYASVRLDIRRTGAIKEGDEVVGNETRIK VVKNKIAAPFKEANTQIMYGQGFNREGELIDLGVKHKLVEK
5	1	1	1	7 LSLDIALGAGGLPMGRIVEIYGPESSKTTLTLELIAAAQREGKTCAFIDAEHALYPVYAKKLGVDIDALLVSQPDTGEQALEICDALTRSGAIDVMVDSV AALTPKAEIEGEMGDSHMGLQARMLSQAMRKLGNLQSNCMCIFINQIRMKIGVMFGNPETTTGGNALKFYASVRLDIRRTGAIKEGDEVVGNETRIK VVKNKIAAPFKEANTQIMYGQGFNREGELIDLGVKHKLVEK
6	1	1	1	37 LSLDIALGAGGLPMGRIVEIYGPESSGKTTLTQELIAAAQREGKTCAFIDAEHALDPVYAKKLGVDIDALLVSQPDTGEQALEICDALARSGAIDVMVDS VAALTPKAEIEGEMGDSHMGLQARMLSQAMRKLGNLQSNCMCIFINQIRMKIGVMFGNPETTTGGNALKFYASVRLDIRRTGAIKEGDEVVGNETRI KVVKNKIAAPFKEANTQIMYGQGFNREGELIDLGVKHKLVEK
7	1	1	1	157 LSLDIALGAGGLPMGRIVEIYGPESSGKTTLTLELIAAAQREGKTSAFIDAEHALDPVYAKKLGVDIDALLVSQPDTGEQALEICDALARSGAIDVMVDSV AALTPKAEIEGEMGDSHMGLQARMLSQAMRKLGNLQSNCMCIFINQIRMKIGVMFGNPETTTGGNALKFYASVRLDIRRTGAIKEGDEVVGNETRIK VVKNKIAAPFKEANTQIMYGQGFNREGELIDLGVKHKLVEK
8	1	1	1	170 LSLDIALGAGGLPMGRIVEIYGPESSGKTTLTLELIAAAQREGKTCAFIDAEHALDPVYAKKLGVDIDALLVSQPDTGEQALEICDALARSGAIDVMVDSV AALTPKAEIEGEMGDSHMGLQARMLSQAMRKLGNLQSNCMCIFINQIRMKIGVMFGNPETTTGGNALKFYASVRLDIRRTGAIKEGDEVVGNETRIK VVKNKIAAPFKEANTQIMYGQGFNREGELIDLGVKHKLVEK
9	1	1	1	184 LSLDIALGAGGLPMGRIVEIYGPESSGKTTLTLELIAAAQREGKTCAFIDAEHALDPVYAKKLGVDIDALLVSQPDTGEQALEICDALARSGAIDVMVDSV AALTPKAEIEGEMGDSHMGLQARMLSQAMRKLGNLQSNCMCIFINQIRMKIGVMFGNPETTTGGNALKFYASVRLDIRRTGAIKEGDEVVGNETRIK VVKNKIAAPFKEANTQIMYGQGFNREGELID*GVKHKLVEK
p_dtdS1	156	574	229	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 65, 67, 68, 69, 70, 71, 73, 74, 75, 76, 78, 79, 81, 82, 84, 88, 89, 91, 94, 95, 96, 97, 98, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 169, 170, 171, 173, 174, 175, 176, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 187, 188, 189, 190, 191, 192,

Allel	Vorhanden in			Nukleotid-Allele und Sequenz
	pSTs	STs	Allelen	
				193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 229, 237, 243, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 270, 274, 277, 278, 279, 280, 281, 282, 283, 284, 287, 288, 289, 290, 291, 292, 293, 294, 295 KIKKTAICGTDVHIYNWDEWSQKTIPVPMVVGHEYVGEVVAIGQEVRFGEIGDRVSGEGHITCGHCRNCRGGRTHLCRNTIGVGVNREGAFAEYLVIPA FNAFKIPDEISDDLASIFDPFGNAVHTALSFDLVGEDVLITGAGPIGIMAAAV
2	2	2	1	168 KIKKTAICGTDVHIYNWDEWSQKTIPVPMVVGHEYVGEVVAIGQEVRFGEIGDRVSGEGHITCGHCRNCRGGRTHLCRNTIGVGVNREGAFAEYLVIPA FNAFKIPDEISDDLASIFDPFGNAVHTALSFDLVGEDVLITGSGPIGIMAAAV
3	2	2	1	209 KIKKTAICGTDVHIYNWDEWSQKTIPVPMVIGHEYVGEVVAIGQEVRFGEIGDRVSGEGHITCGHCRNCRGGRTHLCRNTIGVGVNREGAFAEYLVIPA FNAFKIPDEISDDLASIFDPFGNAVHTALSFDLVGEDVLITGAGPIGIMAAAV
4	1	1	1	16 KIKKTAICGTDVHIYNWDEWSQKTIPVPMVVGHEYVGEVVAIGQEVRFGEIGDRVSGEGHITCGHCRNCRGGRTHLCRNTIGVGVNREGAFAEYLVIPA FNAFKIPDEISDDLASIFDPFGNAVHTALSFDLVGEDVLITGAGPNGIMAAAV
5	1	1	1	37 KIKKTAICGTDVHIYNWDEWSQKTIPVPMVVGHEYVGEVVAIGQEVRFGEIGDRVSGEGHITCGHCRNCRGGRTHLCRNTIGVGVNREGAFAEYLVIPA FNAFKIPDEISDDLASIFDPFGNAVHTALSFDLVGEDVLITGAGPIGIMAAAI
6	1	1	1	49 KIKKTAICGTDVHIYNWDEWSQKTIPVPMVVGHEYVGEVVAIGQEVRFGEIGDRVSGEGHITCGHCRNCRGGRTHLCRNTIGVGVNREGAFAEYLVIPA FNAFKIPDEISDDLASIFDPFGNAVHTALSFDLVGEDVLITGAGPIGIMAAAV
7	1	1	1	99 KIKKTAICGTDVHIYNWDEWSQKTIPVPMVVGHEYVGEVVAIGQEVRFGEIGDRVSGEGHITCGHCRNCRGGRTHLCRNTIGVGVNREGAFAEYLVIPA FNAFKIPDEISDDLASIFDPFGNAVHTALSFDLVGEGVLITGAGPIGIMAAAV
8	1	1	1	172 KIKKTAICGTDVHIYNWDEWSQKTIPVPMVVGHEYVGEVVAIGQEVRFGEIGDRVSGEGHITCGHCRNCRGGRTHLCRNTIGVGVNREGAFAEYLVIPA FNAFKIPDEISNDLASIFDPFGNAVHTALSFDLVGEDVLITGAGPIGIMAAAV
9	1	1	1	177 KIKKTAICGTDVHIYNWDEWSQKTIPVPMVVGHEYVGEVVAIGQEVRFGEIGDRVSGEGHITCGHCRNCRGGRTHLCRNTIGVGVNREGAFAEYLVIPA FNAFKIPDEISDDLASIFDPFGNAVHTALSFDLVGEDVLITGAGPIGVMMAAV
p_pntA1	114	509	98	3, 4, 6, 7, 8, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 18, 19, 21, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 37, 38, 39, 40, 41, 43, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 53, 54, 55, 60, 61, 63, 66, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 77, 78, 80, 82, 83, 86, 89, 91, 93, 94, 95, 96, 97, 99, 102, 104, 105, 107, 109, 112, 113, 114, 115, 117, 118, 120, 121, 122, 125, 127, 128, 130, 132, 134, 142, 150, 153, 155, 158, 160, 161, 162, 163, 167, 168, 169, 170 SDDFNKAAELYAEQAKVDIIIITLIPGRPAPKLITKEMVDSMKAGSVIVDLAAANGGNCEYTVKDQVIMTDNGVKIVGYTDMVGRLLPTQSSQLYATNL VNLLKLLCKEKGDNINIDFEDVLRGVTVIKEGEITWPAPPI
2	10	18	8	1, 2, 35, 36, 87, 103, 106, 126 SDDFNKAAELYAEQAKVDIIIITLIPGRPAPKLITKEMVDSMKAGSVIVDLAAANGGNCEYTVKDQVIMTDNGVKIVGYTDMVGRLLPTQSSQLYATNL VNLLKLLCKEKGDNINIDFEDVLRGVTVIKEGEITWPAPPI
3	4	9	1	20 SDDFNKAAELYAEQAKEVDIIIITLIPGRPAPKLITKEMVDSMKAGSVIVDLAAANGGNCEYTVKDQVIMTDNGVKIVGYTDMVGRLLPTQSSQLYATNL VNLLKLLCKEKGDNINIDFEDVLRGVTVIKEGEITWPAPPI
4	3	9	5	56, 129, 131, 152, 154 SDDFNKAAELYAEQAKVDIIIITLIPGRPAPKLITKEMVDSMKAGSVIVDLAAANGGNCEYTVKDQVIMTNGVKIVGYTDMVGRLLPTQSSQLYATNL VNLLKLLCKEKGDNINIDFEDVLRGVTVIKEGEITWPAPPI

Allel	Vorhanden in			Nukleotid-Allele und Sequenz
	pSTs	STs	Allelen	
5	2	3	1	17 SDDFNKAAELYAEQAKDVDIIITLIPGRPAPKLITKEMVDSMKAGSVIVDLAAANGGNCEYTVKDQVIMTDNGVKIVGYTDMVGRLLPTQSSQLYATNL VNLLKLLCKEKDGNINIDFEDVLRGVTVIKEGITWPAPPI
6	1	3	2	76, 135 SDDFNKAAELYAEQAKDVDIIITLIPGRPAPKLITKEMVDSMKAGSVIVDLAAANGGNCEYTVKDQVIMTDNGVKIVGYTDMVGRLLPTQSSQLYATNL VNLLKLLCKEKDGNINIDFEDVLRGVTVIKEGITWPAPPI
7	1	2	1	44 SDDFNKAAELYAEQAKDVDIIITLIPGRPAPKLITKEMVDSMKAGSVIVDLAVANGGNCEYTVKDQVIMTENGVKIVGYTDMVGRLLPTQSSQLYATNL VNLLKLLCKEKDGNINIDFEDVLRGVTVIKEGITWPAPPI
8	2	2	2	68, 123 SDDFNKAAELYAEQAKDVDIIITLIPGRPAPKLITKEMVDSMKAGSVIVDLAAANGGNCEYTVKDQVIMTDNGVKIVGYTDMVGRLLPTQSSQLYATNL VNLLKLLCKEKNGNINIDFEDVLRGVTVIKEGITWPAPPI
9	2	2	1	119 SDDFNKAAELYAEQAKDVDIIITLIPGRPAPKLITKEMVDSMKAGSVIVDLAAANGGNCEYTEKDQVIMTDNGVKIVGYTDMVGRLLPTQSSQLYATNL VNLLKLLCKEKDGNINIDFEDVLRGVTVIKEGITWPAPPI
10	1	1	1	65 SDDFNKAAELYAEQAKEVDIIITLIPGRPAPKLITKEMVDSMKAGSVIVDLAAANGGNCEYTVKDQVIMTNGVKIVGYTDMVGRLLPTQSSQLYATNL VNLLKLLCKEKDGNINIDFEDVLRGVTVIKEGITWPAPPI
11	1	1	1	90 SDDFNKAAELYAEQAKDVDIIITLIPGRPAPKLITKEMVDSMKAGSVIVDLAAANGGNCEYTVKDQVIMTDNGVKIVGYTDMVGRLLPTQSSQLYATNL VNLLKLLRKEKDGNINIDFEDVLRGVTVIKEGITWPAPPI
12	1	1	1	98 SDDFNKAAELYAEQAKDVDIIITLIPGRPAPKLITKEMVDSMKAGSVIVDLAAANGGNCEYTVKDQVIMTDNGKIVGYTDMVGRLLPTQSSQLYATNL VNLLKLLCKEKDGNINIDFEDVLRGVTVIKEGITWPAPPI
13	1	1	1	111 SDDFNKAAELYAEQAKDVDIIITLIPGRPAPKLITKEMVDSMKAGSVIVDLAAANGGNCEYTVKDQVIMTDNGVKIVGYTDMVGRLLPTQSSQLYATNL VNLLKLLCKEKDGNINIDFEDVLRGVTVIKEGAIWPAPPI
14	1	1	1	116 SDDFNKAAELYAEQAKDVDIIITLIPGRPAPKLITKEMVDSMKAGSVIVDLAAANGGNCEYTVKDQVIMTDNGVKIVGYTDMVGRLLPTQSSQLYATNL VNLLKLLCKEKDGNINIDFEDVLRGVTVIKEGITWPAPPI
15	1	1	1	137 SDDFNKAAELYAEQAKDVDIIITLIPGRPAPKLITKEMVDSMKAGSVIVDLAAANGGNCEYTVKNQVIMTDNGVKIVGYTDMVGRLLPTQSSQLYATNL VNLLKLLCKEKDGNINIDFEDVLRGVTVIKEGITWPAPPI
16	1	1	1	5 SDDFNQKAAELYAEQAKDVDIIITLIPGRPAPKLITKEMVDSMKAGSVIVDLAAANGGNCEYTVKDQVIMTNGVKIVGYTDMVGRLLPTQSSQLYATN LVNLLKLLCKEKDGNINIDFEDVLRGVTVIKEGITWPAPPI
17	1	1	1	9 FDDFNKAAELYAEQAKDVDIIITLIPGRPAPKLITKEMVDSMKAGSVIVDLAAANGGNCEYTVKDQVIMTDNGVKIVGYTDMVGRLLPTQSSQLYATNL VNLLKLLCKEKDGNINIDFEDVLRGVTVIKEGITWPAPPI
18	1	1	1	16 SDDFNKAAELYAEQAKDVDIIITLIPGRPAPKLITKEMVDSMKAGSVIVDLAAANGGNCECTVKDQVIMTDNGVKIVGYTDMVGRLLPTQSSQLYATN LVNLLKLLCKEKDGNINIDFEDVLRGVTVIKEGITWPAPPI
19	1	1	1	22

Allel	Vorhanden in			Nukleotid-Allele und Sequenz
	pSTs	STs	Allelen	
20	1	1	1	CDDFNKAAELYAEQAKDVDIIITLIPGRPAPKLITKEMVDSMKAGSVIVDLAAANGGNCEYTVKDQVIMTDNGVKIVGYTDMVGRPTQSSQLYATN LVNLLKLLCKEKDGNINIDFEDVVLRGVTVIKEGEITWPAPPI
				42
21	1	1	1	SDDFNKAAELYAEQAKDVDIIITLIPGRPAPKLITKEMVDSMKAGSVIVDLAAANGGNCAITVYTVKDQVIMTDNGVKIVGYTDMVGRPTQSSQLYATNL VNLLKLLCKEKDGNINIDFEDVVLRGVTVIKEGEITWPAPPI
				57
22	1	1	1	SDDFNKAAELYAEQAKDVDIIITLIPGRPAPKLITKEMVDSMKAGSVIVDLAAANGGNCEYTVKDQVIMTDNGVKIVGYADMVGRPTQSSQLYATN LVNLLKLLCKEKDGNINIDFEDVVLRGVTVIKEGEITWPAPPI
				58
23	1	1	1	SDDFNKAAELYAEQAKDVDIIITLIPGRPAPKLITKEMVDSMKAGSVIVDLAAANGGNCEYTVKDQVIMTDNGVKIVGYTDMVGRPTQSSQLYATNL VNLLRLLCKEKDGNINIDFEDVVLRGVTVIKEGEITWPAPPI
				75
24	1	1	1	SDDFNKAAELYAEQAKDVDIIITLIPGRPAPKLITKEMVDSMKAGSVIVDLAAANGGNCEYTVKDQVIMTDNGVKIVGYTDMVGRPTQSSQLYATNL VNLLKLLCKEKDGNINIDFEDVVLRGVTVIKEGEITWPAPPI
				81
25	1	1	1	SDDFNKAAELYAEQAKDVDIIITLIPGRPAPKLITKEMVDSMKAGSVIVDLAAANGGNCEYTVKDQVIMTDNGVKIVGYTDMVGRPTQSSQLYATNL VNLLKLLCKEKDGSINIDFEDVVLRGVTVIKEGEITWPAPPI
				84
26	1	1	1	SDDFNKAAELYAEQAKDVDIIITLIPGRPAPKLITKEMVDSMKAGSVIVDLAAANGGNCEYTVKDQVIMTDNGVKIVGYTDMVGRPTQSSQLYATNI VNLLKLLCKEKDGNINIDFEDVVLRGVTVIKEGEITWPAPPI
				85
27	1	1	1	SDDFNKAAELYAEQAKDVDIIITLIPGRPAPKLITKEMVDSMKAGSVIVDLAAANGGNCEYTVKDQVIMTDNGVKIVGYTDMVGRPTQSSQLYATN LVNLLKLLCKEKDGNINIDFEDVVLRGVTVIKEGEITWPAPPI
				88
28	1	1	1	SDDFNKAAELYAEQAKDVDIIITLIPGRPAPKLITKEMVDSMKAGSVIVDLAAANGGNCEYTVKDQVIMTDNGVKIVGYTDMVGRPTQSSQLYATNL VNLLKLLCKEKDGNINIDFEDVVLRGVTVIKEGEITWPAPPI
				92
29	2	2	1	SDDFNKAAELYAEQAKDVDIIITLIPGRPAPKLITKEMVDSMKAGSVIVDLAAANGGNCEYTVKDQVIMTDNGVKIVGYTDMVGRPTQSSQLYATN LVNLLKLLCKEKDGNINIDFEDVVLRGVTVIKEGEITWPAPPI
				100
30	1	1	1	SDDFNKAAELYAEQAKDVDIIITLIPGRPAPKLITKEMVDSMKAGSVIVDLAAANGGNCEYTVKDQVIMTDNGVKIVGYTDMVGRPTQSSQLYATNL VNLLKLLCKEKDGNINIDFEDVVLRGVTVIKEGEITWPAPSI
				101
31	1	1	1	SDDFNKAAELYAEQAKDVDIIITLIPGRPAPKLITKEMVDSMKAGSVIVDLAAANGGNCEYTVKDQVIMTDNGVKIVGYTDMVGRPTQSSQLYATNL VNLLKLLCKEKDGNININFEDVVLRGVTVIKEGEITWPAPPI
				108
32	1	1	1	SDDFNKAAELYAEQAKDVDIIITLIPGRPAPKLITKEMVDSMKAGSVIVDLAAANGGNCEHTVYTVKDQVIMTDNGVKIVGYTDMVGRPTQSSQLYATN LVNLLKLLCKEKDGNINIDFEDVVLRGVTVIKEGEITWPAPPI
				124
33	1	1	1	SDDFNKAAELYAEQAKDVDIIITLIPGRPAPKLITKEMVDSMKAGSVIVDLVAANGGNCEYTVKDQVIMTDNGVKIVGYTDMVGRPTQSSQLYATNL SDDFNKAAELYAEQAKDVDIIITLIPGRPAPKLITKEMVDSMKAGSVIVDLVAANGGNCEYTVKDQVIMTDNGVKIVGYTDMVGRPTQSSQLYATNL
				133

Allel	Vorhanden in			Nukleotid-Allele und Sequenz
	pSTs	STs	Allelen	
p_pyrC1	34	1	1	VNLLKLLCKEKGDNINIDFEDVVLRGVTVIKEGEITWPAPPI 159 SDDFNKAAELYAEQAKDVDIIITLALIPGRPAPKLITKEMVDSMKAGSVIVDLAAANGNCEYTVKDQVIMTDNGVKIVGYTDMVGRLLPTQSSQLYATNL VNLIKLLCKEKGDNINIDFEDVVLRGVTVIKEGEITWPAPPI
	35	1	1	166 SDDFNKAAELYAEQAKDVDIIITLALIPGRPAPKLITKEMVDSMKAGSVIVDLAAANSNGNCEYTVKDQVIMTDNGVKIVGYTDMVGRLLPTQSSQLYATNL VNLLKLLCKEKGDNINIDFEDVVLRGVTVIKEGEITWPAPPI
	36	0	0	136 SDDFNKAAELYAEQAKDVDIIITLALIPGRPAPKLITKEMVDSMKAGSVIVDLAAANGNCEYTVKDQVIMTDNGVKIVGYTDMVGRLLPTQSSQLYATNL VNLLKLLCKEKGDNINIDFEDVVLRGVTVIKEGEITWPAPPI
	80	388	129	4, 5, 7, 8, 10, 11, 13, 14, 16, 18, 19, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 39, 40, 41, 42, 43, 45, 47, 48, 50, 51, 53, 54, 57, 62, 63, 66, 71, 73, 77, 78, 82, 84, 88, 89, 90, 93, 96, 97, 98, 100, 101, 104, 109, 113, 114, 115, 116, 117, 119, 121, 123, 124, 125, 128, 129, 130, 132, 137, 138, 140, 141, 142, 143, 146, 150, 151, 152, 153, 156, 159, 160, 162, 163, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 176, 177, 178, 180, 181, 182, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 191, 198, 199, 201, 203, 204, 205, 216, 218, 229, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 249, 251, 252, 253, 258, 260, 261, 263 AKLYPAGATTNSDSGVTDAKNIYHVLEAMEEVMGMLLVHGGEVTHHHVDIFDREKEFLDTVLAPIVNDFFPNLKIVLEHITTADAAQFVNNASDNVAATITAH HLLFNRNHMLVGGIKPHFYCLPILKRNTTHQQALIEAATSGSKKFFLGTDSAPHAKGAKESAC
	2	17	63	22 3, 20, 21, 22, 37, 44, 55, 61, 79, 80, 83, 107, 110, 127, 192, 193, 194, 195, 206, 210, 223, 264 AKLYPAGATTNSDSGVTDAKNIYHVLEAMEEVMGMLLVHGGEVTHHHVDIFDREKEFLDTVLTPIVNDFFPNLKIVLEHITTADAAQFVNNASDNVAATITAH HLLFNRNHMLVGGIKPHFYCLPILKRNTTHQQALIEAATSGSKKFFLGTDSAPHAKGAKESAC
	3	11	48	19 38, 46, 49, 65, 69, 85, 99, 111, 120, 126, 131, 135, 136, 145, 161, 166, 175, 257, 259 AKLYPAGATTNSDSGVTDAKNIYHVLEAMEEVMGMLLVHGGEVTHHHVDIFDREKEFLDTVLAPIVNDFFPNLKIVLEHITTADAAQFVNNASDNVAATITAH HLLFNRNHMLVGGIKPHFYCLPILKRNTTHQQALIEAATCGSKKFFLGTDSAPHAKGAKESAC
	4	4	9	4 17, 35, 52, 155 AKLYPAGATTNSDSGVTDAKNIYHVLEAMEEVMGMLLVHGGEVTHHHVDIFDREKEFLDTVLAPIVNDFFPNLKIVLEHITTADAAQFVNNASDNVAATITAH HLLFNRNHMLVGGIKPHFYCLPILKRNTTHQQALIEAATSGSKKFFLGTDSAPHAKGAKESAC
	5	2	7	3 6, 36, 58 AKLYPAGATTNSDSGVTDAKNIYHVLEAMEEVMGMLLVHGGEVTHHHVDIFDREKEFLDTVLAPIVNDFFPNLKIVLEHITTADAAQFVNYASDNVAATITAH HLLFNRNHMLVGGIKPHFYCLPILKRNTTHQQALIEAATSGSKKFFLGTDSAPHAKGAKESAC
	6	4	7	5 112, 133, 157, 179, 262 AKLYPAGATTNSDSGVTDAKNIYHVLEAMEEVMGMLLVHGGEVTHHHVDIFDREKEFLDTVLAPIVNDFFPNLKIVLEHITTADAALFVNNASDNVAATITAH HLLFNRNHMLVGGIKPHFYCLPILKRNTTHQQALIEAATSGSKKFFLGTDSAPHAKGAKESAC
	7	3	5	1 9 AKLYPAGATTNSDSGVTDAKNIYHVLEAMEEVMGMLLVHGGEVTHHHVDIFDREKEFLDTVLAPIVNDFFPNLKIVLEHITTADAALFVNNASDNVAATITAH HLLFNRNHMLVGGIKPHFYCLPILKRNTTHQQALIEAATCGSKKFFLGTDSAPHAKGAKESAC
8	1	5	2 60, 74 AKLYPAGATTNSDSGVTDAKNIYHVLEAMEEVMGMLLVHGGEVTHHHVDIFDREKEFLDTVLTPIVNDFFPNLKIVLEHITTADAAQFVNNASDNVAATITAH HLLFNRNHMLVGGIKPHFYCLPILKRNTTHQQALIEAATCGSKKFFLGTDSAPHAKGAKESAC	
9	3	4	1 95 AKLYPAGATTNSDSGVTDAKNIYHVLEAMEEVMGMLLVHGGEVTHHHVDIFDREKEFLDTVLAPIVNDFFPNLKIVLEHITTADAALFVNNASDNVAATITAH HLLFNRNHMLVGGIKPHFYCLPILKRNTTHQQALIEAATSGSKKFFLGTDSAPHAKGAKESAC	
10	2	4	2 86, 122 AKLYPAGATTNSDSGVTDAKNIYHVLEAMEEVMGMLLVHGGEVTHHHVDIFDREKEFLDTVLAPIVNDFFPNLKIVLEHITTADAAQFVNNASDNVAATITAH HLLFNRNHMLVGGIKPHFYCLPILKRNTTHQQALIEAATSGSKKFFLGTDSAPHAKGAKESAC	

Allel	Vorhanden in			Nukleotid-Allele und Sequenz
	pSTs	STs	Allelen	
11	2	3	1	12 AKLYPAGATTNSDSGVTDAKNIYHVLEAMEEVMGMLLVHGEVTHHHVDIFDREKEFLDTVLAPIVNDFFPNLKIVLEHITTADAAQFVNNASDNVAATITAH HLLFNRNHMLVGGIKPHFYCLPILKRNTHTQQALIEAATSGSKKFFLGTDSAPHAKGAKESAC
12	1	3	1	91 AKLYPAGATTNSDSGVTDAKNIYHVLEAMEEVMGMLLVHGEVTHHHVDIFDREKEFLDTVLAPIVNGFPNLKIVLEHITTADAAQFVNNASDNVAATITAH HLLFNRNHMLVGGIKPHFYCLPILKRNTHTQQALIEAATSGSKKFFLGTDSAPHAKGAKESAC
13	2	3	1	92 AKLYPAGATTNSDSGVTDAKNIYHVLEAMEEVMGMLLVHGEVTHHHVDIFDREKEFLDTVLPVNDFFPNLKIVLEHITTADAAQFVNNASDNVAATITAH HLLFNRNHMLVGGIKPHFYCLPILKRNTHTQQALIEAATSGSKKYFLGTDSAPHAKGAKESAC
14	2	3	1	158 AKLYPAGATTNSDSGVTDAKNIYHVLEAMEEVMGMLLVHGEVTHHHVDIFDREKEFLDTVLAPIVNDFFPNLKIVLEHITTADAAQFVNNASDNVAATITAH HLLFNRNHMLVGGIKPHFYCLPILKRNIHQALIEAATSGSKKFFLGTDSAPHAKGAKESAC
15	2	2	1	56 AKLYPAGATTNSDSGVTDAKNIYHVLEAMEEVMGMLLVHGEVTHHHVDIFDREKEFLDTVLAPIVNDFFPNLKIVLEHITTADAAQFVNNASDNVAATITAH HLLFNRNHMLVGGIKPHFYCLPILKRNTHTQQALIDAATSGSKKFFLGTDSAPHAKGAKESAC
16	2	2	1	105 AKLYPAGATTNSDSGVTDAKNIYHVLEAMEEVMGMLLVHGEVTHHHVDIFDREKEFLGTVLTPVNDFFPNLKIVLEHITTADAAQFVNNASDNVAATITAH HLLFNRNHMLVGGIKPHFYCLPILKRNTHTQQALIEAATSGSKKFFLGTDSAPHAKGAKESAC
17	2	2	1	173 AKLYPAGATTNSDSGVTDAKNIYHVLEAMEEVMGMLLVHGEVTHHHVDIFDREKEFLDTVLAPIVNDFFPNLKIVLEHITTADAAQFVNNASDNVAATITAH HVLFNRNHMLVGGIKPHFYCLPILKRNTHTQQALIEAATSGSKKFFLGTDSAPHAKGAKESAC
18	2	2	1	190 AKLYPAGATTNSDSGVTDNAKNIYHVLEAMEEVMGMLLVHGEVTHHHVDIFDREKEFLDTVLAPIVNDFFPNLKIVLEHITTADAAQFVNNASDNVAATITAH HLLFNRNHMLVGGIKPHFYCLPILKRNTHTQQALIEAATSGSKKFFLGTDSAPHAKGAKESAC
19	1	1	1	139 AKLYPAGATTNSDSGVTDAKNIYHVFEAMEEVMGMLLVHGEVTHHHVDIFDREKEFLDTVLAPIVNDFFPNLKIVLEHITTADAAQFVNNASDNVAATITAH HLLFNRNHMLVGGIKPHFYCLPILKRNTHTQQALIEAATSGSKKFFLGTDSAPHAKGAKESAC
20	1	1	1	118 AKLYPAGATTNSDSGVTDAKNIYHVLEAMEEVMGMLLVHGEVTHHHVDIFDREKEFLDTVLAPIVNDFFPNLKIVLEHITTADAAQFVNNASDNVAATITAH HLLFNRNHMLVGGIKPHFYCLPILKRNTHTQQALIEAATSGSKKFFLGTDSAPHAKGAKESAC
21	1	1	1	165 AKLYPAGATTNSDSGVTDAKNIYHVLEAMEEVMGMLLVHGEVTHHHVDIFDREKEFLDTVLAPIVNDFFPNLKIVLEHITTADAAQFVNNASDNVAATITAH HLLFNRNHMLVGGIKPHFYCLPILKRNTHTQQALIEAATSGSKKFFLGTDSAPHAKRAGESAC
22	1	1	1	200 AKLYPAGATTNSDSGVTDNAKNIYHVLEAIEEVMGMLLVHGEVTHHHVDIFDREKEFLDTVLAPIVNDFFPNLKIVLEHITTADAAQFVNNASDNVAATITAH LLFNRNHMLVGGIKPHFYCLPILKRNTHTQQALIEAATSGSKKFFLGTDSAPHAKGAKESAC
23	1	1	1	1 AKLYPAGATTNSDSGVTDAKNIYHVLKAMEEVMGMLLVHGEVTHHHVDIFDREKEFLDTVLPVNDFFPNLKIVLEHITTADAAQFVNNASDNVAATITAH HLLFNRNHMLVGGIKPHFYCLPILKRNTHTQQALIEAATSGSKKFFLGTDSAPHAKGAKESAC
24	1	1	1	2 AKLYPAGATTNSDSGVTDAKNIYHVLEAMEDVMGMLLVHGEVTHHHVDIFDREKEFLDTVLPVNDFFPNLKIVLEHITTADAAQFVNNASDNVAATITAH HLLFNRNHMLVGGIKPHFYCLPILKRNTHTQQALIEAATSGSKKFFLGTDSAPHAKGAKESAC
25	1	1	1	15

Allel	Vorhanden in			Nukleotid-Allele und Sequenz
	pSTs	STs	Allelen	
26	1	1	1	AKLYPAGATTNSDSGVTDAKNIYHVLEAMEEVMGMLLLVHGEVTHHHVDIFDRKKEFLDTVLAPIVNDFPSLKIVLEHITTADAAQFVNNASDNVAATITAH HLLFNRNHMLVGGIKPHFYCLPILKRNTHTQQALIEAATSGSKKFFLGTDSAPHAKGAKESAC
				59
27	1	1	1	AKLYPAGATTNSDSGVTDAKNIYHVLAAMEEVMGMLLLVHGEVTHHHVDIFDREKEFLDTVLAPIVNDFPNLKIVLEHITTADAAQFVNNASDNVAATITAH HLLFNRNHMLVGGIKPHFYCLPILKRNTHTQQALIDAATSGSKKFFLGTDSAPHAKGAKESAC
				64
28	1	1	1	AKLYPAGATTNSDSGVTDAKNIYHVLEAMEEVMGMLLLVHGEVTHHHVDIFDREKEFLDTVLAPIVNDFPNLKIVLEHITTADAAQFVNNASENVAATITAH HLLFNRNHMLVGGIKPHFYCLPILKRNTHTQQALIEAATSGSKKFFLGTDSAPHAKGAKESAC
				81
29	1	1	1	AKLYPAGATTNSDSGVTDAKNIYHVLEAMEEVMGMLLLVHGEVTHHHVDIFDREKEFLDTVLAPIVNDFPNLKIVLEHITTTDAAQFVNNASDNVAATITAH HLLFNRNHMLVGGIKPHFYCLPILKRNTHTQQALIEAATSGSKKFFLGTDSAPHAKGAKESAC
				87
30	1	1	1	AKLYPAGATTNSDSGVTDAKNIYHVFEAMEEVMGMLLLVHGEVTHHHVDIFDREKEFLDTVLAPIVNDFPNLKIVLEHITTADAAQFVNNASDNVAATITAH HLLFNRNHMLVGGIKPHFYCLPILKRNTHTQQALIEAATCGSKKFFLGTDSAPHAKGAKESAC
				108
31	1	1	1	AKLYPAGATTNSDSGVTDAKNIYHVLEAMEEVMGMLLLVHGEVTHHHVDIFDREKEFLDTVLAPIVTDFFPNLKIVLEHITTADAAQFVDNASDNVAATITAH HLLFNRNHMLVGGIKPHFYCLPILKRNTHTQQALIEAATSGSKKFFLGTDSAPHAKGAKESAC
				134
32	1	1	1	AKLYPAGATTNSDSGVTDAKNIYHVLEAMEEVMGMLLLVHGEVTHHHVDIFDREKEFLDTVLAPIVNDFPNLKIVLEHITTADAVQFVNNASDNVAATITAH HLLFNRNHMLVGGIKPHFYCLPILKRNTHTQQALIEAATCGSKKFFLGTDSAPHAKGAKESAC
				147
33	1	1	1	AKLYPAGATTNSDSGVTDAMNIYHVLEAMEEVMGMLLLVHGEVTHHHVDIFDREKEFLDTVLDPVNDFPNLKIVLEHITTADAAQFVNNASDNVAATITAH HLLFNRNHMLVGGIKPHFYCLPILKRNTHTQQALIEAATSGSKKFFLGTDSAPHAKGAKESAC
				148
34	1	1	1	AKLYPAGATTNSDSGVTDAKNIYHVLEAMEEVMGMLLLVHGEVTHHHVDIFDREKEFLDTVLDPVNDFPNLKIVLEHITTADAAQFVNNASDNVAATITAH HLLFNRNHMLVGGIKPHFYCLPILKRNTHTQQALIEAATSGSKKFFLGTDSAPHAKGAKESAC
				149
35	1	1	1	AKLYPAGATTNSDSGVTDAMNIYHVLEAMEEVMGMLLLVHGEVTHHHVDIFDREKEFLDTVLAPIVNDFPNLKIVLEHITTADAAQFVNNASDNVAATITAH HLLFNRNHMLVGGIKPHFYCLPILKRNTHTQQALIEAATCGSKKFFLGTDSAPHAKGAKESAC
				154
36	1	1	1	AKLYPAGATTNSDSGVTDAMNIYHVLEAMEEVMGMLLLVHGEVTHHHVDIFDREKEFLDTVLAPIVNDFPNLKIVLEHITTADAAQFVNNASDNVAATITAH HLLFNRNHMLVGGIKPHFYCLPILKRNTHTQQALIEAATCGSKKFFLGTDSAPHAKGAKESAC
				164
37	1	1	1	AKLYPAGATTNSDSGVTDAMNIYHVLEAMEEVMGMLLLVHGEVTHHHVDIFDREKEFLDTVLAPIVNDFPNLKIVLEHITTADAAQFVNNASDNVAATITAH HLLFNRNHMLVGGIKPHFYCLPILKRNTHTQQALIEAATSGSKKFFLGTDSAPHAKGAKESAC
				174
38	1	1	1	AKLYPAGATTNSDSGVTDAMNIYHVLEAMEEVMGMLLLVHGEVTHHHVDIFDREKEFLDTVLAPIVNDFPNLKIVLEHITTADAAQFVNNASDNVAATITAH HLLFNRNHMLVGGIKPHFYCLPILKRNTHTQQALIEAATSGSKKFFLGTDSAPHAKGAKESAC
				196
39	1	1	1	AKLYPAGATTNSDSGVTDAMNIYHVLEAMEEVMGMLLLVHGEVTHHHVDIFDREKEFLDTVLAPIVNDFPNLKIVLEHITTADAAQFVNNASDNVAATITAH HLLFNRNHMLVGGIKPHFYCLPILKRNTHTQQALIEAATSGSKKFFLGTDSAPHAKGAKESAC
				197
				AKLYPAGATTNSDSGVTDAMNIYHVLEAMEEVMGMLLLVHGEVTHHHVDIFDREKEFLDTILAPIVNDFPNLKIVLEHITTADAAQFVNNASDNVAATITAH

Allel	Vorhanden in			Nukleotid-Allele und Sequenz	
	pSTs	STs	Allelen		
p_tnaA1	40	2	2	1	LLFNRNHMLVGGIKPHFYCLPILKRNTHQALIEAATSGSKKFFLGTDSAPHAKGAKESAC 202 TKLYPAGATTNSDSGVTDANKNIYHVLEAMEEVMGMLLVHGEVTHHHVDIFDREKEFLDVTLPVINDFPNLKIVLEHITTADAAQFVNNASDNVAATITAH HLLFNRNHMLVGGIKPHFYCLPILKRNTHQALIEAATSGSKKFFLGTDSAPHAKGAKESAC
	41	1	1	1	265 AKLYPAGATTNSDSGVTDANKNIYHVLEAMEEVMGMLLVHGEVTHHHVDIFDREKEFLDVTLPVINDFPNLKIVLEHITTADAAQFVNNASDNVAATITAH HLLFNRNHMLVGGIKPHFYCLPILKRNTHQALIEAATCGSKKFFLGTDSAPHAKGAKESAC
	125	521	121	121	1, 2, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 16, 17, 18, 19, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 31, 32, 33, 34, 36, 37, 38, 39, 41, 42, 44, 45, 46, 47, 48, 50, 51, 54, 55, 57, 61, 62, 64, 65, 66, 68, 69, 71, 72, 73, 76, 77, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 88, 92, 93, 94, 95, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 108, 110, 111, 112, 115, 116, 118, 121, 122, 123, 124, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 160, 166, 167, 169, 171, 172, 173, 174, 176, 177, 178, 179, 183, 185, 186 YDIPVVIDSARYCENAYFIKQREEGYADKSILEIIREMYQYGDMLTMSAKKDPMVNIGGMCCIRDHQELFQAVQTRCVPMEGFVTYGGMAGRDMEALA RGLYEGADEDLHYRISQVQYLGERLREGGIPIQYPTGGHAVF
	2	9	21	3	20, 87, 120 YDIPVVIDSARYCENAYFIKQREEGYADKSILEIIREMYQYGDMLTMSAKKDPMVNIGGMCCIRDHQELFQAVQTRCVPMEGFVTYGGMAGRDMEALA RGLYEGADEDLHYRINQVQYLGERLREGGIPIQYPTGGHAVF
	3	3	10	2	4, 5 YDIPVVIDSARYCENAYFIKQREEGYADKSILEIIREMYQYGDMLTMSAKKDPMVNIGGMCCIRDHQELFQAVQTRCVPMEGFVTYGGMAGRDMEALA RGLYEGADEDLHYRISQVQYLGERLREVGIIPIQYPTGGHAVF
	4	3	4	1	14 YDIPVVIDSARYCENAYFIKQREEGYADKSILEIIREMYQYGDMLTMSAKKDPMVNIGGMCCIRDHQELFQAVQTRCVPMEGFVTYGGMAGRDMEALA RGLYEGADEDLHYRISQVKYLGERLREGGIPIQYPTGGHAVF
	5	2	3	1	40 YDIPVVIDSARYCENAYFIKQREEGYADKSILEIIREMYQYGDMPMTMSAKKDPMVNIGGMCCIRDHQELFQAVQTRCVPMEGFVTYGGMAGRDMEALA RGLYEGADEDLHYRISQVQYLGERLREGGIPIQYPTGGHAVF
	6	3	3	2	70, 90 YDIPVVIDSARYCENAYFIKQREEGYADKSILEIIREMYQYGDMLTMSAKKDPMVNIGGMCCIRDHQELFQAVQTRCVPMEGFVTYGGMAGRDMEALG RGLYEGADEDLHYRISQVQYLGERLREGGIPIQYPTGGHAVF
	7	2	2	1	30 YDIPVVIDSARYCENAYFIKQREEGYADKSILEIIREMYQYGDMLTMSAKKDPMVNIGGMCCIRDHQELFQAVQTRCVPMEGFITYGGMAGRDMEALAR GLYEGADEDLHYRISQVQYLGERLREGGIPIQYPTGGHAVF
	8	2	2	2	63, 91 YDIPVVIDSARYCENAYFIKQREEGYADKSILEIIREMYQYGDMLTMSAKKDPMVNIGGMCCIRDHQELFQAVQTRCVPMEGFVTYGGMAGRDMEALA RGLYEGADEDLHYRISQVQYLGERLREGGIPIQYPTGGHAVF
	9	2	2	2	109, 114 YDIPVVIDSARYCENAYFIKQREEGYANKSILEIIREMYQYGDMLTMSAKKDPMVNIGGMCCIRDHQELFQAVQTRCVPMEGFVTYGGMAGRDMEALA RGLYEGADEDLHYRISQVQYLGERLREGGIPIQYPTGGHAVF
10	1	1	2	106, 170 YDIPVVIDSARYCENAYFIKQREEGYADKSILEIIREMYQYGDMLTMSAKKDPMVNIGGMCCIRDHQELFQAVQTRCVPMEGFVTYGGMAGRDMEALA RGLYEGADEDLHYRISQVQYLGERLWEGGIPIQYPTGGHAVF	
11	1	1	1	3 YDIPVVIDSARYCENAYFIKQREEGYADKSILEIIREMYQYGDMLTMSAKKDPMVNIGGMCCIRDHQELFQAVQTRCVPMEGFVTYGGMAGRDMEALA RGLYEGADEDLHYRISQVQYLGERLREGGIPIQYPTGGHAMF	



Allel	Vorhanden in			Nukleotid-Allele und Sequenz
	pSTs	STs	Allelen	
12	1	1	1	35 YDIPVVIDSARYCENAYFIKQREEGYADKSILEIIREMYQYGDMLTMSAKKDPMVNIGGMCCIRDHQELFQAVQTRCVPMEGFITYGGMAGRDMEALAR GLYEGADEDLHYRISQVQYLGERLRGGIPIQYPTGGHAVF
13	1	1	1	59 YDIPVVIDSARYCENAYFIKQREEGYADKSILEIIREMYQYGDMLTMSAKKDPMVNIGGMCCIRDHQELFRAVQTRCVPMEGFVTYGGMAGRDMEALA RGLYEGADEDLHYRISQVQYLGERLRGGIPIQYPTGGHAVF
14	1	1	1	67 YDIPVVIDSARYCENAYFIKQREEGYADKSILEIIREMYQYGDMLTMSAKKDPMVNIGGMCCIRDHQELFQAVQTRCVPMEGFVTYGGMAGRDMEALA RGLYEGADEDLHYRISQVQYLGERLRGGIPIQYPTGGHAVF
15	1	1	1	78 YDIPVVIDSARYCENAYFIKQREEGYADKSILEIMREMYQYGDMLTMSAKKDPMVNIGGMCCIRDHQELFQAVQTRCVPMEGFVTYGGMAGRDMEAL ARGLYEGADEDLHYRISQVQYLGERLRGGIPIQYPTGGHAVF
16	1	1	1	89 YDIPVVIDSARYCENAYFIKQREEGYADKSILEIIREMYQYGDMLTMSAKKDPMVNIGGMCCIRDHQELFQAVQTRCVPMEGFVTYGGMAGRDMEALA RGLYEGADEDLHYRISQVQYLGERLRGGIPIQYPTGGHAVF
17	1	1	1	96 YDIPVVIDSARYCENAYFIKQREEGYADKSILEIIREMYQYGDMLTMSAKKDPMVNIGGMCCIRDHQELFQAVQTRCVPMEGFVTYGGMAGRDMEALA RGLYEGADEDLHYRISQVRYLGERLRGGIPIQYPTGGHAVF
18	1	1	1	107 YDIPVVIDSARYCENAYFIKQREEGYADKSILEIIREMYQYGDMLTMSAKKDPIVNIGGMCCIRDHQELFQAVQTRCVPMEGFVTYGGMAGRDMEALAR GLYEGADEDLHYRISQVQYLGERLRGGIPIQYPTGGHAVF
19	1	1	1	113 YDIPVVIDSARYCENAYFIKQREEGYADKSILEIIREMYQYGDMLTMSAKKDPMVNIGGMCCIRDHQELFQAVQTRCVPMEGFVTYGGMAGRDMEALA RGLYEGADEDLHYRISQVQYLGECLREGGIPIQYPTGGHAVF
20	1	1	1	117 YDIPVVIDSARYCENAYFIKQREEGYADQSILEIIREMYQYGDMLTMSAKKDPMVNIGGMCCIRDHQELFQAVQTRCVPMEGFVTYGGMAGRDMEALA RGLYEGADEDLHYRISQVQYLGERLRGGIPIQYPTGGHAVF
21	1	1	1	125 YDIPVVIDSAR*CENAYFIKQREEGYADKSILEIIREMYQYGDMLTMSAKKDPMVNIGGMCCIRDHQELFQAVQTRCVPMEGFVTYGGMAGRDMEALAR GLYEGADEDLHYRISQVQYLGERLRGGIPIQYPTGGHAVF
22	1	1	1	168 YDIPVVIDSARYCENAYFIKQEEGYADKSILEIIREMYQYGDMLTMSAKKDPMVNIGGMCCIRDHQELFQAVQTRCVPMEGFVTYGGMAGRDMEALA RGLYEGADEDLHYRISQVQYLGERLRGGIPIQYPTGGHAVF
23	1	1	1	180 YDIPVVIDSARYCENAYFIKQREEGYADKSILEIIREMYQYGDMLTMSAKKDPMVNIGGMCCIRDHQELFQAVQTRCVPMEGFVTYGGMAGRDMEALA RGLYEGADEDLHYRITQVQYLGERLRGGIPIQYPTGGHAVF
24	1	1	1	182 YDIPVVIDSARYCENAYFIKQREEGYADKSILEIIREMYQYGDMLTMSAKKDPMVNIGGMCCIRDHQELFQSVQTRCVPMEGFVTYGGMAGRDMEALA RGLYEGADEDLHYRISQVQYLGERLRGGIPIQYPTGGHAVF
25	1	1	1	184 YDIPVVIDSARYCENAYFIKQREEGYADKSILEIIREMYQYGDMLTMSAKKDPMVNIGGMCCIRDHQELFQAVQTHCVPMEGFVTYGGMAGRDMEALA RGLYEGADEDLHYRISQVQYLGERLRGGIPIQYPTGGHAVF

**Tabelle A8:** Konzentration und Ausbeute der isolierten Nukleinsäuren, RNAs, cDNAs und cRNAs sowie Einbaurrate von Cyanin-3.

Bedingung	Replikat	DNA/RNA		RNA		cDNA		cRNA	
		Konz. [ng/µl]	Konz. [ng/µl]	Menge [µg]	$^{260}/_{280}$ <sup>1</sup>	Konz. [ng/µl]	Menge [µg]	Ausbeute [µg]	Cy-3 Einbau [pmol/µg]
4 °C	1	1744,4	799,7	51,9	2,11	1453,7	58,1	17,8	22,2
	2	1834,6	860,4	55,9	2,10	1466,6	58,7	20,3	26,1
	3	1499,2	668,4	43,4	2,13	1436,5	57,5	15,7	21,4
15 °C	1	1474,0	664,1	43,2	2,08	1494,3	59,8	24,5	27,8
	2	1239,5	592,3	38,5	2,06	1455,2	58,2	15,2	21,7
	3	1442,2	612,9	39,8	2,12	1442,1	57,7	10,3	19,0
20 °C	1	2233,6	1049,0	68,2	2,14	1474,7	59,0	24,7	28,4
	2	1437,2	620,7	40,3	2,13	1526,7	61,1	15,3	21,8
	3	1794,4	822,5	53,5	2,12	1449,6	58,0	17,9	24,4
37 °C	1	1432,1	805,6	52,4	2,10	1542,9	61,7	23,3	27,1
	2	1684,1	755,3	49,1	2,11	1458,9	58,4	17,6	23,6
	3	1524,6	709,5	46,1	2,09	1536,8	61,5	15,5	21,9
	4	1047,0	458,8	29,8	2,11	1456,0	58,2	17,8	22,7
42 °C	1	3034,6	1453,9	94,5	2,13	1360,8	54,4	18,0	23,3
	2	2959,3	1318,7	85,7	2,11	1466,4	58,7	14,6	20,2
	3	3070,9	1441,4	93,7	2,14	1438,1	57,5	19,7	23,8

<sup>1</sup> Verhältnis aus der Absorption bei 260 nm zu der bei 280 nm

Cy-3, Cyanin-3; Konz., Konzentration; DNA, Desoxyribonukleinsäure; RNA, Ribonukleinsäure; cDNA, komplementäre DNA; cRNA, komplementäre RNA

**Tabelle A9:** DAVID-Kategorien

Angegeben ist die Bedingung, der Name der Kategorie, die Art der Kategorie, die Anzahl und der Anteil der differentiell regulierten Gene der jeweiligen DAVID-Kategorie, das Ergebnis des Fisher Tests (für  $p < 0,05$ ) sowie welche Gene differentiell exprimiert waren.

Bedingung und Name der Kategorie	Art der Kategorie <sup>1</sup>	Anzahl	Anteil [%]	p-Wert	Differentiell exprimierte Gene
<b>4 °C</b>					
GO:0006355~regulation of transcription, DNA-dependent	GOTERM_BP_FAT	22	12,4	8,45E-04	VP1765, VPA1124, VPA1114, VP0713, VP0354, VP0059, VP1536, VP0034, VPA1219, VP0377, VP0486, VP0581, VP3020, VP0489, VPA1727, VP0529, VP1889, VP2603, VP2553, VP1032, VP0975, VP2251
GO:0051252~regulation of RNA metabolic process	GOTERM_BP_FAT	22	12,4	9,15E-04	VP1765, VPA1124, VPA1114, VP0713, VP0354, VP0059, VP1536, VP0034, VPA1219, VP0377, VP0486, VP0581, VP3020, VP0489, VPA1727, VP0529, VP1889, VP2603, VP2553, VP1032, VP0975, VP2251
GO:0045449~regulation of transcription	GOTERM_BP_FAT	22	12,4	0,00116	VP1765, VPA1124, VPA1114, VP0713, VP0354, VP0059, VP1536, VP0034, VPA1219, VP0377, VP0486, VP0581, VP3020, VP0489, VPA1727, VP0529, VP1889, VP2603, VP2553, VP1032, VP0975, VP2251
GO:0003677~DNA binding	GOTERM_MF_FAT	25	14,0	0,00237	VPA1124, VP1156, VPA0793, VP0581, VP0518, VP0489, VP1889, VP2603, VP2553, VP2251, VP1765, VPA1114, VP0920, VP1536, VP0059, VP0713, VP0034, VPA1219, VP0377, VP3020, VPA1727, VP0529, VP1946, VP0975, VP1032
DNA-binding	SP_PIR_KEYWORDS	20	11,2	0,00659	VP1765, VPA1124, VP1156, VPA1114, VP0920, VP0059, VP1536, VPA1219, VP0034, VP0377, VP0581, VP3020, VP0489, VPA1727, VP0529, VP2603, VP1946, VP2553, VP1032, VP2251
GO:0003700~transcription factor activity	GOTERM_MF_FAT	16	9,0	0,0116	VP1765, VPA1124, VPA1114, VP0059, VP1536, VPA1219, VP0034, VP0377, VP0581, VP3020, VPA1727, VP2603, VP0529, VP2553, VP0975, VP2251
GO:0030528~transcription regulator activity	GOTERM_MF_FAT	19	10,7	0,01377	VP1765, VPA1124, VPA1114, VP0713, VP0059, VP1536, VPA1219, VP0034, VP0377, VP0581, VP0489, VP3020, VPA1727, VP0529, VP2603, VP2553, VP0975, VP1032, VP2251
GO:0006350~transcription	GOTERM_BP_FAT	15	8,4	0,01791	VP1765, VPA1114, VP0059, VP1536, VPA1219, VP0034, VP0377, VP0581, VP3020, VP0489, VPA1727, VP2603, VP0529, VP2553, VP2251
IPR011991:Winged helix repressor DNA-binding	INTERPRO	11	6,2	0,02556	VP0581, VP3020, VP2603, VP0529, VP2553, VP0059, VP0713, VP0034, VPA1219, VPA0214, VP1032
transmembrane region	UP_SEQ_FEATURE	5	2,8	0,04216	VP0003, VPA1166, VP0410, VP2081, VP0936
vpa02010:ABC transporters	KEGG_PATHWAY	9	5,1	0,04279	VP1726, VP1717, VPA1438, VP1249, VP0852, VPA1056, VP1168, VPA0604, VP1169
<b>15 °C</b>					
GO:0006817~phosphate transport	GOTERM_BP_FAT	7	1,2	6,52E-05	VP0526, VP0576, VP0575, VPA1459, VP0569, VP0418, VPA1460
GO:0006820~anion transport	GOTERM_BP_FAT	11	1,8	9,24E-05	VPA0031, VP0526, VPA0051, VP0576, VPA1166, VP0575, VPA1459, VP0569, VPA1056, VP0418, VPA1460
GO:0015698~inorganic anion transport	GOTERM_BP_FAT	9	1,5	2,14E-04	VP0526, VP0576, VPA1166, VP0575, VPA1459, VP0569, VPA1056, VP0418, VPA1460
GO:0015114~phosphate transmembrane transporter activity	GOTERM_MF_FAT	6	1,0	3,87E-04	VP0526, VP0576, VP0575, VPA1459, VP0418, VPA1460
GO:0015103~inorganic anion transmembrane transporter activity	GOTERM_MF_FAT	7	1,2	0,0013	VP0526, VP0576, VP0575, VPA1459, VPA1056, VP0418, VPA1460

Bedingung und Name der Kategorie	Art der Kategorie <sup>1</sup>	Anzahl	Anteil [%]	p-Wert	Differentiell exprimierte Gene
vpa00620:Pyruvate metabolism	KEGG_PATHWAY	15	2,5	0,00175	VP2039, VPA0611, VP1776, VP2121, VPA0795, VP0356, VP2302, VPA0774, VP1258, VP0994, VPA0372, VP2767, VP2880, VP0325, VP1777
IPR015590:Aldehyde dehydrogenase	INTERPRO	7	1,2	0,00231	VPA0621, VP1776, VP2121, VP1329, VPA1113, VP1772, VP1777
GO:0005315~inorganic phosphate transmembrane transporter activity	GOTERM_MF_FAT	5	0,8	0,00238	VP0576, VP0575, VPA1459, VP0418, VPA1460
vpa02020:Two-component system	KEGG_PATHWAY	23	3,9	0,00305	VPA1277, VP2013, VP2011, VP2843, VP2842, VP2841, VP2840, VPA1731, VP0569, VP0912, VP0910, VP1258, VP0911, VPA1461, VP1376, VP0571, VP0489, VPA0543, VPA1195, VPA0964, VP1032, VP2261, VPA0604
GO:0008509~anion transmembrane transporter activity	GOTERM_MF_FAT	8	1,3	0,00433	VP0526, VP0576, VPA1166, VP0575, VPA1459, VPA1056, VP0418, VPA1460
vpa00641:3-Chloroacrylic acid degradation	KEGG_PATHWAY	5	0,8	0,00525	VP1776, VP2121, VPA0566, VPA0071, VP1777
IPR001539:Peptidase U32	INTERPRO	4	0,7	0,00618	VP2448, VP2447, VPA1670, VP0567
vpa00650:Butanoate metabolism	KEGG_PATHWAY	12	2,0	0,01172	VPA0623, VP1776, VP2843, VP2121, VP2842, VP2841, VP1771, VP2840, VP1772, VP3058, VP1777, VP0994
vpa00010:Glycolysis / Gluconeogenesis	KEGG_PATHWAY	11	1,8	0,01341	VP2599, VP2039, VPA0180, VP1776, VP2121, VP2046, VPA0566, VP0356, VPA0071, VP1777, VP2157
IPR016162:Aldehyde dehydrogenase, N-terminal	INTERPRO	6	1,0	0,01352	VPA0621, VP2121, VP1329, VPA1113, VP1772, VP1777
GO:0016021~integral to membrane	GOTERM_CC_FAT	69	11,6	0,01516	VPA1277, VPA0539, VPA1306, VPA1704, VPA1459, VPA1557, VPA1651, VP1216, VP2509, VPA0842, VPA0051, VP2337, VPA0630, VPA1715, VP2864, VPA0878, VP1675, VP1006, VP1628, VP0300, VP1764, VP0618, VP0175, VP2046, VP1431, VPA0629, VP1432, VPA1460, VP0003, VP2943, VP0858, VPA1184, VP0575, VP2081, VP1909, VP0574, VPA1424, VPA1236, VPA1438, VP0060, VP1745, VP2843, VP2842, VP2159, VP0912, VPA0031, VP1609, VP0824, VP2350, VP1754, VP1105, VP0963, VPA1444, VP0410, VPA0297, VP0117, VPA1443, VPA1016, VPA0298, VPA0548, VPA0543, VPA0749, VPA1546, VPA1166, VPA0185, VPA0540, VP3048, VP1486, VPA0024
vpa00640:Propanoate metabolism	KEGG_PATHWAY	10	1,7	0,0184	VPA0623, VPA0611, VPA0621, VP1776, VP1771, VPA0795, VP2880, VP2302, VP1777, VP0994
GO:0031224~intrinsic to membrane	GOTERM_CC_FAT	69	11,6	0,01978	VPA1277, VPA0539, VPA1306, VPA1704, VPA1459, VPA1557, VPA1651, VP1216, VP2509, VPA0842, VPA0051, VP2337, VPA0630, VPA1715, VP2864, VPA0878, VP1675, VP1006, VP1628, VP0300, VP1764, VP0618, VP0175, VP2046, VP1431, VPA0629, VP1432, VPA1460, VP0003, VP2943, VP0858, VPA1184, VP0575, VP2081, VP1909, VP0574, VPA1424, VPA1236, VPA1438, VP0060, VP1745, VP2843, VP2842, VP2159, VP0912, VPA0031, VP1609, VP0824, VP2350, VP1754, VP1105, VP0963, VPA1444, VP0410, VPA0297, VP0117, VPA1443, VPA1016, VPA0298, VPA0548, VPA0543, VPA0749, VPA1546, VPA1166, VPA0185, VPA0540, VP3048, VP1486, VPA0024
IPR011991:Winged helix repressor DNA-binding	INTERPRO	27	4,5	0,02206	VP0624, VPA1575, VPA0599, VP2793, VP0692, VPA0365, VP2553, VPA1195, VPA0964, VPA0678, VP1104, VP0947, VP1676, VPA0331, VP2762, VPA1446, VPA1623, VP0569, VP0059, VP0713, VPA1219, VP2945, VP3020, VPA0682,

Bedingung und Name der Kategorie	Art der Kategorie <sup>1</sup>	Anzahl	Anteil [%]	p-Wert	Differentiell exprimierte Gene
					VP0529, VPA0214, VP1032
vpa00030:Pentose phosphate pathway	KEGG_PATHWAY	8	1,3	0,02322	VP2599, VP0063, VPA1083, VP2436, VP2605, VPA1181, VPA1180, VP0065
vpa00190:Oxidative phosphorylation	KEGG_PATHWAY	11	1,8	0,0264	VPA0539, VP2843, VPA0543, VP3069, VP2842, VP2841, VPA0630, VP2840, VPA0629, VP3071, VP3070
GO:0003677~DNA binding	GOTERM_MF_FAT	61	10,2	0,02847	VP1133, VP0080, VP1865, VP2793, VP0692, VPA0420, VP0489, VPA0365, VP2553, VPA0531, VPA0678, VP0947, VP1676, VPA1246, VPA0331, VP1765, VP2100, VPA1289, VPA1623, VP1993, VP0569, VP0920, VP0713, VP0377, VP2149, VP2945, VP3020, VP0529, VP1946, VP1156, VP0107, VPA0793, VPA1575, VP0624, VPA0599, VPA1732, VP0518, VPA0552, VP1889, VPA1195, VP3009, VPA0200, VP1391, VPA0964, VP1104, VP1105, VPA1448, VPA1446, VP0252, VPA1319, VPA1646, VP0059, VP1536, VPA1741, VPA1219, VPA0183, VPA0682, VP1778, VP1032, VP0595, VP1071
IPR017940:ABC transporter integral membrane type 1	INTERPRO	5	0,8	0,0334	VPA1444, VP1609, VPA1715, VP1431, VP1432
IPR000620:Protein of unknown function DUF6, transmembrane	INTERPRO	6	1,0	0,03392	VPA0613, VP1764, VPA0569, VPA0757, VPA1215, VPA0119
IPR003660:HAMP linker domain	INTERPRO	11	1,8	0,03603	VPA1277, VPA0842, VP0117, VPA1651, VP1486, VP2159, VP1754, VPA0878, VPA0024, VP1628, VP0963
IPR011862:Phosphate binding protein	INTERPRO	3	0,5	0,03935	VP0571, VPA0604, VPA1461
IPR004681:TRAP dicarboxylate transporter, DctM subunit	INTERPRO	3	0,5	0,03935	VPA1704, VP1909, VP0912
IPR011642:Nucleoside recognition	INTERPRO	4	0,7	0,04101	VP0858, VPA1613, VPA1612, VP2437
vpa00053:Ascorbate and aldarate metabolism	KEGG_PATHWAY	4	0,7	0,04135	VP1776, VPA0231, VPA0230, VP1777
GO:0043565~sequence-specific DNA binding	GOTERM_MF_FAT	14	2,3	0,04191	VP1765, VPA1446, VPA1623, VP1993, VP0377, VP3009, VP1778, VPA1195, VPA0531, VPA0964, VPA0200, VP1104, VP0947, VPA1246
GO:0006508~proteolysis	GOTERM_BP_FAT	17	2,9	0,04644	VP2206, VPA0861, VPA1650, VPA1611, VP2032, VP0567, VPA0755, VP2468, VP2448, VP2608, VPA1071, VP2945, VPA0714, VP2447, VPA1193, VPA1670, VP0432
GO:0005996~monosaccharide metabolic process	GOTERM_BP_FAT	14	2,3	0,04647	VP2599, VP2039, VP0356, VPA1180, VP2157, VP0994, VP1880, VPA1083, VPA0372, VPA1676, VPA1087, VPA1618, VP0325, VP1494
<b>20 °C</b>					
IPR001539:Peptidase U32	INTERPRO	3	15,8	9,00E-05	VP2448, VP2447, VPA1670
Protease	SP_PIR_KEYWORDS	4	21,1	4,94E-04	VP2448, VP2447, VPA1193, VPA1670
GO:0008233~peptidase activity	GOTERM_MF_FAT	4	21,1	0,01072	VP2448, VP2447, VPA1193, VPA1670
GO:0006508~proteolysis	GOTERM_BP_FAT	4	21,1	0,01301	VP2448, VP2447, VPA1193, VPA1670
<b>42 °C</b>					
GO:0009081~branched chain family amino acid metabolic process	GOTERM_BP_FAT	9	1,6	4,29E-05	VPA1118, VPA0621, VP0343, VP0346, VP3058, VP3062, VP3061, VP3060, VPA0625
vpa00040:Pentose and glucuronate	KEGG_PATHWAY	9	1,6	6,11E-05	VP0236, VPA1708, VPA1707, VPA1674, VPA1706, VPA1705, VPA1676, VPA1700,

Bedingung und Name der Kategorie	Art der Kategorie <sup>1</sup>	Anzahl	Anteil [%]	p-Wert	Differentiell exprimierte Gene
interconversions					VPA0083
vpa00280:Valine, leucine and isoleucine degradation	KEGG_PATHWAY	12	2,1	1,18E-04	VPA0623, VPA1204, VPA0624, VPA1118, VPA0621, VPA0620, VPA0618, VPA0616, VPA0617, VP3060, VPA0625, VPA0615
IPR010810:Flagellin hook, IN motif	INTERPRO	6	1,1	0,00112	VP0790, VP0791, VPA1550, VP2259, VP2258, VP2261
GO:0009420~flagellin-based flagellum filament	GOTERM_CC_FAT	5	0,9	0,00259	VP0790, VP0791, VP2259, VP2258, VP2261
IPR001492:Flagellin, N-terminal	INTERPRO	5	0,9	0,00582	VP0790, VP0791, VP2259, VP2258, VP2261
IPR001029:Flagellin, C-terminal	INTERPRO	5	0,9	0,00582	VP0790, VP0791, VP2259, VP2258, VP2261
IPR014014:RNA helicase, DEAD-box type, Q motif	INTERPRO	6	1,1	0,00674	VPA0583, VPA1699, VPA0608, VP0903, VP0288, VPA0390
IPR000629:RNA helicase, ATP-dependent, DEAD-box, conserved site	INTERPRO	6	1,1	0,0104	VPA0583, VPA1699, VPA0608, VP0903, VP0288, VPA0390
GO:0043064~flagellum organization	GOTERM_BP_FAT	8	1,4	0,0116	VP0790, VP0791, VPA1550, VPA0273, VP2259, VP2258, VP2261, VPA0268
bacterial flagellum	SP_PIR_KEYWORDS	6	1,1	0,01297	VP0790, VP0791, VPA1550, VP2259, VP2258, VP2261
GO:0009082~branched chain family amino acid biosynthetic process	GOTERM_BP_FAT	5	0,9	0,0148	VP0343, VP0346, VP3058, VP3062, VP3061
GO:0006573~valine metabolic process	GOTERM_BP_FAT	4	0,7	0,01785	VPA1118, VPA0621, VP3061, VPA0625
Secreted	SP_PIR_KEYWORDS	6	1,1	0,01825	VP0790, VP0791, VPA1550, VP2259, VP2258, VP2261
vpa00380:Tryptophan metabolism	KEGG_PATHWAY	7	1,2	0,01904	VPA0623, VPA1204, VPA0624, VPA0768, VPA0620, VPA0453, VPA0616
GO:0030030~cell projection organization	GOTERM_BP_FAT	8	1,4	0,02178	VP0790, VP0791, VPA1550, VPA0273, VP2259, VP2258, VP2261, VPA0268
GO:0005576~extracellular region	GOTERM_CC_FAT	8	1,4	0,02353	VP0790, VP0791, VPA1550, VP2259, VP2258, VP2338, VPA0755, VP2261
GO:0045449~regulation of transcription	GOTERM_BP_FAT	49	8,6	0,02435	VP0749, VPA1713, VP2406, VPA1516, VPA0053, VP1316, VPA1701, VPA1690, VP2172, VPA1136, VPA1289, VP2516, VPA1286, VPA1130, VPA1049, VP2945, VP0475, VPA0717, VP1469, VPA0619, VP2183, VPA0400, VP1649, VPA1432, VPA1575, VP0367, VP2427, VP2670, VPA1678, VPA0552, VPA0692, VP1889, VPA0203, VPA1220, VPA0293, VPA0290, VP2478, VPA1741, VPA1219, VPA0740, VPA0741, VP0055, VP0092, VPA1162, VPA0682, VPA1687, VPA0830, VP1382, VPA0495
coiled coil	SP_PIR_KEYWORDS	6	1,1	0,02478	VP0790, VP0791, VPA1550, VP2259, VP2258, VP2261
GO:0006355~regulation of transcription, DNA-dependent	GOTERM_BP_FAT	48	8,4	0,02511	VPA0400, VP1649, VPA1432, VP0749, VPA1713, VPA1575, VP2427, VP0367, VP2670, VP2406, VPA1516, VPA1678, VPA0053, VPA0552, VP1316, VPA0692, VP1889, VPA1701, VPA1690, VP2172, VPA1220, VPA1136, VPA0293, VPA0290, VPA1289, VP2478, VP2516, VPA1741, VPA1219, VPA0740, VPA1286, VPA0741, VP0055, VP0092, VPA1130, VPA1162, VPA1049, VP2945, VP0475, VPA0682, VPA1687, VPA0717, VPA0830, VP1469, VP1382, VPA0619, VPA0495, VP2183
GO:0051252~regulation of RNA metabolic process	GOTERM_BP_FAT	48	8,4	0,0277	VPA0400, VP1649, VPA1432, VP0749, VPA1713, VPA1575, VP2427, VP0367, VP2670, VP2406, VPA1516, VPA1678, VPA0053, VPA0552, VP1316, VPA0692, VP1889, VPA1701, VPA1690, VP2172, VPA1220, VPA1136, VPA0293, VPA0290, VPA1289, VP2478, VP2516, VPA1741, VPA1219, VPA0740, VPA1286, VPA0741, VP0055, VP0092, VPA1130, VPA1162, VPA1049, VP2945, VP0475, VPA0682,

Bedingung und Name der Kategorie	Art der Kategorie <sup>1</sup>	Anzahl	Anteil [%]	p-Wert	Differentiell exprimierte Gene
GO:0044461~flagellin-based flagellum part	GOTERM_CC_FAT	8	1,4	0,02797	VPA1687, VPA0717, VPA0830, VP1469, VP1382, VPA0619, VPA0495, VP2183 VP0790, VPA1541, VP0791, VPA0273, VP2259, VP2258, VP2261, VPA0268
GO:0044463~cell projection part	GOTERM_CC_FAT	8	1,4	0,02797	VP0790, VPA1541, VP0791, VPA0273, VP2259, VP2258, VP2261, VPA0268
GO:0044460~flagellum part	GOTERM_CC_FAT	8	1,4	0,02797	VP0790, VPA1541, VP0791, VPA0273, VP2259, VP2258, VP2261, VPA0268
GO:0050801~ion homeostasis	GOTERM_BP_FAT	5	0,9	0,02949	VPA0563, VP2115, VP0632, VP0579, VPA0454
GO:0048878~chemical homeostasis	GOTERM_BP_FAT	5	0,9	0,02949	VPA0563, VP2115, VP0632, VP0579, VPA0454
GO:0055080~cation homeostasis	GOTERM_BP_FAT	5	0,9	0,02949	VPA0563, VP2115, VP0632, VP0579, VPA0454
GO:0009401~phosphoenolpyruvate-dependent sugar phosphotransferase system	GOTERM_BP_FAT	8	1,4	0,03128	VP2635, VP2637, VPA0297, VP0795, VPA0500, VPA0298, VPA0501, VPA1424
vpa00290:Valine, leucine and isoleucine biosynthesis	KEGG_PATHWAY	6	1,1	0,0369	VP0343, VP0346, VP3058, VP3062, VP3061, VP3060
PIRSF004672:bicyclomycin resistance protein	PIR_SUPERFAMILY	3	0,5	0,03749	VPA0520, VPA1574, VP1216
GO:0005996~monosaccharide metabolic process	GOTERM_BP_FAT	13	2,3	0,03755	VPA1118, VP2039, VPA1706, VP1880, VPA0625, VPA1230, VPA1674, VPA1676, VPA1700, VP2399, VP2398, VP2400, VP2829
vpa02060:Phosphotransferase system (PTS)	KEGG_PATHWAY	7	1,2	0,04181	VP2635, VP2637, VP0795, VPA0500, VPA0298, VPA0501, VPA1424
IPR018076:Type II secretion system F domain	INTERPRO	4	0,7	0,04421	VP2411, VP2410, VPA0725, VPA0726
GO:0006928~cell motion	GOTERM_BP_FAT	9	1,6	0,0447	VP0790, VPA1541, VP0791, VPA1550, VPA0273, VP2259, VP2258, VP2261, VPA0268
GO:0016021~integral to membrane	GOTERM_CC_FAT	54	9,5	0,04815	VP0241, VP1632, VPA1704, VP0851, VP1216, VP2509, VPA0422, VP1981, VP2176, VPA0051, VP2411, VP2410, VP1161, VP1622, VPA1190, VP1995, VP2490, VP1996, VP0924, VPA1130, VP0478, VP1232, VPA1186, VPA0478, VP0574, VPA1424, VPA0149, VP2481, VP2115, VP3017, VP1300, VP1997, VPA1574, VPA1539, VP2159, VPA0559, VPA1630, VP0632, VPA0199, VPA1220, VPA1449, VP1455, VPA0316, VP1311, VPA0297, VP2478, VPA0298, VP2313, VPA0749, VP2063, VP3048, VPA0501, VP0248, VP2827
IPR011545:DNA/RNA helicase, DEAD/DEAH box type, N-terminal	INTERPRO	6	1,1	0,0484	VPA0583, VPA1699, VPA0608, VP0903, VP0288, VPA0390
GO:0015343~siderophore-iron transmembrane transporter activity	GOTERM_MF_FAT	4	0,7	0,04973	VPA1659, VPA1657, VPA0664, VPA1656
GO:0042927~siderophore transporter activity	GOTERM_MF_FAT	4	0,7	0,04973	VPA1659, VPA1657, VPA0664, VPA1656

<sup>1</sup> GOTERM\_BP\_FAT, GOTERM\_MF\_FAT und GOTERM\_CC\_FAT Gene Ontology; PIR\_SUPERFAMILY und INTERPRO, Proteindomänen; KEGG\_PATHWAY, Pathway; SP\_PIR\_KEYWORDS und UP\_SEQ\_FEATURE Funktionale Kategorie