

**Genotypische und phänotypische  
Charakterisierung von  
Hämolysin-bildenden  
*Vibrio parahaemolyticus* Stämmen**

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

Silke Bechlars  
aus Berlin

März 2015

Diese Dissertation wurde zwischen Januar 2011 und Februar 2015 am Bundesinstitut für Risikobewertung in der Abteilung 4 „Biologische Sicherheit“, Fachgruppe 45 „Diagnostik und Erregercharakterisierung“ unter der Leitung von Herrn PD Dr. Lothar Beutin und Herrn Dr. Eckhard Strauch angefertigt.

Diese Arbeit wurde vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (VibrioNet, BMBF Nos 01KI1015A) gefördert.

**Erstgutachter/in:** PD Dr. Lothar Beutin

**Zweitgutachter/in:** Prof. Dr. Rupert Mutzel

Tag der Disputation: 28.05.2015

## Danksagung

Mein großer Dank gilt Dr. Eckhard Strauch. Er hat mir dieses spannende Thema überlassen und mir die Möglichkeit gegeben, meine Dissertation in seiner Arbeitsgruppe anzufertigen. Ganz besonders möchte ich mich für seine sehr engagierte Betreuung, für das stets offene Ohr bei allen Fragen und Problemen sowie für seine uneingeschränkte Unterstützung bedanken.

Großen Dank schulde ich ebenso Dr. Ralf Dieckmann für seine ständige Hilfsbereitschaft, die vielen lehrreichen Ratschläge bei der Planung und Auswertung von Experimenten und für die nette Gesellschaft in der Kantine.

PD Dr. Lothar Beutin danke ich für die Übernahme des Erstgutachtens und für wertvolle methodische Ratschläge. Prof. Dr. Rupert Mutzel danke ich herzlichst, dass er sich als Zweitgutachter zur Verfügung gestellt hat.

Ich danke PD Dr. Karsten Nöckler, Dr. Stefan Hertwig und allen anderen Mitarbeitern der Fachgruppe „Diagnostik und Erregercharakterisierung“ für ihre Hilfe und Unterstützung und die gute Arbeitsatmosphäre.

Des Weiteren gilt mein Dank Dr. Stefan Kubick und Doreen Wüstenhagen vom Fraunhofer Institut für Biomedizinische Technik in Potsdam-Golm. Ohne sie wäre ein Gelingen der Arbeiten zur zellfreien Proteinsynthese nicht möglich gewesen.

Für die vielen hilfreichen Ratschläge, die technische Unterstützung im Labor, die nie ermüdende Geduld, die eine oder andere Kuchenschlacht und vor allem für die tolle Arbeitsatmosphäre möchte ich mich ganz besonders bei Andrea Barac, Susanne Diescher, Dorothea Knabner, Antje Konietzny und Hedwig Mihajlovic bedanken.

Ein ganz großes Dankeschön gilt meinen Bürokolleginnen/Leidensgenossinnen Nadja Bier und Claudia Jäckel und meiner Espresso-Partnerin Susanne Diescher für lustige Gespräche sowie „Ideen, Rat & Lebenshilfe“ im und abseits des Labors.

Des Weiteren danke ich den netten Gourmets vom 11:45 Uhr Kantinen-Treff für die gemeinsam durchlebten und unvergesslichen kulinarischen Abenteuer.

Mein letzter und größter Dank gilt meiner Familie für ihr Verständnis und ihre bedingungslose Unterstützung.



# Inhaltsverzeichnis

Danksagung .....	i
Inhaltsverzeichnis .....	iii
Abbildungsverzeichnis .....	vii
Tabellenverzeichnis .....	ix
Abkürzungsverzeichnis .....	xi
<b>1 Einleitung und Zielsetzung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Vibrionen .....	1
1.2 <i>Vibrio parahaemolyticus</i> .....	3
1.3 Zellfreie Proteinsynthese .....	11
1.4 Zielsetzung .....	14
<b>2 Material und Methoden .....</b>	<b>15</b>
2.1 Bakterienstämme .....	15
2.2 Material .....	21
2.2.1 Geräte und Verbrauchsmaterial .....	21
2.2.2 Chemikalien, Enzyme und Kits .....	24
2.2.3 Lösungen und Puffer .....	27
2.2.4 Nährmedien und –böden .....	28
2.2.5 Programme .....	31
2.3 Methoden .....	32
2.3.1 Anzucht von Bakterienzellen .....	32
2.3.1.1 Zellanzucht in Einzelkolonien .....	32
2.3.1.2 Zellanzucht in Flüssigkultur .....	32
2.3.1.3 Herstellung von Glycerin-Stocks .....	32
2.3.2 Techniken für das Arbeiten mit DNA .....	33
2.3.2.1 Extraktion chromosomaler DNA aus Bakterienzellen .....	33
2.3.2.2 Elektrophoretische Auftrennung von DNA im Agarosegel .....	33
2.3.2.3 Aufreinigung von PCR-Produkten .....	33

2.3.2.4	DNA-Sequenzierung .....	34
2.3.2.5	Bestimmung der DNA-Konzentration.....	34
2.3.2.6	Methodik der inversen PCR.....	34
2.3.3	Techniken für das Arbeiten mit RNA .....	36
2.3.3.1	Extraktion der RNA aus Bakterienzellen.....	36
2.3.3.2	DNase-Verdau der RNA.....	36
2.3.3.3	Aufreinigung der RNA .....	36
2.3.3.4	Bestimmung der RNA-Konzentration.....	36
2.3.3.5	Synthese der cDNA.....	37
2.3.4	Polymerasekettenreaktion (PCR) .....	37
2.3.4.1	PCR zum Spezies- und Toxinnachweis.....	37
2.3.4.2	Inverse PCR.....	38
2.3.4.3	Amplifikation und Sequenzierung des <i>trh</i> -Gens.....	39
2.3.4.4	Multilokus-Sequenz-Typisierung (MLST).....	40
2.3.4.5	Virulotyping .....	40
2.3.4.6	Real-Time PCR.....	44
2.3.4.7	Quantitative Reverse Transkriptions-PCR (qRT-PCR) .....	45
2.3.5	Techniken für das Arbeiten mit Proteinen.....	46
2.3.5.1	Agglutinationstest mit Kulturüberständen .....	46
2.3.6	Phänotypische Methoden.....	47
2.3.6.1	Qualitativer Hämolyseachweis .....	47
2.3.6.2	Quantitativer Hämolyseachweis .....	49
2.3.6.3	Serumresistenz .....	50
2.3.6.4	Biofilmbildung.....	51
2.3.6.5	Protease.....	52
2.3.6.6	Urease .....	52
2.3.6.7	Chitinase .....	52
2.3.6.8	Schwärmen .....	53
2.3.7	Zellfreie Proteinsynthese.....	53
2.3.7.1	Expressions-PCR.....	53

2.3.7.2	Proteinsynthese im <i>E. coli</i> basierten gekoppelten <i>in vitro</i> Transkriptions- und Translationssystem .....	58
2.3.7.3	Proteinsynthese im entkoppelten <i>in vitro</i> Transkriptions- und Translationssystem (eukaryotisch) .....	58
2.3.7.4	Analytik der zellfrei synthetisierten Proteine .....	59
2.3.7.5	Immunologischer Nachweis von zellfrei synthetisiertem TDH und TRH....	60
2.3.7.6	Nachweis der hämolytischen Aktivität der zellfrei synthetisierten Proteine.....	61
2.3.8	<i>In silico</i> -Analyse der TRH-Varianten und TDH2.....	62
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>63</b>
3.1	Etablierung von Methoden.....	63
3.1.1	Genotypische Methoden .....	63
3.1.1.1	Standard-PCR.....	63
3.1.1.2	Real-Time PCR.....	68
3.1.2	Inverse PCR – Konstruktion von Primern zur Amplifikation des gesamten <i>trh</i> -Gens.....	69
3.1.3	Agglutinationstest mit Kulturüberständen .....	69
3.1.4	Phänotypische Methoden.....	72
3.2	Entwicklung des zellfreien Systems zur Untersuchung von Hämolysinen.....	73
3.2.1	Vergleich: <i>E. coli</i> – und Insektenzelllysat.....	73
3.2.1.1	Zellfreie Proteinsynthese im eukaryotischen System.....	73
3.2.1.2	Evaluation der Funktionalität über Hämolyse (eukaryot. System).....	74
3.2.1.3	Zellfreie Proteinsynthese im prokaryotischen System.....	75
3.2.1.4	Evaluation der Funktionalität über Hämolyse (prokaryot. System).....	77
3.2.1.5	Immunologischer Nachweis der zellfrei synthetisierten Proteine .....	79
3.2.2	Vergleich der zellfrei synthetisierten TDH-Konstrukte.....	81
3.2.2.1	PCR-Amplifikation der TDH-Konstrukte.....	81
3.2.2.2	Zellfreie Synthese der TDH-Proteine .....	83
3.2.2.3	Immunologischer Nachweis des TDHs mit KAP-RPLA.....	85
3.2.2.4	Evaluation der Proteinfunktionalität durch Hämolyse.....	86

3.3	Anwendung der etablierten Methoden zur Charakterisierung von <i>trh</i> positiven <i>V. parahaemolyticus</i> Stämmen aus Deutschland.....	88
3.3.1	Sequenzanalyse der <i>trh</i> -Gene.....	88
3.3.2	Multilokus-Sequenz-Typisierung .....	91
3.3.3	Genotypisierung potentieller Virulenzgene .....	93
3.3.4	Quantifizierung der mRNA von Virulenzgenen durch qRT-PCR .....	96
3.3.5	Hämolyse-Test und Serumresistenz.....	99
3.3.6	Zellfreie Proteinsynthese von TRH-Varianten und ihre hämolytische Aktivität gegenüber Erythrozyten .....	102
3.3.7	<i>In silico</i> Analyse der TRH-Varianten und TDH2.....	103
<b>4</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>105</b>
4.1	Bewertung der phänotypischen Methoden .....	105
4.2	Entwicklung eines zellfreien Systems zur Untersuchung von Hämolysinen .....	108
4.2.1	Vergleich: prokaryotisches und eukaryotisches System .....	108
4.2.2	Vergleich von zellfrei synthetisierten TDH-Konstrukten .....	109
4.3	Charakterisierung von <i>trh</i> positiven <i>V. parahaemolyticus</i> Stämmen .....	111
4.3.1	<i>Trh</i> -Sequenzen und MLST .....	111
4.3.2	Genotypisierung potentieller Virulenzgene .....	112
4.3.3	Transkriptionsanalyse der Gene <i>tdh</i> , <i>trh</i> und <i>vopC</i> .....	114
4.3.4	Hämolytische Aktivität auf Erythrozyten.....	117
<b>5</b>	<b>Schlussfolgerung und Ausblick</b> .....	<b>120</b>
6	Zusammenfassung.....	123
7	Summary.....	125
8	Literaturverzeichnis .....	127
9	Publikationsverzeichnis .....	141
10	Lebenslauf.....	142
11	Anhang.....	143

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1:	Inzidenz von Erkrankungen durch Lebensmittelpathogene.....	2
Abbildung 1.2:	EM-Aufnahme von <i>Vibrio parahaemolyticus</i> .....	3
Abbildung 1.3:	3D-Rekonstruktion des TDH-Tetramers.....	5
Abbildung 1.4:	Struktur einer T3SS2-tragenden Pathogenitätsinsel.....	8
Abbildung 2.1:	Schema zur Auswertung des KAP-RPLA-Tests.....	61
Abbildung 3.1:	Ergebnis des KAP-RPLA-Tests mit Kulturüberständen.....	71
Abbildung 3.2:	Spotttest auf Kaninchenerythrozyten (eukaryot. System).....	74
Abbildung 3.3:	Autoradiogramm der im prokaryot. System hergestellten Hämolysine.....	76
Abbildung 3.4:	Proteinausbeuten der im prokaryot. System hergestellten Hämolysine.....	77
Abbildung 3.5:	Spotttest auf humanen Erythrozyten (prokaryot. System).....	78
Abbildung 3.6:	Spotttest auf Kaninchenerythrozyten (prokaryot. System).....	78
Abbildung 3.7:	Spotttest auf Schaferythrozyten (prokaryot. System).....	79
Abbildung 3.8:	Immunologischer Nachweis der im prokaryot. System zellfrei hergestellten Hämolysine (KAP-RPLA-Test).....	80
Abbildung 3.9:	Schema der zellfrei hergestellten TDH-Konstrukte.....	82
Abbildung 3.10:	E-PCR2-Produkte für die zellfreie Synthese der TDH-Konstrukte (Gelbild).....	83
Abbildung 3.11:	Synthese der <sup>14</sup> C-markierten Proteine (TDH-Konstrukte).....	84
Abbildung 3.12:	Expressionsausbeuten der im prokaryot. System hergestellten TDH-Konstrukte.....	85
Abbildung 3.13:	Spotttest der zellfrei hergestellten TDH-Konstrukte auf Kaninchenerythrozyten (prokaryot. System).....	87
Abbildung 3.14:	Semiquantitativer Hämolysetest mit den zellfrei hergestellten TDH-Konstrukten.....	88
Abbildung 4.1:	Phylogenetische Verwandtschaft der <i>trh</i> -Genvarianten.....	90
Abbildung 4.2:	Phylogenetische Verwandtschaft auf Basis der MLST-Sequenzen.....	92
Abbildung 4.3:	Ergebnisse der Transkriptionsanalyse der Gene <i>tdh</i> , <i>trh</i> und <i>vopC</i> .....	98

---

Abbildung 4.4:	Hämolytische Aktivität der Bakterienkulturen und Kultur- überstände gegenüber humanen und Schaferythrozyten.....	100/101
Abbildung 4.5:	Simulierte Quartärstruktur von TRH1 und TRH2.....	104
Abbildung B 1.1:	Restriktionsverdau genomischer DNA (Gelbild).....	146/147
Abbildung B 1.2:	PCR-Produkte der inversen PCR (Gelbild).....	147
Abbildung B 2:	Nukleotid- und Aminosäuresequenz des <i>tdh1</i> - und <i>tdh2</i> -Gens.....	148/149
Abbildung B 3.1:	E-PCR2-Produkte der <i>trh</i> -Varianten (Gelbild).....	149
Abbildung B 3.2:	Synthese der <sup>14</sup> C-markierten Proteine (TRH-Varianten und TDH2).....	150
Abbildung B 4:	Protein-Alignment der mTRH-Varianten und mTDH2.....	151/152

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1:	Bakterienstämme Liste 1.....	15/16
Tabelle 1.2:	Bakterienstämme Liste 2.....	17/18
Tabelle 1.3:	Bakterienstämme Liste 3.....	19/20
Tabelle 2.1:	Geräte und Verbrauchsmaterial.....	21-23
Tabelle 2.2:	Chemikalien, Enzyme und Kits.....	24-26
Tabelle 2.3:	Lösungen und Puffer.....	27/28
Tabelle 2.4:	Nährmedien und –böden.....	28-31
Tabelle 2.5:	Programme.....	31
Tabelle 2.6:	Restriktionsenzyme.....	35
Tabelle 2.7:	Primer zum Spezies- und Toxinnachweis.....	38
Tabelle 2.8:	Primer für die inverse PCR.....	39
Tabelle 2.9:	Primer zur Amplifikation des <i>trh</i> -Gens.....	39
Tabelle 2.10:	Primer, Zielgene, Amplifikatgrößen etc. für das Virulotyping.....	42/43
Tabelle 2.11:	Primer und Taqman-Sonden für die Real-Time PCR.....	44
Tabelle 2.12:	Primer und Taqman-Sonden für die qRT-PCR.....	46
Tabelle 2.13:	Primer für die E-PCR1.....	55
Tabelle 2.14:	Primer für die E-PCR2.....	56
Tabelle 2.15:	Übersicht der Primerkombinationen von E-PCR1 und 2.....	57
Tabelle 3.1:	Ergebnisse der geno- und phänotypischen Untersuchungen der Bakterienstämme aus Liste 1.....	64-66
Tabelle 3.2:	Ergebnisse des Virulotypings der Bakterienstämme aus Liste 2.....	67/68
Tabelle 3.3:	Ergebnisse der Real-Time PCR.....	68
Tabelle 3.4:	Immunologischer Nachweis von TDH.....	86
Tabelle 3.5:	Genotypisierung der <i>trh</i> positiven <i>V. parahaemolyticus</i> Stämme.....	94/95
Tabelle 3.6:	Hämolytische Aktivität der zellfrei synthetisierten TRH-Varianten und TDH2.....	103
Tabelle 4	Phänotypische Pathogenität-assozierte Merkmale von Bakterien.....	107
Tabelle C 1:	Primerkombinationen zur Amplifikation und Sequenzierung des gesamten <i>trh</i> -Gens.....	153
Tabelle C 2:	Sequenztypen mit ihren Allelprofilen.....	154

Tabelle C 3.1: Wertetabelle der Transkriptionsanalyse (20°C).....	155
Tabelle C 3.2: Wertetabelle der Transkriptionsanalyse (37°C).....	156
Tabelle C 3.3: Wertetabelle der Transkriptionsanalyse (37°C und Gallenextrakt).....	157
Tabelle C 3.4: Wertetabelle der Transkriptionsanalyse (37°C und Harnstoff).....	158
Tabelle C 4.1: Wertetabelle des Hämolyse-Tests mit Bakterienkulturen und Kulturüberständen gegenüber humanen Erythrozyten.....	159
Tabelle C 4.2: Wertetabelle des Hämolyse-Tests mit Bakterienkulturen und Kulturüberständen gegenüber Schaferythrozyten.....	160

## Abkürzungsverzeichnis

<i>acfD</i>	Gen kodiert für den „accessory colonization factor D“
ATP	Adenosintriphosphat
ATCC	American Type Culture Collection
AWI	Alfred Wegener Institut, Helgoland, Deutschland
BAR-B	Barsikow-Bouillon
BfR	Bundesinstitut für Risikobewertung
bp	Basenpaare
°C	Grad Celcius
CEFAS	Centre for Environment, Fisheries and Aquaculture Science, Weymouth, Großbritannien
DNA	Desoxyribonukleinsäure
<i>dnaE</i>	Gen kodiert für die DNA Polymerase III, Alpha Untereinheit
DNase I	Desoxyribonuklease I
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
<i>dtbS</i>	Gen kodiert für die Threonine Dehydrogenase
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EM	Elektronenmikroskop
E-PCR	Expressions-PCR
g	Gramm
x g	Normfallbeschleunigung auf der Erde: $9,81 \text{ m s}^{-2}$
<i>gyrB</i>	Gen codiert für die DNA Gyrase, Untereinheit B ( <i>Vibrio parahaemolyticus</i> )
h	Stunde
HI-Medium	Herz-Infusions-Medium
His	Histidin-Tag
HPLC-Wasser	Reinstwasser für die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
<i>hutA</i>	Gen kodiert für ein Häm-Transport-Protein
<i>hutR</i>	Gen kodiert für einen putativen TonB-System-Rezeptor
IFH	Institut für Lebensmittelhygiene, Fachbereich Veterinärmedizin, Freie Universität Berlin, Deutschland
K	K-Antigen (Kapselpolysaccharid)
k	Präfix für Einheiten: Kilo, $10^3$

---

KAP-RPLA	Kanagawa Phenomenon detection kit by Reversed Passive Latex Agglutination
KCl	Kaliumchlorid
l	Liter
LAGuS	Landesamt für Gesundheit und Soziales, Rostock, Deutschland
LAVES	Niedersächsisches Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, Cuxhaven, Deutschland
LB-Medium/-Agar	Luria-Bertani-Medium/-Agar
m	mature protein (reifes Protein)
M	Molar
min	Minute
μ	Präfix für Einheiten: Mikro, 10 <sup>-6</sup>
ME	Minimum Evolution Tree
MLST	Multilokus-Sequenz-Typisierung
mRNA	Messenger-RNA
MSHA	Mannose-sensitives Hämagglutinin
<i>mshD</i>	Gen kodiert für putativen MSHA-Pilin
NaCl	Natriumchlorid
O	O-Antigen (somatisches Lipopolysaccharid)
OD <sub>600</sub>	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm
PBS	Phosphat-Puffer-Lösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDB	Protein Data Bank
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
<i>pntA</i>	Gen kodiert für die Transhydrogenase Alpha Untereinheit
pre	preprotein (Vorläuferprotein)
<i>ψ(psi)trh</i>	<i>trh</i> -Pseudogen
<i>pyrC</i>	Gen kodiert für die Dihydroorotase
<i>recA</i>	Gen kodiert für das RecA Protein
qRT-PCR	Quantitative Reverse Transkriptions-PCR
RIMD	Research Institute for Microbial Diseases (Osaka University, Osaka, Japan)
RNA	Ribonukleinsäure
RNase A	Ribonuklease A
rpm	Umdrehungen pro Minute („rounds per minute“)
s	Sekunde
SP	Signalpeptid

---

ST	Sequenztyp
Strep	Streptavidin-Tag
T3SS	Typ-III-Sekretionssystem
T6SS	Typ-VI-Sekretionssystem
TAE-Puffer	Tris-Essigsäure-EDTA-Puffer
Temp.	Temperatur
<i>tdh</i>	Gen kodiert für das TDH-Protein
TDH	Thermostabiles Direkt Hämolyisin (thermostable direct hemolysin)
<i>tnaA</i>	Gen kodiert für die Tryptophanase
<i>toxR</i>	Gen kodiert für ein Transmembranprotein
<i>trh</i>	Gen kodiert für das TRH-Protein
TRH	TDH-verwandtes Hämolyisin (TDH-related hemolysin)
tRNA	Transfer-RNA
U	Einheit der Enzymaktivität ist definiert als diejenige Enzymmenge, die unter Standardbedingungen pro Minute ein Mikromol Substrat umsetzt.
ÜNK	Übernachtkultur
<i>ureC</i>	Gen codiert für ein Strukturprotein der Urease
UV	Ultraviolettes Licht
V	Volt
V.	Vibrio
VN	VibrioNet
<i>vopC</i>	Gen kodiert für ein Effektor-Protein des T3SS2 ( <i>Vibrio parahaemolyticus</i> )
VPaI	Genomische Insel ( <i>Vibrio parahaemolyticus</i> )
<i>vopB2</i>	Gen kodiert für ein Translokator-Protein des T3SS2 ( <i>Vibrio parahaemolyticus</i> )
<i>vscC2</i>	Gen kodiert für eine Strukturkomponente des T3SS2 ( <i>Vibrio parahaemolyticus</i> )
<i>vscP</i>	Gen kodiert für eine Komponente des T3SS1 ( <i>Vibrio parahaemolyticus</i> )
<i>vscS2</i>	Gen kodiert für eine Strukturkomponente des T3SS2 ( <i>Vibrio parahaemolyticus</i> )
<i>vopT</i>	Gen kodiert für ein Effektor-Protein des T3SS2 ( <i>Vibrio parahaemolyticus</i> )



# 1 Einleitung und Zielsetzung

## 1.1 Vibrionen

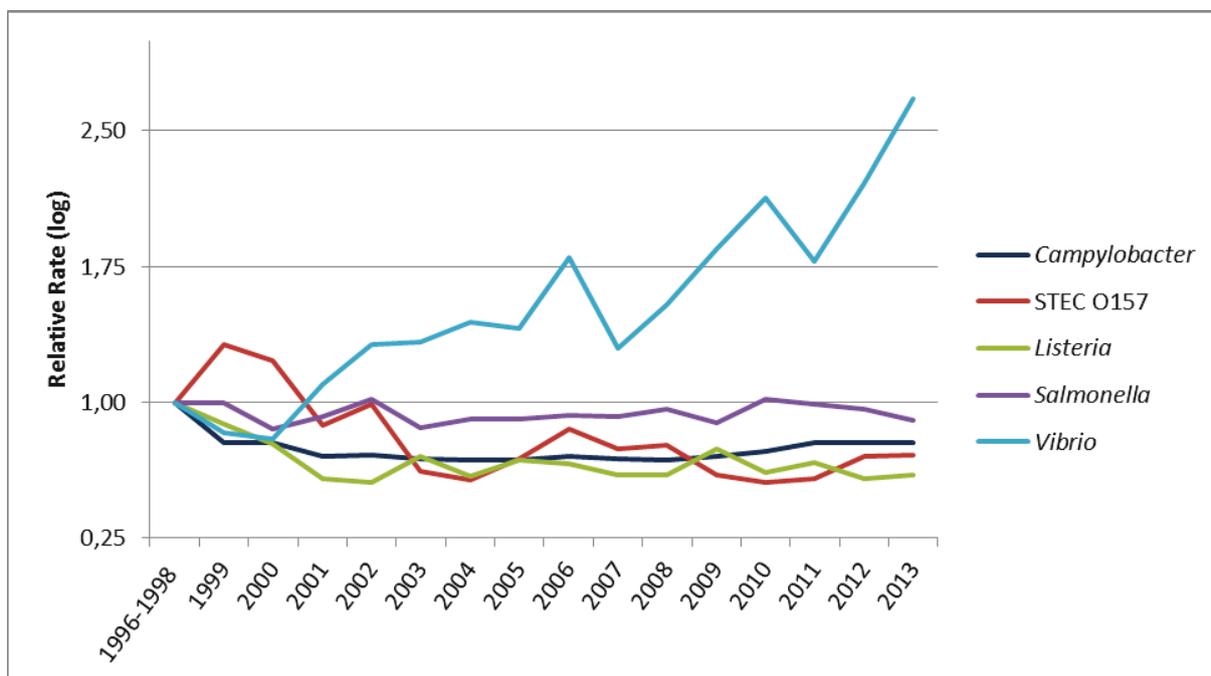
Die Gattung *Vibrio* gehört zur Familie der *Vibrionaceae*, die phylogenetisch in die Klasse der *Gammaproteobacteria* eingeordnet ist. Vibrionen sind gramnegative, nicht-sporenbildende, starre, gerade oder gekrümmte Stäbchenbakterien, welche aufgrund eines polaren Flagellums bzw. mehrerer lateraler Flagellen motil sind (Thompson *et al.* 2006, Johnson 2013, Farmer 2006). Als marine Bakterien sind sie meist halophil und kommen in Salzwassergebieten wie Buchten und Küstengewässern vor, aber auch in brackigen Süßwassergebieten (Thompson *et al.* 2004). Sie sind ubiquitär verbreitet und gelten als autochthone Bakterien der marinen Mikroflora. In ihrem natürlichen Lebensraum können sie entweder freilebend in der Wassersäule, im Sediment oder auch mit Phyto- und Zooplankton assoziiert auftreten. Muschel- und Schalentiere reichern aufgrund ihrer filtrierenden Lebensweise zahlreiche Mikroorganismen wie Vibrionen an, von denen einige Vertreter dieser Gattung als bedeutende Erreger von Lebensmittelinfektionen durch den Verzehr von Meeresfrüchten gelten. Dabei kann beispielsweise die Konzentration an Vibrionen in Austern bis zu 100fach höher sein als im umgebenden Gewässer (Tantillo *et al.* 2004).

In der Gruppe der humanpathogenen Vibrionen zählen *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* und *V. vulnificus* zu den klinisch relevanteren Organismen, während Erreger wie *Grimontia hollisae*, *Photobacterium damsela*, *V. alginolyticus*, *V. fluvialis*, *V. furnissii*, *V. harveyi*, *V. metschnikovii*, *V. cincinnatiensis* und *V. mimicus* weniger häufig bei humanen Erkrankungen isoliert werden (Austin 2010; Brayton *et al.* 1986). *V. cholerae* ist wohl der prominenteste und am besten untersuchte Vertreter der Gattung *Vibrio*, welcher von Robert Koch im Jahr 1883 isoliert und als Erreger der Cholera identifiziert wurde (Thompson *et al.* 2006). Die Übertragung der Cholera-Erreger, welche zu den Serogruppen O1 bzw. O139 gehören und das Cholera-Toxin aufweisen, erfolgt meist über kontaminiertes Trinkwasser bzw. damit kontaminierte Nahrung (DePaola 1981, Reidl *et al.* 2002).

Seit dem 20. Jahrhundert sind in Europa aufgrund verbesserter hygienischer Bedingungen keine größeren Cholera-Ausbrüche mehr vorgekommen. Hingegen stellt die Cholera in Ländern der Dritten Welt, insbesondere wenn die sanitäre Infrastruktur durch Naturkatastrophen (Haiti, 2010) oder infolge politischer Verhältnisse (Simbabwe, 2008)

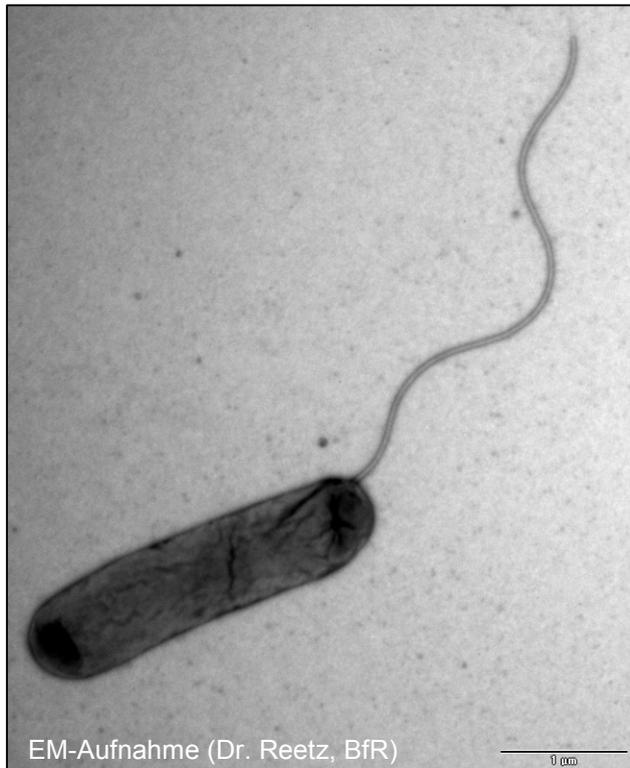
mangelhaft ist, nach wie vor eine Bedrohung für die Bevölkerung dar (Anonymous 2010, Mason 2009). Als aufkommende pathogene Erreger stehen in entwickelten Ländern heute *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* und *V. cholerae* (non-O1 und non-O139) im Fokus, die sich im Zuge der globalen Erwärmung weltweit und auch innerhalb Europas stärker verbreiten und vermehrt zu Infektionen führen (Newton *et al.* 2012, Newton *et al.* 2014, Baker-Austin *et al.* 2010). In den USA hat die relative Häufigkeit lebensmittelbedingter Erkrankungen durch Vibrionen in den letzten 20 Jahren zugenommen, während bei anderen Lebensmittelpathogenen dies nicht beobachtet wurde (siehe Abbildung 1.1).

Vibrionen gehen bei abfallenden Temperaturen im Winter in einen nichtkultivierbaren Ruhezustand (viable but non-culturable – VBNC-Status) über und überdauern hauptsächlich im Sediment bzw. auf Plankton. Mit steigender Wassertemperatur in den Sommermonaten zeigt sich ein erhöhtes *Vibrio*-Wachstum, dabei werden die höchsten *Vibrio*-Konzentrationen in einem Temperaturbereich von 20 – 30°C erreicht (Tantillo *et al.* 2004, Böer *et al.* 2013). Insbesondere sehr heiße Sommer mit einer stark erhöhten Temperatur der Meeresoberfläche (Sea Surface Temperature) stehen in Zusammenhang mit vermehrten *Vibrio*-Infektionen (Baker-Austin *et al.* 2012).



**Abbildung 1.1:** Relative Änderung der Inzidenz von Erkrankungen ausgewählter Lebensmittelpathogene der letzten 20 Jahre in den Vereinigten Staaten (bezogen auf den Zeitraum 1996 bis 1998). Einzig *Vibrio*-Infektionen zeigen einen ansteigenden Trend (Quelle: CDC, vorläufige Daten aus FoodNet 2013; <http://www.cdc.gov/foodnet/data/trends/figures-2013.html#fig2>).

## 1.2 *Vibrio parahaemolyticus*



**Abbildung 1.2:** *Vibrio parahaemolyticus*

*Vibrio parahaemolyticus* ist weltweit einer der bedeutendsten pathogenen Organismen in Zusammenhang mit Lebensmittelinfektionen, die meist durch den Verzehr von rohen oder ungenügend erhitzten Meeresfrüchten und Fischereiprodukten verursacht werden (Blake *et al.* 1980, Thompson *et al.* 2004, Anonymous 2011). *V. parahaemolyticus* wurde 1951 erstmals in Japan bei einem großen Ausbruch mit 272 Erkrankten und 20 Toten als Verursacher einer Gastroenteritis identifiziert, die durch den Verzehr von kontaminierten Sardinen ausgelöst wurde (Shinoda 2011A, Nelapati *et al.* 2012).

Im Jahr 1958 gelang erstmals die Isolierung des Erregers aus dem Stuhl eines Patienten (Takikawa 1958, Cawley 1972). Zum Krankheitsbild einer klassischen *V. parahaemolyticus* Infektion gehören Symptome einer akuten Gastroenteritis, wie Durchfall, Kopfschmerzen, Übelkeit, Erbrechen, abdominale Krämpfe und Fieber. Die Inkubationszeit beträgt durchschnittlich 17 Stunden, kann jedoch in einem Zeitraum von 4-90 Stunden variieren. In der Regel handelt es sich um eine selbstlimitierende Infektion und die Symptome klingen nach drei Tagen ab (Morris 2003, Daniels *et al.* 2000B). In seltenen Fällen, die meist mit einer Immunsuppression des Patienten einhergehen, kann es zu einer Septikämie oder Wundinfektion kommen. Bei letzterer geschieht die Übertragung von *V. parahaemolyticus* meist durch Wundkontakt mit kontaminiertem Meerwasser (Hally *et al.* 1995, Tena *et al.* 2010, Daniels *et al.* 2000A).

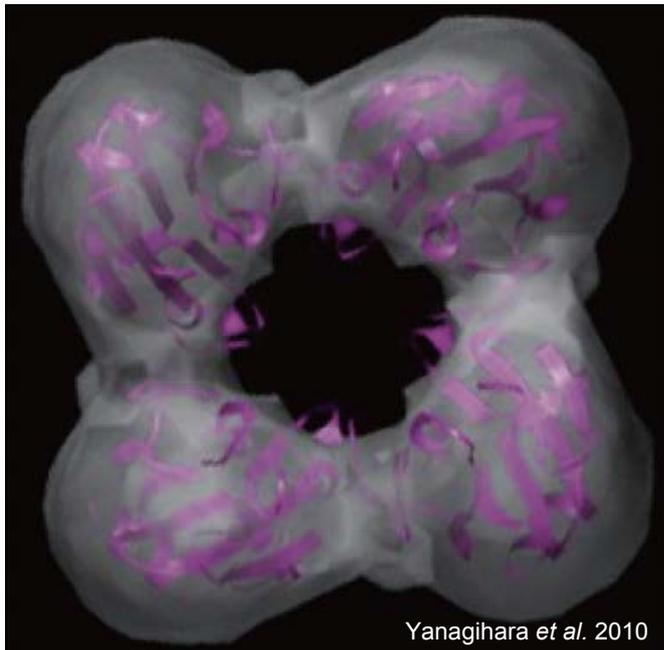
Pathogene *V. parahaemolyticus* Stämme sind Hauptverursacher von Lebensmittelinfektionen durch Meeresfrüchte in den USA (Mead *et al.* 1999), im asiatischen Raum (Pan *et al.* 1996) und in Südamerika (Velazquez-Roman *et al.* 2013). Seit dem Auftreten eines neuen Klons mit dem Serotyp O3:K6 in Kalkutta im Jahr 1996 und seiner nachfolgenden weltweiten Verbreitung sind die *V. parahaemolyticus*-Infektionen auf vielen Erdteilen angestiegen

(Baker-Austin *et al.* 2010, Chiou *et al.* 2000). Das „O“ steht für das somatische Lipopolysaccharid und das „K“ für das Kapselpolysaccharid, welche *V. parahaemolyticus* in 76 OK-Serotypen klassifizieren (Chen *et al.* 2010). Die globale Ausbreitung auf alle Weltmeere und die damit verbundene Pandemie des O3:K6 Serotyps erfolgte sukzessiv und wurde u.a. durch Meeresströmungen und Ballastwasser begünstigt (Nair *et al.* 2007, Velazquez-Roman *et al.* 2013). Insbesondere die Passage von Asien über den Pazifik nach Südamerika wurde wahrscheinlich durch das regelmäßig auftretende El Niño Phänomen in den Jahren 1997 und 1998 stark beschleunigt (Martinez-Urtaza *et al.* 2008).

Mittlerweile hat sich der O3:K6-Klon bis nach Europa ausgebreitet und wurde an den Küsten von Großbritannien, Italien, Frankreich und Spanien nachgewiesen (Martinez-Urtaza *et al.* 2005, Quilici *et al.* 2005, Ottaviani *et al.* 2008, Powell *et al.* 2013) und konnte mit Durchfallerkrankungen verursacht durch den Verzehr lokal produzierter Muscheln in Zusammenhang gebracht werden (Ottaviani *et al.* 2008, Quilici *et al.* 2005). Im Vergleich zu den USA, Asien und Südamerika werden jedoch *V. parahaemolyticus* Infektionen in Europa sehr viel seltener gemeldet. Das könnte zum einen an niedrigen Erkrankungszahlen liegen, aber auch die Folge einer unzureichenden epidemiologischen Überwachung von *Vibrio*-Infektionen sowie eines mangelhaften Monitorings von *Vibrio*-Kontaminationen in Lebensmitteln sein. Dadurch, dass *Vibrio*-Infektionen in Europa nicht meldepflichtig sind, erfolgt keine systematische Erfassung. Dennoch wurden einige sporadische Ausbrüche in Spanien und Großbritannien sowie einzelne klinische Fälle mit *V. parahamolyticus* Infektionen in anderen europäischen Ländern registriert (Martinez-Urtaza *et al.* 2004, Baker-Austin *et al.* 2010).

Ein Großteil der in der Umwelt auftretenden *V. parahaemolyticus* Stämme ist vermutlich nicht in der Lage eine Infektion zu verursachen und gilt damit als nicht-pathogen. Ihnen fehlen Virulenz- und Pathogenitätsfaktoren, welche es einem Stamm ermöglichen, einen Wirt zu besiedeln und eine Krankheit auszulösen. Die Pathogenität von *V. parahaemolyticus*-Isolaten korreliert hauptsächlich mit dem Besitz eines und/oder zweier Hämolysin-kodierender Gene im Genom (Shinoda 2011A). Diese Hämolysine sind das „thermostable direct hemolysin“ (TDH) und das „TDH-related hemolysin“ (TRH), die eine Sequenzhomologie von 60 – 70 % zueinander aufweisen (Nishibuchi *et al.* 1989B). Hämolysine sind Exotoxine, welche die Zellmembran von Erythrozyten angreifen und somit eine Zellschädigung herbeiführen. Als Folge kann Hämolyse auftreten, bei welcher es zur Lyse der Erythrozytenmembran und zu einem Austritt von Eisen bindenden Proteinen, wie Hämoglobin, Transferrin und Lactoferrin, kommt. Eisen ist ein limitierender Faktor für bakterielles Wachstum, insbesondere unter Eisenmangelbedingungen, wie sie im menschlichen Wirt herrschen. Hämolysine, die Poren in Zellmembranen bilden, sind meist

nicht nur auf Erythrozyten beschränkt, sondern können auch andere Zelltypen lysieren (Zhang *et al.* 2005).



**Abbildung 1.3:** Dreidimensionale Rekonstruktion des TDH-Tetramers

TDH und TRH gehören zu den porenformenden Hämolytinen und bilden ein Tetramer in wässriger Lösung aus (Hamada *et al.* 2007). Vier identische Untereinheiten der Proteine mit einem Molekulargewicht von 23 kDa formen ein Homotetramer. Jedes Monomer weist eine interne Disulfidbrücke zwischen zwei in den Toxinen konservierten Cystein-Resten auf (Ohnishi *et al.* 2011, Yanagihara *et al.* 2010). Das *tdh*-Gen kodiert ein Vorläuferprotein mit einer Länge von 189 Aminosäuren, welches durch die

bakterielle Zellwand sekretiert wird. Dabei erfolgt eine Abspaltung eines Signalpeptids mit einer Länge von 24 Aminosäuren (Cai *et al.* 2007, Nishibuchi *et al.* 1985). Vier Monomere des löslichen reifen TDH-Proteins bilden nun ein aktives Toxin mit einer zentralen Pore, durch welche kleine Moleküle, wie Wasser und Ionen hindurch diffundieren können (Yanagihara *et al.* 2010, Takahashi *et al.* 2006). Die Eigenschaft, eine Pore in der eukaryotischen Zellmembran zu formen, bewirkt, dass der kolloidosmotische Druck ansteigt und es zur Zellyse kommt (Fabbri *et al.* 1999). Der genaue Lysevorgang ist allerdings noch nicht bekannt. Für das verwandte Hämolyysin TRH wurde der Mechanismus zur Bildung eines aktiven Toxins und seiner Funktionsweise bisher noch nicht beschrieben. Die hohe Sequenzhomologie von TDH und TRH und die Tatsache, dass beide Toxine ein Tetramer in Lösung bilden, lassen einen ähnlichen Mechanismus vermuten. Für beide Toxine konnte sowohl eine hämolytische als auch eine enterotoxische Wirkung im Tierversuch nachgewiesen werden (Nelapati *et al.* 2012, Honda *et al.* 1990, Honda *et al.* 1988, Raimondi *et al.* 2000, Nishibuchi *et al.* 1992).

Für den diagnostischen Nachweis von TDH sekretierenden *V. parahaemolyticus* Stämmen nutzt man die hämolytische Eigenschaft des Toxins. Hierzu werden die Stämme auf einem speziellen Blutagar mit humanen Erythrozyten ausgestrichen, dem sogenannten Wagatsuma-Agar. Im Wagatsuma-Agar ist Mannitol enthalten, welches bei seiner Verstoffwechslung durch die Bakterien den pH-Wert in einen Bereich von 5,5-6,5 absenkt.

In diesem pH-Bereich wird die TDH-Produktion besonders stark angeregt, so dass es zu einer ausgeprägten  $\beta$ -Hämolyse der Erythrozyten kommt und sich „Hämolyse-Höfe“ bilden (Cherwonogrodzky *et al.* 1981). Bei der  $\beta$ -Hämolyse wird das freigesetzte Hämoglobin vollständig degradiert und es entstehen klare Ränder um die Bakterienkolonien, während bei der  $\alpha$ -Hämolyse ein unvollständiger Abbau des Hämoglobins stattfindet und eine grünliche Verfärbung auftritt. Die Eigenschaft von TDH-sekretierenden *V. parahaemolyticus* Stämmen auf Wagatsuma-Agar eine Hämolyse hervorzurufen, wird als „Kanagawa-Phänomen“ bezeichnet und der Name „Kanagawa-Hämolsin“ entsprechend als Synonym für TDH verwendet. *Trh* positive *V. parahaemolyticus* Stämme gelten als Kanagawa-negativ, da sie keine hämolytische Aktivität auf Wagatsuma-Agar zeigen. Das liegt unter anderem an einer unterschiedlichen Spezifität der Hämolsine gegenüber verschiedenen Säugererythrozyten. Während TDH besonders stark Kaninchen- und humane Erythrozyten lysiert, ist TRH besonders hämolytisch aktiv gegenüber Schaferythrozyten (Honda *et al.* 1988, Yoh 1991, Nagayama *et al.* 1995). Ein weiterer Grund könnte die geringere Expressionsrate von TRH im Vergleich zu TDH sein, was vermutlich mit einer schwächeren Promoteraktivität des *trh*-Gens zusammenhängt (Nakaguchi *et al.* 2005, Shirai *et al.* 1990, Nishibuchi *et al.* 1985).

Ein weiterer wichtiger Unterschied zwischen beiden Hämolsinen liegt in der Proteinstabilität. TRH gilt als hitzelabil und wird ab einer Temperatur von 60 °C inaktiviert. Dagegen ist TDH, wie sein Name impliziert, thermostabil. Dies wird durch hitzeinduzierte Konformationsänderungen des Proteins ermöglicht. Dabei ist TDH in der Lage drei Konformationen einzunehmen: unter 50 °C liegt es als natives toxisches Protein vor, in einem Temperaturbereich von 60 bis 70 °C aggregiert TDH zu inaktiven stabilen Fibrillen mit einem hohen  $\beta$ -Faltblattanteil. Ab einer Temperatur von 90 °C wird das Protein vollständig entfaltet, unabhängig davon, in welcher Konformation es sich zuvor befunden hat. Wird TDH nun in diesem entfalteten Zustand schnell auf 37 °C heruntergekühlt, so faltet es sich wieder zurück in die native toxische Form und besitzt somit die Eigenschaft eines reversiblen Amyloids. Dieser etwas paradoxe Mechanismus wird als Arrhenius-Effekt bezeichnet (Fukui *et al.* 2005, Yanagihara *et al.* 2010, Ohnishi *et al.* 2011).

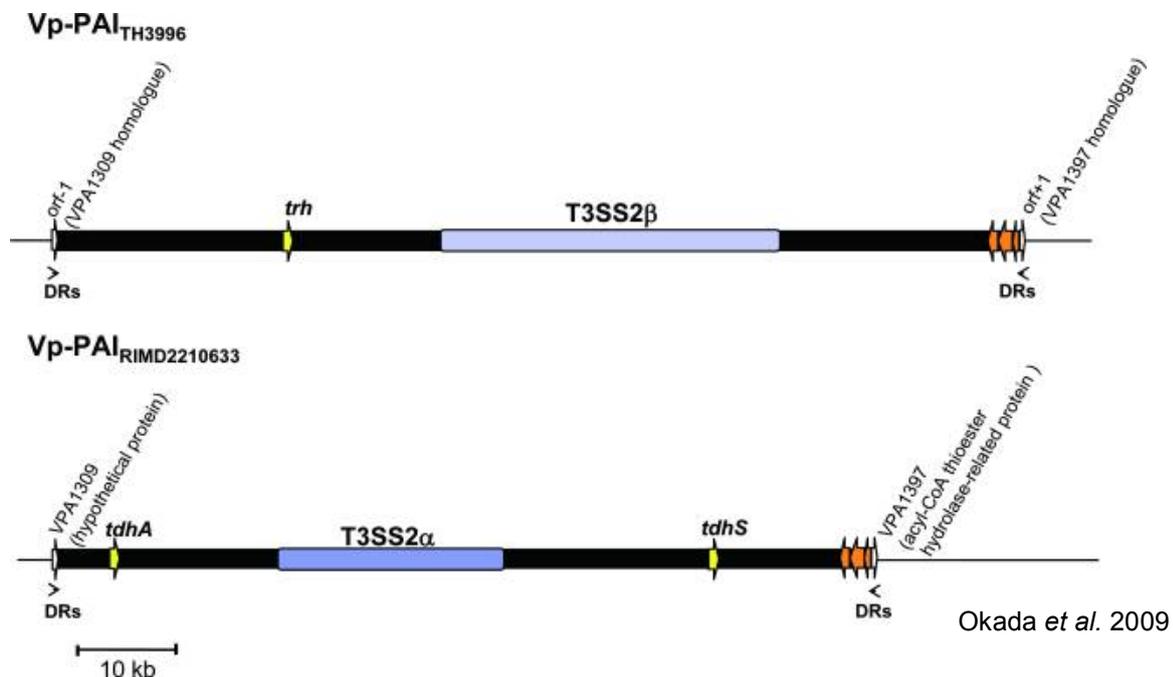
Bisher konnten fünf Varianten des *tdh*-Gens gefunden werden, welche untereinander eine Sequenzidentität von 96 bis 98 % aufweisen (Nishibuchi *et al.* 1990). Dagegen ist eine höhere Variabilität innerhalb der *trh*-Genfamilie festzustellen. Sie lässt sich in zwei größere Untergruppen unterteilen, *trh1* und *trh2*, welche eine Sequenzähnlichkeit von 84 % besitzen (Kishishita *et al.* 1992). Die Gene *tdh* und *trh* sind nicht ausschließlich im Genom von *V. parahaemolyticus* zu finden, sondern kommen gelegentlich auch in anderen *Vibrio*-Spezies vor. Die *tdh*-Varianten, welche in *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae* und *V. mimicus* auftreten, sind phylogenetisch sehr ähnlich und können sowohl auf einem Plasmid als auch

auf einem der Chromosomen lokalisiert sein. Auf dem Chromosom sind sie meist von Wiederholungssequenzen, sog. „inverted repeats“, flankiert, welche als Indiz für Transposons („springende Gene“) gelten. Die nahe Verwandtschaft der artfremden *tdh*-Gene korreliert nicht mit der 16S rRNA-basierten Verwandtschaft der einzelnen Spezies zueinander. Die Beobachtungen lassen somit vermuten, dass das *tdh*-Gen über Transpositionen innerhalb eines Genoms seinen Ort variiert und über einen plasmid-vermittelten Transfer zwischen verschiedenen Spezies hin und her wandern kann (Nishibuchi *et al.* 1995). Das *trh*-Gen konnte neben *V. parahaemolyticus* außerdem in *V. alginolyticus* und *V. cholerae* (non-O1/non-O139) nachgewiesen werden (Gonzalez-Escalona *et al.* 2006, Xie *et al.* 2005, Miller *et al.* 2012).

Über die Funktion von TDH und TRH im natürlichen Lebensraum von *V. parahaemolyticus* besteht noch keine Klarheit. Auch ihre Rolle als Hauptpathogenitätsfaktoren von klinischen *V. parahaemolyticus* Stämmen ist noch nicht abschließend geklärt. Allein die starke Korrelation von Infektionen mit Krankheitsbild und *tdh* und/oder *trh* positiven klinischen Stämmen und dem relativ seltenen Vorkommen dieser Hämolysin-tragenden Stämme in der Umwelt, sowie ihre toxischen Eigenschaften in *in vitro*- und Tierexperimenten, sind starke Indizien für die klinische Bedeutung der beiden Hämolysine. Jedoch haben die Tierexperimente mit *tdh*- und *trh*-deletierten Mutanten-Stämmen auch gezeigt, dass die von ihnen verursachte Enterotoxizität reduziert, aber nicht vollständig inhibiert wird (Xu *et al.* 1994B, Park *et al.* 2004A). Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass noch weitere Virulenzfaktoren in pathogenen *V. parahaemolyticus* Stämmen existieren.

In den letzten Jahren ist ein Typ 3 Sekretionssystem (T3SS) als möglicher wichtiger Pathogenitätsfaktor in den Fokus gerückt. Allgemein besteht ein T3SS aus einer nadelähnlichen Struktur. Bei Kontakt mit einer Wirtszelle bilden zunächst bestimmte Proteine, sogenannte Translokatoren, eine Pore bzw. einen kleinen Kanal (Translokon) in der Wirtszellmembran. Anschließend werden über die Nadel sogenannte Effektoren in die Wirtszelle eingeschleust, wo sie Signalwege und Zellfunktion verändern und somit die Infektion unterstützen (Troisfontaines *et al.* 2005, Ham *et al.* 2012). *V. parahaemolyticus* besitzt zwei unterschiedliche Typ 3 Sekretionssysteme. Epidemiologische Studien und Tierversuche deuten an, dass mindestens eines der beiden Systeme eine wichtige Rolle bei der Pathogenität von *V. parahaemolyticus* spielt (Hiyoshi *et al.* 2011, Zhang *et al.* 2013, Zhou *et al.* 2013, Ritchie *et al.* 2012). Das T3SS1 ist auf dem Chromosom 1 lokalisiert, kommt in allen *V. parahaemolyticus* Stämmen vor und steht im Zusammenhang mit Zytotoxizität gegenüber einigen humanen Zelllinien (Kodama *et al.* 2007, Hiyoshi *et al.* 2010). Vermutlich ist das T3SS1 jedoch nicht an der enterotoxischen Wirkung von *V. parahaemolyticus* beteiligt

und spielt somit eine geringere Rolle bei der Pathogenität (Hiyoshi *et al.* 2010, Park *et al.* 2004B).



**Abbildung 1.4:** Schema der Struktur einer T3SS2-tragenden Pathogenitätsinsel eines *trh* positiven *V. parahaemolyticus* Stammes (Vp-PAI<sub>TH3996</sub>) und eines *tdh* positiven Stammes (Vp-PAI<sub>RIMD2210633</sub>). Beide Regionen werden durch 5-bp DRs (= direct repeats) flankiert.

Das T3SS2 befindet sich auf dem Chromosom 2 und liegt meist zusammen mit *tdh*- oder *trh*-Genen vor. Es konnte gezeigt werden, dass das T3SS2 für Zytotoxizität, aber auch für Enterotoxizität im Tierversuch verantwortlich ist (Okada *et al.* 2009, Hiyoshi *et al.* 2010). Das T3SS2 wird in zwei Subtypen untergliedert: T3SS2 $\alpha$  ist mit dem *tdh*-Gen auf der Pathogenitätsinsel VpaI-7 assoziiert, während sich T3SS2 $\beta$  benachbart von *trh* auf einer anderen Pathogenitätsinsel befindet. Beide Subtypen des T3SS2 zeigen eine signifikante Homologie zueinander, weisen jedoch eine unterschiedliche molekulare Phylogenie auf (Okada *et al.* 2009).

Das Vorkommen von Umweltstämmen, welche weder *tdh*- noch *trh*-Gene, jedoch das T3SS2 besitzen (Caburlotto *et al.* 2009, Paranjpye *et al.* 2012) sowie Transposase-Elemente, welche das T3SS2-Gencluster flankieren (Okada *et al.* 2009) stellen jedoch eine direkte Korrelation des T3SS2-Genclusters mit den Hämolyisin-Genen in Frage (Ceccarelli *et al.* 2013). Die beiden Subtypen T3SS2 $\alpha$  und T3SS2 $\beta$  kommen auch bei *V. mimicus* (Okada *et al.* 2010) und pathogenen *V. cholerae* (non-O1/non-O139) Stämmen vor. Die T3SS2-tragenden Pathogenitätsinseln von *V. parahaemolyticus* und *V. cholerae* (non-O1/non-O139)

unterscheiden sich in ihrem Aufbau, was einen unterschiedlichen evolutionären Ursprung impliziert (Okada *et al.* 2009). Diese Beobachtungen legen die Vermutung nahe, dass das T3SS-Gencluster separat von der Pathogenitätsinsel über horizontalen Gentransfer übertragen werden kann. Die eigentliche Funktion des T3SS in der natürlichen Umgebung von *V. parahaemolyticus* konnte zumindest für T3SS2 $\alpha$  gezeigt werden. Dieses ist an der Abtötung von bakterivoren Protisten beteiligt und könnte somit einen entscheidenden Überlebensvorteil in marinen Lebensgemeinschaften liefern (Matz *et al.* 2011). Da *V. parahaemolyticus* oft mit Meerestieren, wie z.B. Krebsen, assoziiert ist, wird eine Rolle des T3SS für das Überleben in der Hämolymphe diskutiert, wie es für *Photobacterium luminescens* beschrieben ist. *P. luminescens* wird hierbei durch die Aktivität des T3SS vor der Phagozytose durch Makrophagen im Hämocoel von Arthropoden geschützt (Troisfontaines *et al.* 2005).

Neben der Nachbarschaft von *trh*-Genen zu dem T3SS2 $\beta$ -Gencluster auf einer Pathogenitätsinsel besteht außerdem eine genetische Kopplung von *trh* mit einem Urease-Gencluster, welches mit einem Nickel-Transport-System assoziiert vorliegt. Die Eigenschaft Urease zu produzieren, ist innerhalb der Gattung *Vibrio* selten und dient somit als diagnostischer Marker zum Nachweis potenziell pathogener *trh* positiver *V. parahaemolyticus* Stämme (Park *et al.* 2000). Dabei ist die Urease-Expression und -Aktivität bei *V. parahaemolyticus* davon abhängig, ob Harnstoff verfügbar ist (Park *et al.* 2000). Beim Menschen ist Harnstoff das Endprodukt des Stoffwechsels von Stickstoffverbindungen und wird von der Leber produziert. Der Hauptteil an produziertem Harnstoff wird über die Nieren ausgeschieden, jedoch passieren 20-25 % des gesamten Harnstoffs den Verdauungstrakt (Burne *et al.* 2000).

Bei vielen Enteropathogenen spielt die Urease eine wichtige Rolle bei der Infektion und deren Manifestation. Der Überlebensvorteil besteht darin, dass bei der Harnstoff-Spaltung durch Ureasen Ammoniak entsteht, welcher H<sup>+</sup>-Ionen im sauren Milieu bindet und somit den pH-Wert in der lokalen Umgebung erhöht. Dieser Mechanismus ermöglicht es somit einem Erreger die saure Magen-Darm-Passage zu überstehen und dies wird u.a. von *Helicobacter pylori* genutzt, der es somit schafft, bei einem pH-Wert von 1 bis 4 zu überleben (Stingl *et al.* 2002, Burne *et al.* 2000). Bei *V. parahaemolyticus* ist eine Rolle der Urease bei einer Infektion noch nicht genauer untersucht worden.

Bei dem Erwerb neuer pathogener Eigenschaften spielt der horizontale Gentransfer eine bedeutende Rolle bei den meisten Bakterienarten. Sequenzanalysen der Genome nahe verwandter Arten haben gezeigt, dass sich starke Genomvariationen innerhalb mobiler genetischer Elemente, wie den genomischen Inseln, konzentrieren. Der Erwerb dieser genomischen Inseln ermöglicht es den Bakterien, eine Vielzahl an neuen genetischen

Eigenschaften anzunehmen, wodurch sie ihre Fitness an sich ändernde Umweltbedingungen optimal anpassen können (Joyce *et al.* 2002, Thompson *et al.* 2005, Hacker *et al.* 2004). Genomische Inseln werden auf der Basis ihrer Funktionen, die sie kodieren, in Klassen eingeteilt, wie z.B. metabolische Inseln, Resistenzinseln oder Pathogenitätsinseln (Dobrindt 2004, Hacker *et al.* 2000). Genomische Sequenzanalysen des pandemischen O3:K6 Stamms, welcher nach 1995 weltweit als der Hauptverursacher von Lebensmittelinfektionen durch den Verzehr von Meeresfrüchten gilt (Chowdhury *et al.* 2000, Yeung *et al.* 2004, Martinez-Urtaza *et al.* 2005, Cabello *et al.* 2007), haben gezeigt, dass dieser von einem O3:K6-Isolat abstammt, welches mindestens sieben neue genomische Inseln (Vpal-1 bis Vpal-7) erworben hatte (Boyd *et al.* 2008, Han *et al.* 2008). Dabei gilt die 81 kb große Pathogenitätsinsel Vpal-7, auf welcher zwei *tdh*-Gene (*tdh1* und *tdh2*) sowie das T3SS2 $\alpha$  liegen, als besonders relevant für die Pathogenität im Menschen (Izutsu *et al.* 2008). Die Funktionen der anderen sechs genomischen Inseln wurden bisher nicht genauer charakterisiert.

Eine weitere neu erworbene Eigenschaft des pandemischen Klons ist das Typ 6 Sekretionssystem (T6SS), wovon zwei Subtypen, T6SS1 und T6SS2, existieren. Vorläufige Daten zeigen, dass T6SS2 bei der Adhäsion an Wirtszellen beteiligt ist. T6SS1 scheint eine wichtige Funktion in der Umwelt einzunehmen, indem es unter wärmeren Bedingungen antibakterielle Aktivität gegenüber artfremden Bakterien und Stämmen der eigenen Spezies zeigt. Dies könnte einen entscheidenden Fitnessvorteil während der Sommermonate liefern, wenn die Küstengewässer erwärmt sind und die marinen Bakterienpopulationen stark anwachsen (Salomon *et al.* 2013). Weitere Eigenschaften wie Schwimmen, Schwärmen auf viskosen Oberflächen, Biofilmbildung oder die Fähigkeit eine Kapsel zu bilden, sind sowohl beim Überleben in der Umwelt als auch bei der Kolonisierung des menschlichen Darms von Vorteil (Broberg *et al.* 2011).

Wie zuvor erwähnt, treten Infektionen durch *V. parahaemolyticus* in Europa eher sporadisch mit kleineren lokalen Ausbrüchen oder einzelnen klinischen Fällen auf. Dabei wird die große Mehrheit an Infektionen durch *tdh* positive Stämme verursacht (Baker-Austin *et al.* 2010), während bisher nur wenige Infektionen mit *trh* positiven Stämmen in Zusammenhang gebracht wurden (drei Fälle in Norwegen und einer in Deutschland). Betrachtet man die geographische Verteilung pathogener *V. parahaemolyticus* Stämme in europäischen Gewässern, so lässt sich beobachten, dass im Mittelmeer *tdh* und *trh* positive Stämme vorkommen (Roque *et al.* 2009, Suffredini *et al.* 2011). Dagegen treten *tdh* positive Stämme kaum in Nordeuropa auf, während *trh* positive Stämme mit einer Häufigkeit 3 bis 5 % detektiert werden (Ellingsen *et al.* 2008, Böer *et al.* 2013 und Hervio-Heath *et al.* 2002) und mit steigender Tendenz (bis zu 15 %) an der Küste Frankreichs (Robert-Pillot *et al.* 2004).

Dabei scheint die Wassertemperatur einen Einfluss auf das Auftreten *trh* positiver Stämme zu haben (Julie *et al.* 2010). In deutschen Küstengewässern ist *V. parahaemolyticus* zusammen mit *V. alginolyticus* in der Nordsee weit häufiger vertreten als in der Ostsee, wo *V. vulnificus* und *V. cholerae* (non-O1/non-O139) die vorherrschenden *Vibrio*-Spezies sind. *Trh*-tragende *V. parahaemolyticus* Stämme wurden in Wasser- und Sedimentproben der Nordsee mit einer Häufigkeit von 5,7 % gefunden (Böer *et al.* 2013). Beim Monitoring von zweischaligen Weichtieren (Miesmuscheln und Austern) aus Muschelzuchten (Primärproduktion) an der deutschen Nordseeküste wird *V. parahaemolyticus* als zweithäufigste *Vibrio*-Spezies mit einer Häufigkeit von ca. 30 % gefunden (Bartelt 2014, Lhafi *et al.* 2007), gelegentlich mit *trh* positiven Isolaten. In Miesmuschelzuchten an der Südküste von Norwegen wurden ebenfalls *trh* positive *V. parahaemolyticus* Isolate detektiert (Bauer *et al.* 2006). In deutschen Küstengewässern sind demnach (potentiell) humanpathogene *V. parahaemolyticus* Stämme ein Teil der mikrobiellen Gemeinschaft und stellen somit ein Gesundheitsrisiko für Konsumenten von Meeresfrüchten als auch für Badende mit Immunsuppression dar. Bisher wurde jedoch das pathogene Potential dieser einheimischen *trh*-tragenden *V. parahaemolyticus* Isolate nicht genauer charakterisiert.

### 1.3 Zellfreie Proteinsynthese

Bei der klassischen Überexpression eines gewünschten Proteins wird das proteinkodierende Gen in einen DNA-Vektor kloniert, welcher in einen Expressionsorganismus (z.B. *E. coli*) transformiert und exprimiert wird. Bei dieser Expressionsmethode wird die Zelle so manipuliert, dass sie zusätzlich zu den eigenen Proteinen ein fremdes Protein produziert. Aufgrund der begrenzten Ressourcen des Transkriptions- und Translationsapparats ist die Expressionsrate des gewünschten Proteins jedoch limitiert. Weitere mögliche Nachteile sind u.a. eine Unterdrückung der Expression des Fremdgens durch zelleigene Regulationsmechanismen, ein Abbau der mRNA oder des fertigen Proteins durch Nucleasen bzw. Proteasen oder die Entstehung von Einschlusskörperchen („inclusion bodies“), in welchen das rekombinante Protein aggregiert und sich somit die Proteingewinnung schwierig gestaltet. Das Auftreten von „inclusion bodies“ wurde auch für die Überexpression rekombinanter TDH- und TRH-Proteine in *E. coli* beschrieben (Zhao *et al.* 2011). Des Weiteren kann die Überexpression von toxischen Produkten, wie z.B. Membranproteinen und proteinogenen Toxinen, den Stoffwechsel des Expressionsorganismus stark beeinträchtigen oder die Wirtszelle sogar abtöten, so dass eine Expression nicht möglich ist.

Für die Überexpression von Toxinen bietet sich daher die zellfreie Proteinsynthese an. Diese *in vitro*-Methode bedient sich der Proteinsynthese-Maschinerie von lysierten Zellen. Durch die Entfernung des Zellkerns (in eukaryotischen Zellen), der Zellmembran sowie endogener mRNAs aus dem Zellysate wird die gezielte Translation des gewünschten Proteins erreicht und die Synthese zelleigener Proteine ausgeschlossen (Stech *et al.* 2013). Ein weiterer wichtiger Faktor für die selektive Anreicherung des gewünschten Proteins ist die spezifische Hemmung der zelleigenen RNA-Polymerase durch das Antibiotikum Rifampicin. Stattdessen wird eine virale T7-Polymerase dem System hinzugefügt oder sie kann alternativ im genmodifizierten *E. coli*-Stamm, der für die Lysatherstellung verwendet wird, überexprimiert sein, wodurch die Polymerase bereits im Lysat vorliegt (Nevin *et al.* 1991). Die T7-Polymerase transkribiert ausschließlich das gewünschte Gen, welches durch vorherige Modifikationen von einem T7-Promoter und einem T7-Terminator flankiert ist (Nevin *et al.* 1991, Köhrer *et al.* 1996). Zusätzliche Vorteile des zellfreien Systems sind die Abwesenheit von zellulären Kontrollmechanismen, die direkte Einflussnahme auf die Reaktionsbedingungen und das Wegfallen eines zeitintensiven Klonierungs- und Transformationsschritts (Katzen *et al.* 2005, Carlson *et al.* 2012, Kubick 2012).

Die Reaktion der zellfreien Proteinsynthese enthält als Template die Nukleinsäure des gewünschten Gens als mRNA oder DNA in Form von PCR-Produkten oder Plasmiden (End *et al.* 2014). Die Konstruktion des Templates erfolgt über eine zweistufige Expressions-PCR, in welcher das Template amplifiziert wird und Modifikationen, wie z.B. die Implementierung der T7-Komponenten, vorgenommen werden.

Bei der zellfreien Proteinsynthese unterscheidet man zwischen prokaryotischen und eukaryotischen Systemen. Sowohl bei Prokaryoten *in vivo* als auch im prokaryotischen *in vitro*-System, welches meist auf *E. coli*-Lysat basiert, laufen Transkription und Translation zeitlich und räumlich gekoppelt voneinander ab. Dabei kommt es oft zur Ausbildung von Polysomen, d.h. es lagern sich mehrere Ribosomen an eine sich ausbildende mRNA-Kette an. Um die Translation und die korrekte Konformation des gewünschten Proteins zu gewährleisten, müssen Transfer-RNAs (tRNAs) und Ribosomen, welche abhängig vom Verfahren der Lysatherstellung, verloren gehen (Jermutus *et al.* 1998), sowie Energieträger (ATP bzw. GTP), Aminosäuren, Chaperone (Faltungshelfer für Proteine), Salze und andere Kofaktoren der Reaktion hinzugefügt werden. Andere notwendige Bestandteile des Proteinsyntheseapparats wie Enzyme, Membranteile und der Großteil an biologisch aktiven Organellen sowie essentielle Initiations-, Elongations- und Terminations-Faktoren sind im Zellysate enthalten (End *et al.* 2014, Jermutus *et al.* 1998).

Beim eukaryotischen *in vitro*-System wie auch bei Eukaryoten *in vivo* laufen Transkription und Translation räumlich und zeitlich getrennt voneinander ab. Das eukaryotische Zellysate

wird meist aus Weizenkeimen, Kaninchenretikulozyten oder Insektenzellen gewonnen (End *et al.* 2014). Auch hier müssen einige Komponenten der Reaktion extra hinzugefügt werden. Sowohl prokaryotische als auch eukaryotische *in vitro*-Systeme ermöglichen mittlerweile die Synthese funktioneller und komplexer Proteine, sowie von Proteinen, welche co-translationale und posttranslationale Modifikationen benötigen, wie z.B. Glykolysierungen oder die Ausbildung von Disulfidbrücken (Stech *et al.* 2014, Sachse *et al.* 2014, Jermutus *et al.* 1998).

Bei beiden Systemen lässt sich die zellfreie Proteinsynthese im Standardverfahren, dem sogenannten Batch-Ansatz, durchführen. Hierbei findet die Reaktion in einem kleinen Reaktionsgefäß (z.B. Eppendorf-Tube) statt und kann nach dem Reaktionsstart nicht mehr beeinflusst werden. Dabei kommt es meist zu einem schnellen Verbrauch des Energieträgers und einer gleichzeitigen Akkumulation störender Neben- oder Abfallprodukte, wie z.B. anorganisches Phosphat. Somit ist die Syntheserate des gewünschten Proteins anfangs recht hoch und fällt dann schnell ab, wodurch die Proteinausbeute, verglichen mit den nachfolgend beschriebenen Systemen, geringer ausfällt. Höhere Proteinausbeuten lassen sich mit aufwändigeren Verfahren, wie dem „Continuous-flow cell-free translation system“ (CFCF) im Durchflussreaktor oder dem „Continuous-exchange cell-free translation system (CECF), einem Dialyse-System, erzielen, bei welchen notwendige Komponenten neu zugeführt sowie Abfallprodukte entfernt werden und somit eine Verlängerung der Reaktionszeit ermöglicht wird (Spirin *et al.* 1988, Katzen *et al.* 2005). Bisher ist die zellfreie Proteinsynthese für Bioproduktionszwecke in der Industrie aufgrund der verhältnismäßig geringen Syntheseleistung noch limitiert (End *et al.* 2014). Neue Technologien, welche an den industriellen Herstellungsbedingungen ausgerichtet sind, befinden sich in der Entwicklung.

## 1.4 Zielsetzung

*V. parahaemolyticus* ist weltweit der bedeutendste Erreger von Lebensmittelinfektionen durch den Verzehr von rohen oder ungenügend erhitzten Meeresfrüchten und Fisch. Durch das Auftreten eines pandemischen Klons und aufgrund der fortschreitenden globalen Erwärmung nehmen die Infektionen in den letzten Jahrzehnten kontinuierlich zu. Ein Ziel dieser Arbeit war es, mithilfe der zellfreien Proteinsynthese die wichtigen Pathogenitätsfaktoren TDH und TRH herzustellen, um die Hämolytine und einige ihrer Varianten funktionell miteinander zu vergleichen. Des Weiteren sollte der Einfluss des Signalpeptids und verschiedener Protein-Tags auf die Funktionalität der Hämolytine-Varianten untersucht werden.

Ein weiteres Ziel stellte die Charakterisierung *trh*-tragender *V. parahaemolyticus* Isolate aus deutschen Küstengewässern dar. Hierzu sollten einheimische *trh* positive Stämme aus der Nord- und Ostsee mit *trh* positiven Stämmen aus anderen Ländern verglichen werden. Mittels Multilokus-Sequenz-Typisierung wurde eine Analyse der Verwandtschaft der einzelnen Stämme zueinander vorgenommen. Über verschiedene Multiplex-PCRs sollten potentielle Virulenzfaktoren nachgewiesen werden, um mögliche pathogene Muster auf genetischer Ebene festzustellen. Mit einer Auswahl an Stämmen erfolgte eine Transkriptionsanalyse der Virulenzgene *tdh*, *trh* und *vopC* (T3SS2 $\beta$ ) mittels quantitativer Real-Time PCR unter verschiedenen Wachstumsbedingungen. Dabei sollte der Einfluss der Temperatur sowie die Wirkung von Gallenextrakt und Harnstoff untersucht werden. Galle und Harnstoff werden u.a. in den menschlichen Darm ausgeschieden und könnten sich bei einer Infektion mit *V. parahaemolyticus* induzierend auf die Expression von Virulenzfaktoren auswirken. Um das pathogene Potential der *V. parahaemolyticus* Stämme auf der phänotypischen Ebene zu analysieren, erfolgte eine Untersuchung der hämolytischen Aktivität gegenüber verschiedenen Säugererythrozyten und der Fähigkeit in humanem Serum zu überleben.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Bakterienstämme

**Tabelle 1.1:** Liste der im Teil 3.1 (Etablierung von Methoden) verwendeten 44 *V. parahaemolyticus* Stämme aus Deutschland und dem Ausland. Die Isolate stammen aus der Umwelt, dem Lebensmittelhandel und von Patienten.

Stamm	Genotyp	Jahr	Quelle	isoliert aus	Land	Herkunft
VN-0022	<i>tdh<sup>-</sup>/trh<sup>-</sup></i>	2010	Lebensmittel	Muschel	Deutschland	BfR
VN-0024	<i>tdh<sup>+</sup>/trh<sup>+</sup></i>	2006	Ringversuch	unbekannt	unbekannt	CEFAS
VN-0025 <sup>1)</sup>	<i>tdh<sup>+</sup>/trh<sup>-</sup></i>	2007	Klinisch	Fäzes	Chile	BfR
VN-0027	<i>tdh<sup>-</sup>/trh<sup>-</sup></i>	2009	Lebensmittel	Muschel	Deutschland	BfR
VN-0028	<i>tdh<sup>-</sup>/trh<sup>+</sup></i>	1995	Klinisch	Fäzes	Deutschland <sup>2)</sup>	BfR
VN-0029	<i>tdh<sup>-</sup>/trh<sup>+</sup></i>	1995	Klinisch	Fäzes	Deutschland	BfR
VN-0030	<i>tdh<sup>-</sup>/trh<sup>+</sup></i>	1999	Umwelt	Wasser	Deutschland	BfR
VN-0038	<i>tdh<sup>+</sup>/trh<sup>+</sup></i>	2007	Klinisch	Fäzes	Peru	BfR
VN-0039	<i>tdh<sup>+</sup>/trh<sup>-</sup></i>	1999	Klinisch	Fäzes	Spanien	BfR
VN-0040	<i>tdh<sup>-</sup>/trh<sup>-</sup></i>	2001	Klinisch	Fäzes	Peru	BfR
VN-0041	<i>tdh<sup>+</sup>/trh<sup>-</sup></i>	2002	Klinisch	Fäzes	Peru	BfR
VN-0042	<i>tdh<sup>+</sup>/trh<sup>-</sup></i>	2005	Klinisch	Fäzes	Peru	BfR
VN-0043	<i>tdh<sup>+</sup>/trh<sup>-</sup></i>	2000	Klinisch	Fäzes	Peru	BfR
VN-0045	<i>tdh<sup>+</sup>/trh<sup>+</sup></i>	1988	Klinisch	Fäzes	USA	BfR
VN-0046	<i>tdh<sup>+</sup>/trh<sup>+</sup></i>	1994	Klinisch	Fäzes	USA	BfR
VN-0047	<i>tdh<sup>+</sup>/trh<sup>-</sup></i>	2004	Klinisch	Fäzes	Spanien	BfR
VN-0048	<i>tdh<sup>+</sup>/trh<sup>-</sup></i>	1996	Klinisch	Fäzes	Japan	BfR
VN-0049	<i>tdh<sup>-</sup>/trh<sup>+</sup></i>	1991	Klinisch	Fäzes	Thailand	BfR
VN-0050	<i>tdh<sup>+</sup>/trh<sup>+</sup></i>	1994	Klinisch	Fäzes	Thailand	BfR
VN-0051	<i>tdh<sup>+</sup>/trh<sup>-</sup></i>	2006	Umwelt	Wasser	Spanien	BfR
VN-0054	<i>tdh<sup>-</sup>/trh<sup>-</sup></i>	1998	Umwelt	Fisch	Asien	BfR
VN-0055	<i>tdh<sup>+</sup>/trh<sup>+</sup></i>	1999	Umwelt	Auster	USA	BfR
VN-0057	<i>tdh<sup>+</sup>/trh<sup>+</sup></i>	1999	Umwelt	Auster	USA	BfR

<b>Stamm</b>	<b>Genotyp</b>	<b>Jahr</b>	<b>Quelle</b>	<b>isoliert aus</b>	<b>Land</b>	<b>Herkunft</b>
VN-0058	<i>tdh<sup>+</sup>/trh<sup>+</sup></i>	1999	Umwelt	Auster	USA	BfR
VN-0060	<i>tdh<sup>-</sup>/trh<sup>-</sup></i>	2006	Umwelt	Plankton	Spanien	BfR
VN-0061	<i>tdh<sup>-</sup>/trh<sup>+</sup></i>	2006	Umwelt	Plankton	Spanien	BfR
VN-0063	<i>tdh<sup>+</sup>/trh<sup>-</sup></i>	1996	Klinisch	Fäzes	Indien	BfR
VN-0064	<i>tdh<sup>+</sup>/trh<sup>-</sup></i>	2002	Umwelt	Wasser	Peru	BfR
VN-0071	<i>tdh<sup>-</sup>/trh<sup>-</sup></i>	1996	Umwelt	Muschel	Dänemark	BfR
VN-0073	<i>tdh<sup>-</sup>/trh<sup>-</sup></i>	2008	Lebensmittel	Muschel	Niederlande	BfR
VN-0074	<i>tdh<sup>-</sup>/trh<sup>-</sup></i>	2008	Lebensmittel	Muschel	Italien	BfR
VN-0076	<i>tdh<sup>+</sup>/trh<sup>-</sup></i>	2008	Ringversuch	unbekannt	unbekannt	BfR
VN-0077	<i>tdh<sup>+</sup>/trh<sup>+</sup></i>	2001	Klinisch	Fäzes	Norwegen	BfR
VN-0078	<i>tdh<sup>-</sup>/trh<sup>+</sup></i>	2000	Klinisch	Fäzes	Thailand	BfR
VN-0079	<i>tdh<sup>-</sup>/trh<sup>-</sup></i>	2008	Lebensmittel	Muschel	unbekannt	BfR
VN-0080	<i>tdh<sup>-</sup>/trh<sup>-</sup></i>	2008	Lebensmittel	Garnele	Deutschland	BfR
VN-0081	<i>tdh<sup>-</sup>/trh<sup>-</sup></i>	2008	Lebensmittel	Muschel	Deutschland	BfR
VN-0082	<i>tdh<sup>+</sup>/trh<sup>-</sup></i>	2008	Klinisch	Fäzes	Chile	BfR
VN-0083	<i>tdh<sup>-</sup>/trh<sup>-</sup></i>	2009	Lebensmittel	Garnele	Deutschland	BfR
VN-0084	<i>tdh<sup>-</sup>/trh<sup>+</sup></i>	2009	Lebensmittel	unbekannt	UK	BfR
VN-0085	<i>tdh<sup>-</sup>/trh<sup>+</sup></i>	2010	Ringversuch	unbekannt	unbekannt	BfR
VN-0086	<i>tdh<sup>-</sup>/trh<sup>-</sup></i>	1995	Lebensmittel	Garnele	Deutschland	BfR
VN-0089	<i>tdh<sup>-</sup>/trh<sup>-</sup></i>	1995	Lebensmittel	Garnele	Deutschland	BfR
RIMD 2210633	<i>tdh<sup>+</sup>/trh<sup>-</sup></i>	1983	Human	Fäzes	Japan	BfR

<sup>1)</sup> entspricht Stamm PMA 1.6

<sup>2)</sup> vorheriger Aufenthalt in Tansania

BfR: Bundesinstitut für Risikobewertung, Berlin, Deutschland;

CEFAS: Centre for Environment, Fisheries and Aquaculture Science, Weymouth, Großbritannien

**Tabelle 1.2:** Liste der im Teil 3.1 (Etablierung von Methoden) verwendeten 54 *V. parahaemolyticus* Stämme, welche in Deutschland isoliert wurden. Die Isolate stammen aus der Umwelt (Nord- und Ostsee), dem Lebensmittelhandel und aus der Primärproduktion von Nordseemuscheln.

<b>Stamm</b>	<b>Genotyp</b>	<b>Jahr</b>	<b>Quelle</b>	<b>Isoliert aus</b>	<b>Land</b>	<b>Herkunft</b>
VN-0199	<i>tdh<sup>-</sup>/trh<sup>-</sup></i>	2011	Lebensmittel	Muschel	Deutschland	BfR
VN-0200	<i>tdh<sup>-</sup>/trh<sup>-</sup></i>	2011	Lebensmittel	Muschel	Deutschland	BfR
VN-0202	<i>tdh<sup>-</sup>/trh<sup>-</sup></i>	2011	Lebensmittel	Garnele	Deutschland	BfR
VN-0286	<i>tdh<sup>+</sup>/trh<sup>-</sup></i>	2011	Lebensmittel	Muschel	Deutschland	BfR
VN-0289	<i>tdh<sup>-</sup>/trh<sup>-</sup></i>	2009	Lebensmittel	Garnele	Deutschland	BfR
VN-0290	<i>tdh<sup>-</sup>/trh<sup>-</sup></i>	2011	Primärproduktion*	Fisch	Deutschland	BfR
VN-0291	<i>tdh<sup>-</sup>/trh<sup>-</sup></i>	2011	Primärproduktion*	Muschel	Deutschland	BfR
VN-0293	<i>tdh<sup>-</sup>/trh<sup>+</sup></i>	2011	Primärproduktion*	Muschel	Deutschland	BfR
VN-0294	<i>tdh<sup>-</sup>/trh<sup>-</sup></i>	2011	Primärproduktion*	Muschel	Deutschland	BfR
VN-0295	<i>tdh<sup>-</sup>/trh<sup>+</sup></i>	2012	Lebensmittel	Fisch	Deutschland	BfR
VN-0296	<i>tdh<sup>-</sup>/trh<sup>+</sup></i>	2012	Lebensmittel	Muschel	Deutschland	BfR
VN-3102	<i>tdh<sup>-</sup>/trh<sup>-</sup></i>	2011	Umwelt	Plankton	Deutschland	AWI
VN-3103	<i>tdh<sup>-</sup>/trh<sup>-</sup></i>	2011	Umwelt	Plankton	Deutschland	AWI
VN-3109	<i>tdh<sup>-</sup>/trh<sup>-</sup></i>	2011	Umwelt	Wasser	Dänemark	AWI
VN-3122	<i>tdh<sup>-</sup>/trh<sup>-</sup></i>	2011	Umwelt	Plankton	Dänemark	AWI
VN-3143	<i>tdh<sup>-</sup>/trh<sup>-</sup></i>	2011	Umwelt	Plankton	Deutschland	AWI
VN-3144	<i>tdh<sup>-</sup>/trh<sup>-</sup></i>	2011	Umwelt	Sediment	Deutschland	AWI
VN-3149	<i>tdh<sup>-</sup>/trh<sup>-</sup></i>	2011	Umwelt	Sediment	Deutschland	AWI
VN-3160	<i>tdh<sup>-</sup>/trh<sup>-</sup></i>	2011	Umwelt	Plankton	Deutschland	AWI
VN-3164	<i>tdh<sup>-</sup>/trh<sup>-</sup></i>	2011	Umwelt	Sediment	Deutschland	AWI
VN-5002	<i>tdh<sup>-</sup>/trh<sup>-</sup></i>	2011	Lebensmittel	Muschel	Deutschland	IFH
VN-5051	<i>tdh<sup>-</sup>/trh<sup>-</sup></i>	2011	Lebensmittel	Muschel	Niederlande	IFH
VN-5052	<i>tdh<sup>-</sup>/trh<sup>-</sup></i>	2011	Lebensmittel	Muschel	unbekannt	IFH
VN-5055	<i>tdh<sup>-</sup>/trh<sup>-</sup></i>	2011	Lebensmittel	Muschel	Dänemark	IFH
VN-5067	<i>tdh<sup>-</sup>/trh<sup>-</sup></i>	2011	Lebensmittel	Garnele	Indonesien	IFH
VN-5074	<i>tdh<sup>-</sup>/trh<sup>-</sup></i>	2011	Lebensmittel	Garnele	Bangladesch	IFH
VN-5077	<i>tdh<sup>-</sup>/trh<sup>-</sup></i>	2011	Lebensmittel	Garnele	Thailand	IFH
VN-5084	<i>tdh<sup>-</sup>/trh<sup>-</sup></i>	2011	Lebensmittel	Scampi	Thailand	IFH
VN-5090	<i>tdh<sup>-</sup>/trh<sup>-</sup></i>	2011	Lebensmittel	Garnele	Thailand	IFH

Stamm	Genotyp	Jahr	Quelle	Isoliert aus	Land	Herkunft
VN-5097	<i>tdh<sup>-</sup>/trh<sup>-</sup></i>	2011	Lebensmittel	Garnele	Thailand	IFH
VN-5104	<i>tdh<sup>-</sup>/trh<sup>-</sup></i>	2011	Lebensmittel	Scampi	Thailand	IFH
VN-5110	<i>tdh<sup>-</sup>/trh<sup>-</sup></i>	2011	Lebensmittel	Garnele	China	IFH
VN-5111	<i>tdh<sup>-</sup>/trh<sup>-</sup></i>	2011	Lebensmittel	Garnele	Vietnam	IFH
VN-5112	<i>tdh<sup>-</sup>/trh<sup>-</sup></i>	2011	Lebensmittel	Garnele	Thailand	IFH
VN-5118	<i>tdh<sup>-</sup>/trh<sup>-</sup></i>	2011	Lebensmittel	Garnele	Indonesien	IFH
VN-5119	<i>tdh<sup>-</sup>/trh<sup>-</sup></i>	2011	Lebensmittel	Garnele	Ecuador	IFH
VN-5120	<i>tdh<sup>-</sup>/trh<sup>-</sup></i>	2011	Lebensmittel	Garnele	Bangladesch	IFH
VN-5131	<i>tdh<sup>-</sup>/trh<sup>-</sup></i>	2011	Umwelt	Wasser	Deutschland	IFH
VN-5189	<i>tdh<sup>-</sup>/trh<sup>+</sup></i>	2011	Umwelt	Wasser	Deutschland	IFH
VN-5208	<i>tdh<sup>-</sup>/trh<sup>-</sup></i>	2011	Lebensmittel	Krabbe	Vietnam	IFH
VN-5247	<i>tdh<sup>-</sup>/trh<sup>-</sup></i>	2011	Lebensmittel	Muschel	Nordostatlantik	IFH
VN-5262	<i>tdh<sup>-</sup>/trh<sup>-</sup></i>	2011	Lebensmittel	Muschel	Italien	IFH
VN-10003	<i>tdh<sup>-</sup>/trh<sup>-</sup></i>	2011	Primärproduktion*	Muschel	Deutschland	LAVES
VN-10006	<i>tdh<sup>-</sup>/trh<sup>-</sup></i>	2011	Primärproduktion*	Muschel	Deutschland	LAVES
VN-10008	<i>tdh<sup>-</sup>/trh<sup>-</sup></i>	2011	Primärproduktion*	Muschel	Deutschland	LAVES
VN-10014	<i>tdh<sup>-</sup>/trh<sup>-</sup></i>	2011	Primärproduktion*	Muschel	Deutschland	LAVES
VN-10018	<i>tdh<sup>-</sup>/trh<sup>-</sup></i>	2011	Primärproduktion*	Muschel	Deutschland	LAVES
VN-10022	<i>tdh<sup>-</sup>/trh<sup>-</sup></i>	2011	Primärproduktion*	Muschel	Deutschland	LAVES
VN-10027	<i>tdh<sup>-</sup>/trh<sup>-</sup></i>	2011	Primärproduktion*	Muschel	Deutschland	LAVES
VN-10052	<i>tdh<sup>-</sup>/trh<sup>-</sup></i>	2011	Primärproduktion*	Muschel	Deutschland	LAVES
VN-10058	<i>tdh<sup>-</sup>/trh<sup>-</sup></i>	2011	Primärproduktion*	Muschel	Deutschland	LAVES
VN-10074	<i>tdh<sup>-</sup>/trh<sup>-</sup></i>	2011	Primärproduktion*	Muschel	Deutschland	LAVES
VN-10078	<i>tdh<sup>-</sup>/trh<sup>-</sup></i>	2011	Primärproduktion*	Muschel	Deutschland	LAVES
VN-10082	<i>tdh<sup>-</sup>/trh<sup>-</sup></i>	2011	Primärproduktion*	Muschel	Deutschland	LAVES

\*Muschelzuchten im Wattenmeer an der deutschen Nordseeküste

AWI: Alfred Wegener Institut, Helgoland, Deutschland;

BfR: Bundesinstitut für Risikobewertung, Berlin, Deutschland;

IFH: Institut für Lebensmittelhygiene, Fachbereich Veterinärmedizin, Freie Universität Berlin, Deutschland;

LAVES: Niedersächsisches Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, Cuxhaven, Deutschland

**Tabelle 1.3:** Liste der im Teil 3.3 (Charakterisierung von *trh* positiven *V. parahaemolyticus* Stämmen) verwendeten *V. parahaemolyticus* Stämme.

Stamm	Genotyp	Jahr	Quelle	Isoliert aus	Land	Herkunft
VN-0024	<i>tdh</i> <sup>+</sup> / <i>trh</i> <sup>+</sup>	2006	Ringversuch	unbekannt	unbekannt	CEFAS
VN-0028**	<i>tdh</i> <sup>-</sup> / <i>trh</i> <sup>+</sup>	1995	Klinisch	Fäzes	Deutschland <sup>1)</sup>	BfR
VN-0029	<i>tdh</i> <sup>-</sup> / <i>trh</i> <sup>+</sup>	1995	Klinisch	Fäzes	Deutschland	BfR
VN-0030	<i>tdh</i> <sup>-</sup> / <i>trh</i> <sup>+</sup>	1999	Umwelt	Wasser	Deutschland	BfR
VN-0038	<i>tdh</i> <sup>+</sup> / <i>trh</i> <sup>+</sup>	2007	Klinisch	Fäzes	Peru	BfR
VN-0045	<i>tdh</i> <sup>+</sup> / <i>trh</i> <sup>+</sup>	1988	Klinisch	Fäzes	USA	BfR
VN-0046	<i>tdh</i> <sup>+</sup> / <i>trh</i> <sup>+</sup>	1994	Klinisch	Fäzes	USA	BfR
VN-0049	<i>tdh</i> <sup>-</sup> / <i>trh</i> <sup>+</sup>	1991	Klinisch	Fäzes	Thailand	BfR
VN-0050	<i>tdh</i> <sup>+</sup> / <i>trh</i> <sup>+</sup>	1994	Klinisch	Fäzes	Thailand	BfR
VN-0053	<i>tdh</i> <sup>-</sup> / <i>trh</i> <sup>+</sup>	1999	Umwelt	Fisch	Indonesien	BfR
VN-0055	<i>tdh</i> <sup>+</sup> / <i>trh</i> <sup>+</sup>	1999	Umwelt	Auster	USA	BfR
VN-0057	<i>tdh</i> <sup>+</sup> / <i>trh</i> <sup>+</sup>	1999	Umwelt	Auster	USA	BfR
VN-0058	<i>tdh</i> <sup>+</sup> / <i>trh</i> <sup>+</sup>	1999	Umwelt	Auster	USA	BfR
VN-0061	<i>tdh</i> <sup>-</sup> / <i>trh</i> <sup>+</sup>	2006	Umwelt	Plankton	Spanien	BfR
VN-0070	<i>tdh</i> <sup>-</sup> / <i>trh</i> <sup>+</sup>	1995	Lebensmittel	Garnele	Deutschland <sup>2)</sup>	BfR
VN-0077	<i>tdh</i> <sup>+</sup> / <i>trh</i> <sup>+</sup>	2001	Klinisch	Fäzes	Norwegen	BfR
VN-0084	<i>tdh</i> <sup>-</sup> / <i>trh</i> <sup>+</sup>	2010	Lebensmittel	unbekannt	Großbritannien	BfR
VN-0293	<i>tdh</i> <sup>-</sup> / <i>trh</i> <sup>+</sup>	2011	Primärproduktion*	Muschel	Deutschland	LAVES
VN-0295	<i>tdh</i> <sup>-</sup> / <i>trh</i> <sup>+</sup>	2012	Lebensmittel	Lachs	Deutschland <sup>2)</sup>	BfR
VN-0296	<i>tdh</i> <sup>-</sup> / <i>trh</i> <sup>+</sup>	2012	Lebensmittel	Muschel	Deutschland <sup>2)</sup>	BfR
VN-0393	<i>tdh</i> <sup>-</sup> / <i>trh</i> <sup>+</sup>	1999	Umwelt	Wasser	Deutschland	BfR
VN-0394	<i>tdh</i> <sup>-</sup> / <i>trh</i> <sup>+</sup>	1999	Umwelt	Wasser	Deutschland	BfR
VN-0395	<i>tdh</i> <sup>-</sup> / <i>trh</i> <sup>+</sup>	1999	Umwelt	Wasser	Deutschland	BfR
VN-0396	<i>tdh</i> <sup>-</sup> / <i>trh</i> <sup>+</sup>	1950	Lebensmittel	Fisch	Japan	BfR
VN-2897	<i>tdh</i> <sup>-</sup> / <i>trh</i> <sup>+</sup>	2011	Umwelt	Wasser	Deutschland	AWI
VN-3859	<i>tdh</i> <sup>-</sup> / <i>trh</i> <sup>+</sup>	2002	Umwelt	Auster	Großbritannien	CEFAS
VN-3933	<i>tdh</i> <sup>-</sup> / <i>trh</i> <sup>+</sup>	2011	Umwelt	unbekannt	Deutschland	LAGuS
VN-4016	<i>tdh</i> <sup>-</sup> / <i>trh</i> <sup>+</sup>	2010	Umwelt	unbekannt	Niederlande	AWI
VN-5189	<i>tdh</i> <sup>-</sup> / <i>trh</i> <sup>+</sup>	2011	Umwelt	Wasser	Deutschland	IFH
VN-10300	<i>tdh</i> <sup>-</sup> / <i>trh</i> <sup>+</sup>	2013	Primärproduktion*	Muschel	Deutschland	LAVES

<b>Stamm</b>	<b>Genotyp</b>	<b>Jahr</b>	<b>Quelle</b>	<b>Isoliert aus</b>	<b>Land</b>	<b>Herkunft</b>
Kontrollen						
VN-0022	<i>tdh<sup>-</sup>/trh<sup>-</sup></i>	2010	Lebensmittel	Muschel	Deutschland	BfR
ATCC 43996	<i>tdh<sup>+</sup>/trh<sup>-</sup></i>	1972	Lebensmittel	Muschel	Großbritannien	BfR
RIMD 2210633	<i>tdh<sup>+</sup>/trh<sup>-</sup></i>	1983	Klinisch	Fäzes	Japan	BfR

<sup>1)</sup> vorheriger Aufenthalt in Tansania

<sup>2)</sup> aus dem Ausland importierte Lebensmittel

\* Muschelzuchten im Wattenmeer an der deutschen Nordseeküste

AWI: Alfred Wegener Institut, Helgoland, Deutschland;

BfR: Bundesinstitut für Risikobewertung, Berlin, Deutschland;

CEFAS: Centre for Environment, Fisheries and Aquaculture Science, Weymouth, Großbritannien;

IFH: Institut für Lebensmittelhygiene, Fachbereich Veterinärmedizin, Freie Universität Berlin, Deutschland;

LAGuS: Landesamt für Gesundheit und Soziales, Rostock, Deutschland;

LAVES: Niedersächsisches Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, Cuxhaven, Deutschland

## 2.2 Material

### 2.2.1 Geräte und Verbrauchsmaterial

**Tabelle 2.1:** Liste aller verwendeten Geräte und Verbrauchsmaterialien.

<b>Geräte/Verbrauchsmaterial</b>	<b>Hersteller/ Lieferfirma</b>
Achtkanalpipette, Xplorer, Research Plus	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Bechergläser	Duran Group GmbH, Wertheim, Deutschland
Bio-Photometer	Eppendorf, Köln, Deutschland
Brutschrank, 37°C, KBP 6395	Tritec Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Hannover, Deutschland
Criterion Cell (Gelelektrophoresekammer, vertikal)	BioRad, München, Deutschland
Criterion Precast Gel System	BioRad, München, Deutschland
Eismaschine SN128084	Ziegra, Isernhagen, Deutschland
Erlenmeyerkolben	Duran Group GmbH Wertheim Deutschland
Flüssigkeitsszintillationszähler, LS 6500	Beckmann Coulter, Brea, CA, USA
Geldokumentationssystem Gel iX Imager Intas	Intas, Göttingen, Deutschland
Gelelektrophoresekammer (horizontal) Agagel Mini, Agagel Maxi	Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland
Gelelektrophoresenetzgerät Power Pack P25	Biometra, Göttingen, Deutschland
Halbmikroküvetten	VWR International GmbH, Dresden, Deutschland
Impfösen, Platin Iridium	neoLab Migge Laborbedarf Vertriebs GmbH, Heidelberg, Deutschland
Inkubator, 60°C, Incubat Typ 85	Melag Medizintechnik oHG, Berlin, Deutschland
Kühlschrank, 4°C, KDR 3710/01	Robert Bosch Hausgeräte GmbH, München, Deutschland

Kühlzentrifuge 3K30	Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode am Harz, Deutschland
Laborglasflaschen	Duran Group GmbH, Wertheim, Deutschland
Labor-pH-Meter	Windaus Labortechnik, Clausthal-Zellerfeld, Deutschland
Laborwaage	Sartorius, Göttingen Deutschland
Magnetrührer	IKA-Werke GmbH & CO. KG, Staufen, Deutschland
MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plates für 0,2 ml	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
MicroAmp™ Optical Adhesive Film	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
Mikrotiterplatten mit Deckel	Brand GmbH, Wertheim, Deutschland
Mikrotiterplatten	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Mikrotiterplattenphotometer MRX	Dynatech Laboratories, Inc. Alexandria, VA, USA
Mikrowelle	Privileg, Deutschland
Mikrozentrifuge 5415D	Eppendorf, Köln, Deutschland
MilliQ-Anlage	Millipore, Schwalbach, Deutschland
Nitrocellulose-Membran, supported 0,2 µm (8,5*13,5)cm	BioRad, München, Deutschland
PCR-Cycler	BioRad, München, Deutschland
PCR-Gefäße, 0,2 ml	Kisker Biotech GmbH, Steinfurt, Deutschland
PCR-Werkbank UVC-M-AR	Kisker Biotech GmbH, Steinfurt, Deutschland
Petrischalen, 90mm	Sterilin Ltd. Cambridge England
Pipettenspitzen	Kisker Biotech GmbH Steinfurt Deutschland
Pipettenspitzen ep Dualfilter T.I.P.S.	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Phosphorimager Trio+	GE Healthcare, Freiburg, Deutschland
Photometer LKT	Dr. Bruno Lange GmbH, Berlin, Deutschland

---

Photometer Ultrospec 2000	Pharmacia Biotech (biochrom) Ltd., Cambridge, England
Photometer Nanodrop ND-1000	Thermo Fisher Scientific Messtechnik GmbH, Erlangen, Deutschland
Pipetten, Research, Reference	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Präzisionswaage L610D-F2	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Reaktionsgefäße, 1,5 und 2,0 ml	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Reaktionsgefäße, 15 und 50 ml	TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz
Reagenzröhrchen	Duran Group GmbH, Wertheim, Deutschland
Schüttelinkubator, 37°C, Typ 3033	GFL (Gesellschaft für Labortechnik GmbH), Burgwedel, Deutschland
Sicherheitsbrenner Fireboy	Integra Biosciences GmbH, Fernwald, Deutschland
Spritzen, 2 und 10 ml	Henke-Sass, Wolf GmbH Tuttlingen Deutschland
Sterilfilter 0,2 µm	VWR International GmbH, Dresden, Deutschland
Sterilwerkbank Safe 2020 1.8	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland
Thermomixer MKR10/13	HLC Biotech, HLC by DITABIS AG, Pforzheim, Deutschland
Thermozykler, Mastercycler ep gradient	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Tischzentrifuge 5415C	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Tischzentrifuge 1-15	Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode am Harz, Deutschland
Vielpunktinokulator (6 × 8), 140501	Boekel Scientific, Inc. Feasterville, PA, USA
Vortexer REAX top	Heidolph Instruments GmbH, Schwabach, Deutschland
Wasserbad, 37 °C Haake FS (Typ F423)	PSL Systemtechnik GmbH, Clausthal- Zellerfeld, Deutschland
Wasserbad, 60 °C, Typ 1083	GFL Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel, Deutschland

---

## 2.2.2 Chemikalien, Enzyme und Kits

**Tabelle 2.2:** Liste aller verwendeten Chemikalien, Enzyme und Kits.

<b>Chemikalien</b>	<b>Hersteller/Lieferant</b>
Aceton	Neolab, Heidelberg, Deutschland
Agar-Agar	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ammoniumchlorid (NH <sub>4</sub> Cl)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Bacto-Agar	BD Diagnostics, Heidelberg, Deutschland
Bacto-Pepton	BD Diagnostics, Heidelberg, Deutschland
BamH I	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Bcl I	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Bgl II	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Bromphenolblau (BPB)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Bsp 120 I	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Bsp TI	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Bsp 681	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Caseinpepton (tryptisch verdaut)	Oxoid, Wesel, Deutschland
Chitin (Chitin from shrimp shells, practical grade, powder)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Dinatriumhydrogenphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> * 2H <sub>2</sub> O)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
DNA Probenpuffer (6x)	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
DNA-Marker	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
DNase I, RNase frei	Roche, Penzberg, Deutschland
dNTP Mix (je 2,5 mM)	Bioline, Luckenwalde, Deutschland
Dra I	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
DreamTaq™ DNA-Polymerase	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
DreamTaq™ Puffer (10x) (mit 20 mM MgCl <sub>2</sub> )	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
DyeEx® 2.0 Spin Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
EcoR I	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
EcoR V	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
EDTA (Ethyldiamintetraacetat)	Roth, Karlsruhe, Deutschland

---

E-Mix®	RiNA GmbH, Berlin, Deutschland
Essigsäure 100 % (Eisessig)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol (96%)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethanol, technisch (70%)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethidiumbromid (DNA-Farbstoff)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Fleischextrakt (Liebig)	Georg Fles GmbH, Hamburg, Deutschland
Gallenextrakt (Bile bovine)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
GelRed (DNA-Farbstoff)	Biotium Inc., Hayward, CA, USA
GeneRuler™ 100 bp Plus DNA-Leiter	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Glycerin (99,5 %)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Hefeextrakt	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Herz-Infusions-Medium (HI-Medium)	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
High Fidelity DNA- Polymerase	Roche, Penzberg, Deutschland
High Fidelity PCR-Puffer (5x) (mit dNTPs)	Roche, Penzberg, Deutschland
Hind III	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
HPLC-Wasser	neoLab, Heidelberg, Deutschland
Harnstoff	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumchlorid (KCl)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Merck, Darmstadt, Deutschland
KAP-RPLA „Seiken“ Agglutinationstest	Denka Seiken, Tokio, Japan
Kpn I	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Kristallviolett	Merck, Darmstadt, Deutschland
Lambda DNA/Eco130I (Styl) Marker	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Luria Bertani-Bouillon	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> ; 25 mM)	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
D(-)-Mannitol	Merck, Darmstadt, Deutschland
β-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
MSB-Spin-PCR Iapace® - kit for ultra fast purification and concentration of PCR-fragments	Invitex, Berlin, Deutschland
Natriumacetat	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Nco I	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
NTP-Mix (5 x)	RiNA GmbH, Berlin, Deutschland

---

---

Oligonukleotidprimer	metabion, Martinsried, Deutschland
PEG 4000	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Pepton aus Fleisch	Merck, Darmstadt, Deutschland
peqGOLD Universal-Agarose	PEQLAB, Erlangen, Deutschland
Pst I	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Pvu I	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Restriktionsenzym-Puffer B (Blue)	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Restriktionsenzym-Puffer Unique	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Restriktionsenzym-Puffer R (Red)	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Restriktionsenzym-Puffer O (Orange)	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Restriktionsenzym-Puffer Tango (Yellow)	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Ribonuklease A (RNase A)	Qiagen, Hilden, Deutschland
RNeasy <sup>®</sup> Mini Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
RNAprotect <sup>®</sup> Bacteria reagent	Qiagen, Hilden, Deutschland
RTP <sup>®</sup> Bacteria DNA Mini Kit	Invitek, Berlin, Deutschland
Sac I	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Saccharose	Serva, Heidelberg, Deutschland
Salzsäure (HCl; 37 %)	VWR International, Wien, Österreich
Sma I	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
T4 DNA-Ligase	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
T4 DNA-Ligase-Puffer (10x)	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
TaqMan Universal Master Mix (1 x , mit ROX)	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
T-Mix <sup>®</sup> (10 x)	RiNA GmbH, Berlin, Deutschland
Transkriptionsenzymmik (20x)	RiNA GmbH, Berlin, Deutschland
Transkriptionspuffer (5 x)	RiNA GmbH, Berlin, Deutschland
Translationspuffer (35 %)	RiNA GmbH, Berlin, Deutschland
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Triton X 100	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Xba I	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Xho I	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Zelllysat ( <i>E. coli</i> )	RiNA GmbH, Berlin, Deutschland
Zelllysat (Insekten)	RiNA GmbH, Berlin, Deutschland

---

### 2.2.3 Lösungen und Puffer

**Tabelle 2.3.1:** 100bp-Marker plus (DNA-Größenmarker)

1 kb Leiter (0,5 mg DNA/ml)	10,0 µl
TE-Puffer, 1x	150,0 µl
DNA-Probenpuffer	80,0 µl

**Tabelle 2.3.2:** DNA-Probenpuffer, Gelelektrophorese

Saccharose (steril filtriert)	40,0 %
Bromphenolblau	0,25 %
TE-Puffer (1x)	ad 100,0 ml

**Tabelle 2.3.3:** Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS), 10x, pH 7,4

NaCl	80,0 g
KCl	2,0 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	14,4 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,4 g
Aqua bidest	Ad 1,0 l

**Tabelle 2.3.4:** Tris-EDTA (TE)-Puffer, 10x, pH 8,0

Tris-HCl (1M, pH 8,0)	100 ml
EDTA (0,5M, pH 8,0)	20 ml
Aqua bidest	ad 1,0 l

**Tabelle 2.3.5:** Tris-HCl, 1 M; pH 8,0

Tris	121,14 g
HCl (37%)	ca. 60 ml*
Aqua bidest	ad 1,0 l

\*Einstellung des pH-Werts auf 8,0

**Tabelle 2.3.6:** Tris-Essigsäure-EDTA-Puffer (TAE-Puffer), 50×, pH 8,0

Tris	242,0 g
Eisessig	57,0 ml
EDTA (0,5M, pH 8,0)	100,0 ml
Aqua bidest	ad 1,0 l

## 2.2.4 Nährmedien und –böden

**Tabelle 2.4.1:** Barsikow-Bouillon (BAR-B) mit Zucker; pH 7,4

Pepton	10,0 g
NaCl	5,0 g
Bromthymolblau	0,075 g
Zucker	10,0 g
Aqua bidest	ad 1,0 l

**Tabelle 2.4.2:** Herz-Infusions-Medium (HI-Medium; pH 7,4)

Rinderherzinfusion	10,0 g
Trypton	10,0 g
NaCl	5,0 g
Aqua bidest	ad 1,0 l

**Tabelle 2.4.3:** Luria-Bertani-Medium (LB-Medium; pH 7,0)

Hefeextrakt	5,0 g
Pepton aus Casein	10,0 g
NaCl	10,0 g
Aqua bidest	ad 1,0 l

**Tabelle 2.4.4:** Luria-Bertani-Medium (LB-Medium mit 0,3 M NaCl; pH 7,0)

Hefeextrakt	5,0 g
Pepton aus Casein	10,0 g
NaCl	17,5 g
Aqua bidest	ad 1,0 l

**Tabelle 2.4.5:** Mannit-Pepton-Medium (pH 7,8)

Polypepton	2,0 g
Mannitol	0,5 g
NaCl	5,0 g
Aqua bidest	ad 100,0 ml

**Tabelle 2.4.6:** Chitin-Agar; pH 7,4 (abgeändert nach Holding *et al.* 1971)

Kolloidales Chitin	20,0 g
Bacto-Agar	20,0 g
HI-Medium	ad 1,0 l

**Tabelle 2.4.7:** Columbia-Agar (pH 7,2)

Spezialpepton	4,6 g
Stärke	0,2 g
NaCl	1,0 g
Agar	2,0 g
Aqua bidest.	ad 200,0 ml

**Tabelle 2.4.8:** Columbia-Agar mit gewaschenen Erythrozyten (human, Kaninchen oder Schaf)

Columbia-Agar	240,0 ml
Kanamycin (100 µg/ml)	250 µl
Erythrozyten (8x10 <sup>9</sup> Zellen/ml)	10,0 ml

**Tabelle 2.4.9:** Feuchtagar; pH 7,5

Fleischextrakt	7,0 g
Bacto-Pepton	10,0 g
NaCl	3,0 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 12 H <sub>2</sub> O	2,0 g
Agar	5,0 g
Glucose	1,0 g
Leitungswasser	ad 1,0 l

**Tabelle 2.4.10:** Harnstoff-Dextrose-Schrägagar; pH 6,8

Caseinpepton (tryptisch verdaut)	9,0 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,0 g
Glucose	5,0 g
Kochsalzlösung (gesättigt = 358 g/l)	20,0 ml (7,16 g)
Bromthymolblaulösung (alkoholisch; 1,5 %)	10,0 ml
Agar	10,0 g
Harnstoff (CO(NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> )	10 g
Aqua bidest	ad 1,0 l

**Tabelle 2.4.11:** Luria-Bertani-Agar (LB-Agar); pH 7,2

Agar	2,4 g
Hefeextrakt	1,0 g
Pepton aus Casein	2,0 g
NaCl	2,0 g
Aqua bidest	ad 200,0 ml

**Tabelle 2.4.12:** Magermilch-Agar; pH 7,4 (modifiziert nach Mahoney *et al.* (2010))

Magermilchpulver	4,0 g
Bacto-Agar	20,0 g
HI-Medium	ad 1,0 l

**Tabelle 2.4.13:** Schwärm (+)-Agar; pH 7,4 (nach Jaques *et al.* (2006))

Bacto-Agar	15 g
HI-Medium	1,0 l

**Tabelle 2.4.14:** Schwärm (-)-Agar; pH 7,4 (nach Jaques *et al.* (2006))

Bacto-Agar	20 g
HI-Medium	1,0 l

**Tabelle 2.4.15:** Wagatsuma-Agar; pH 8,0

Agar	5,0 g
Hefeextrakt	1,6 g
Pepton	5,2 g
NaCl	36,4 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,6 g
Mannitol	5,0 g
Humane Erythrozyten	20,0 ml
Aqua bidest	ad 500,0 ml

### 2.2.5 Programme

**Tabelle 2.5:** Liste der zur Auswertung verwendeten Software.

Programm	Hersteller/Autor
ABI PRISM 7500 Software	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
Accelrys Gene (Version 2.5)	Accelrys Ltd., Cambridge, UK
Bionumerics (Version 6.6)	Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgien
Excel	Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA
Lasergene SeqMan (Version 8.1.4)	DNASTAR Inc., Madison, WI, USA
ExpressionSuite	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
MEGA V6.0 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis)	<a href="http://www.megasoftware.net">http://www.megasoftware.net</a> Tamura <i>et al.</i> (2013)
MikroWin für MRX (Version 4.43)	Mikrotek Laborsysteme GmbH, Overath, Deutschland
Nanodrop (Version 3.5.2)	Coleman Technologies Inc., Newton Square, PA, USA

## **2.3 Methoden**

### **2.3.1 Anzucht von Bakterienzellen**

#### **2.3.1.1 Zellanzucht in Einzelkolonien**

Um Einzelkolonien zu erhalten, wurden alle Bakterienstämme aus dem Glycerin-Stock auf Luria-Bertani-Agar (LB-Agar) im Verdünnungsausstrich ausgestrichen und bei 37 °C über Nacht inkubiert.

#### **2.3.1.2 Zellanzucht in Flüssigkultur**

Folgende Medien wurden benutzt: LB-Medium, Mannit-Pepton-Medium und Herz-Infusions-Medium (HI-Medium).

In Abhängigkeit der jeweiligen Methode wurden die Bakterienstämme in unterschiedlichen Medien angezüchtet (s. Ergebnisteil).

Übernachtskulturen wurden üblicherweise in 4 ml LB-Medium im Reagenzglas angesetzt und im 37 °C-Schüttler inkubiert.

#### **2.3.1.3 Herstellung von Glycerin-Stocks**

Eine Übernachtskultur in LB-Medium wurde 1:2 mit GlyB verdünnt und anschließend in einem Kryoröhrchen bei -80 C eingefroren. GlyB bestand zu 80 % aus Glycerin (85 %ig) und zu 20 % aus LB-Medium.

## 2.3.2 Techniken für das Arbeiten mit DNA

### 2.3.2.1 Extraktion chromosomaler DNA aus Bakterienzellen

Um die chromosomale DNA aus Bakterienzellen zu isolieren, wurden die Bakterienstämme zunächst auf LB-Agar für 24 Stunden bei 37 °C angezogen. Mit einer Einzelkolonie wurden 4 ml LB-Medium in einem Reagenzglas angeimpft, welches ebenfalls für 24 Stunden bei 37 °C und 200 rpm inkubiert wurde. Je ein Milliliter der flüssigen Übernachtskultur wurden für die DNA-Extraktion mit dem „Invisorb Spin DNA Extraction Kit“ von Invitex verwendet. Die Extraktion erfolgte nach den Angaben des Herstellers im Protokoll 2b und einem zusätzlichen RNase-Verdau mit Ribonuklease A (RNase A). Der RNase-Verdau erfolgte nach der Bakterienlyse, indem 10,5 U der RNase A zu dem Bakterienlysat gegeben und die Proben für 30 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert wurden. Die Elution der extrahierten DNA erfolgte mit 100 µl HPLC-Wasser, welches zuvor auf 60 °C erwärmt wurde.

### 2.3.2.2 Elektrophoretische Auftrennung von DNA im Agarosegel

Für die Visualisierung der DNA und die Überprüfung ihrer Integrität wurden die DNA-Proben mit DNA-Probenpuffer im Verhältnis 1:2 versetzt und über ein Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Nukleinsäuren wurden mittels Ethidiumbromid (0,5 µg/ml) bzw. GelRed (Verdünnung von 1:10.000) markiert. Hierzu wurden die Farbstoffe direkt bei der Präparation der 1 x TAE-Agarose-Gele (0,8 – 2 %) hinzugegeben. Für die Elektrophorese wurde 1 x TAE-Laufpuffer verwendet. Bei einer konstant angelegten Spannung von 80 Volt (kleines Gel) bis 110 Volt (großes Gel) wurde das Gel je nach erwarteter Fragmentgröße 30 – 60 min laufen gelassen und die aufgetrennte DNA anschließend unter UV-Licht sichtbar gemacht.

### 2.3.2.3 Aufreinigung von PCR-Produkten

Für die Aufreinigung der PCR-Produkte wurde das „MSB-Spin-PCR cleanup kits for ultra fast purification and concentration of PCR fragments“ von Invitex gemäß der Angaben des Herstellers verwendet. Die Elution der PCR-Produkte erfolgte mit 30 – 50 µl HPLC-Wasser.

#### 2.3.2.4 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung der PCR-Produkte wurde von der Firma Eurofins MWG GmbH (Ebersbach, Deutschland) durchgeführt. Für die Sequenzieransätze wurden ca. 10 ng DNA pro 100 bp Fragmentlänge und 15 pmol je eines Primers verwendet. Um ein Gesamtvolumen von 17 µl zu erreichen, wurde der Ansatz mit HPLC-Wasser aufgefüllt.

#### 2.3.2.5 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die DNA-Konzentration und der Reinheitsgrad wurden mittels Nanodrop (PeqLab, Erlangen, Deutschland) spektralphotometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Hierzu wurden jeweils 1,5 µl der DNA-Probe eingesetzt.

#### 2.3.2.6 Methodik der inversen PCR

Da mit den bisher genutzten Primern zur Amplifikation des kompletten *trh*-Gens nicht alle *trh*-Varianten erfasst werden konnten, wurde die Methodik der inversen PCR (Ochman *et al.* 1988) angewandt. Damit können Gensequenzen identifiziert werden, die außerhalb und benachbart zum *trh*-Gen lokalisiert sind. Anhand dieser Gensequenzen wurden neue Primer konstruiert, welche die Amplifikation des gesamten *trh*-Gens ermöglichen.

Zunächst wurde die DNA zweier *V. parahaemolyticus* Stämme in einzelnen Versuchsansätzen mit 18 verschiedenen Restriktionsenzymen (Tabelle 2.6) verdaut. Bei einem Restriktionsverdau werden Nukleinsäuren an definierten Basensequenzen geschnitten, welche von den Restriktionsenzymen spezifisch erkannt werden. Mit der Verwendung vieler verschiedener Restriktionsenzyme wird die Wahrscheinlichkeit erhöht, dass in mindestens einem Ansatz das *trh*-Gen nicht geschnitten wird und somit die unbekannt benachbarten Sequenzen auf einem DNA-Fragment vorliegen. Ein Ansatz mit einem Gesamtvolumen von 60 µl bestand aus 2,5 µl DNA (150 ng/µl), 2 µl Restriktionsenzym, 6 µl Puffer und 49,5 µl Wasser. Je nach verwendetem Restriktionsenzym wurden die Ansätze bei 30 °C, 37 °C bzw. 55 °C über Nacht inkubiert. Um den Restriktionsverdau zu stoppen, wurden die Ansätze für 20 min bei 65 °C erhitzt. Um zu überprüfen, ob der Verdau erfolgreich war, wurde 25 µl eines Ansatzes abgenommen und die DNA in einem 0,8 %igen Agarosegel visualisiert (Abbildung B 1.1). Ein erfolgreicher Restriktionsverdau zeichnet sich durch das Auftreten vieler kleinerer DNA-Fragmente aus,

während sich unverdaute DNA als einzelne distinkte Bande zeigt. Nach der Überprüfung erfolgte eine Religation der einzelnen DNA-Fragmente, um diese in eine Ringform zu bringen. Für DNA-Fragmente mit überhängenden Enden (sticky ends) wurden hierzu 5 µl eines Restriktionsverdau mit 1 µl T4-Ligase, 2 µl Puffer und 12 µl Wasser versetzt und der Ansatz über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Für die Religation von DNA-Fragmenten mit glattem Ende (blunt end) wurde zusätzlich 2 µl PEG 4000 hinzugefügt und der Ansatz zunächst eine Stunde bei 37 °C und anschließend ebenfalls über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Mit den ringförmig geschlossenen DNA-Fragmenten erfolgte eine PCR mit *trh*-spezifischen Primern (s. 1.3.4.1), die an das 5'-Ende und an das 3'-Ende der kodierenden Region binden und ein Produkt aus dem intragenischen Bereich stromaufwärts und stromabwärts des *trh*-Gens bilden.

**Tabelle 2.6:** Liste der verwendeten Restriktionsenzyme für die inverse PCR.  
(Sticky end = s, blunt end = b)

Restriktionsenzym	Schnittstelle
BamH I	s
Eco R I	s
Eco R V	b
Hind III	s
Bgl II	s
Dra I	b
Kpn I	s
Nco I	s
Pst I	s
Pvu I	s
Sac I	s
Sma I	b
Xba I	s
Xho I	s
Bsp 120 I	s
Bsp TI	s
Bsp 681	b
Bcl I	s

## 2.3.3 Techniken für das Arbeiten mit RNA

### 2.3.3.1 Extraktion der RNA aus Bakterienzellen

200-500 µl Bakterienkultur wurde mit RNA Protect Bacteria Reagent (Qiagen, Hilden, Deutschland) versetzt. Es wurde gemäß den Angaben des Herstellers fortgeföhren und die Proben anschließend bei –80 °C eingefroren. Die Extraktion der RNA erfolgte mit dem RNeasy Minikit (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach dem Protokoll des Herstellers.

### 2.3.3.2 DNase-Verdau der RNA

Um reine RNA zu erhalten, wurde die DNA mittels RNase free DNase Set (Qiagen, Hilden, Deutschland) verdaut. Das Reaktionsvolumen von 50 µl setzte sich aus folgenden Anteilen zusammen: 2,5 % 10 x DNase Puffer, 2 % DNase, 15,5 % RNase-freies Wasser und 5 % extrahiertes RNA-DNA-Gemisch. Die Inkubation der Reaktionsansätze erfolgte bei 37 °C für 1,5 Stunden unter moderatem Schütteln.

### 2.3.3.3 Aufreinigung der RNA

Die Aufreinigung der RNA erfolgte über eine Ethanol-Präzipitation. Hierzu wurden 5 µl Natriumacetat (3 M, pH 5,2) und 150 µl eisgekühltes 96 %iges Ethanol zu den Proben gegeben und diese über Nacht bei –20 °C inkubiert. Anschließend wurde die RNA bei 14.000 x g für 30 min bei 10 °C pelletiert und mit 75 %igem Ethanol gewaschen. Um das Ethanol vollständig zu entfernen, wurden die RNA-Pellets in einer Speedvac getrocknet und anschließend in 20 µl RNase-freiem Wasser gelöst. Darauf folgte eine Überprüfung der aufgereinigten RNA auf DNA-Reste mittels Real-Time PCR (s. 2.3.4.6).

### 2.3.3.4 Bestimmung der RNA-Konzentration

Der RNA-Gehalt der Proben wurde spektralphotometrisch mittels Nanodrop (ND-1000, PEQLAB, Erlangen, Deutschland) bei einer Wellenlänge von 260/280 nm bestimmt. Bis zur weiteren Verwendung wurde die RNA bei –80 °C gelagert.

### 2.3.3.5 Synthese der cDNA

Vor der cDNA-Synthese wurde die RNA zunächst einheitlich auf 50 ng/µl verdünnt. Die Reverse Transkription erfolgte mit High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Life Technologies, Darmstadt, Deutschland). Ein Reaktionsansatz mit einem Volumen von 20 µl enthielt 1 x Random Primers, 50 U Reverse Transkriptase und 250 ng RNA. Die Reaktion erfolgte im Thermozykler Mastercycler EP Gradient (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) unter den vorgegebenen Bedingungen des Herstellers.

## 2.3.4 Polymerasekettenreaktion (PCR)

### 2.3.4.1 PCR zum Spezies- und Toxinnachweis

Der speziesspezifische Nachweis der *V. parahaemolyticus* Stämme erfolgte, neben der biochemischen Bestimmung über die „bunte Reihe“, mittels PCR nach Bauer *et al.* (2007). Als Target zur Speziesidentifikation wurde hierbei das *toxR*-Gen genutzt. Zusätzlich wurden die Toxine *tdh* und *trh* über die Amplifikation von internen Gensequenzen nach Tada *et al.* (1992) nachgewiesen. Die verwendeten Primer sind in Tabelle 2.7 aufgelistet. Ein Reaktionsansatz der Multiplex-PCR mit 25 µl Gesamtvolumen enthielt 1 µl DNA (10 ng), 1 x PCR Puffer (mit 2 mM MgCl<sub>2</sub>), 1 mM MgCl<sub>2</sub> zusätzlich, 0,2 mM von jedem dNTP, 0,3 mM ToxR-Primer, 0,3 mM Tdh-Primer, 0,5 mM Trh-Primer und 1,5 U Dream Taq DNA Polymerase. Folgende Reaktionsbedingungen wurden gewählt: eine initiale Hitzedenaturierung bei 94 °C für 4 min, 30 Zyklen à 94 °C für 30 s, 62 °C für 1 min und 72°C für 1 min, und eine finale Elongation bei 72 °C für 7 min.

**Tabelle 2.7:** Liste der verwendeten Primer zum Spezies- und Toxinnachweis für *V. parahaemolyticus* (nach Tada *et al.* 1992 und Bauer *et al.* 2007).

Primer	Primersequenz 5' → 3'	Amplifikatgröße (bp)	Referenz
UtoxF forward	GASTTTGTTTGGCGYGARCAAGGTT	297	Bauer <i>et al.</i> (2007)
VptoxR reverse	GGTTCAACGATTGCGTCAGAAG		
Trh forward	GGCTCAAAATGGTTAAGCG	251	Tada <i>et al.</i> (1992)
Trh reverse	CATTTCCGCTCTCATATGC		
Tdh forward	CCACTACCACTCTCATATGC	425	Tada <i>et al.</i> (1992)
Tdh reverse	CCATCTGTCCCTTTTCCTGC		

#### 2.3.4.2 Inverse PCR

Anhand von *trh*-Gensequenzen aus der Datenbank (NCBI) wurden konservierte Regionen am Anfang und am Ende des *trh*-Gens identifiziert und als Basis für das Primerdesign der *trh*-revgen1-Primer verwendet. Dieses Primerpaar wurde so konzipiert, dass die Bindungsstelle des Forward Primers (*Trh\_fw\_revgen1*) am Ende des Gens lokalisiert war (Forward Primerbindungsstelle auf dem (+)-Strang: 5'-Ende an Position 491, 3'-Ende an Position 508) und die Bindungsstelle des Reverse Primers (*Trh\_rv\_revgen1*) in der Anfangsregion des Gens (Reverse Primerbindungsstelle auf dem (-)-Strang: 5'-Ende an Position 113, 3'-Ende an Position 95) (Tabelle 2.8). Bei einem ringförmig geschlossenen DNA-Fragment mit komplettem *trh*-Gen können somit die benachbarten stromaufwärts und stromabwärts gelegenen Regionen in einer PCR amplifiziert und anschließend sequenziert werden.

Ein PCR-Reaktionsansatz mit 25 µl Gesamtvolumen enthielt 5 µl unbehandelten Ligationsansatz mit DNA, 1 x PCR Puffer (2 mM MgCl<sub>2</sub>), 1 µl MgCl<sub>2</sub> (1 mM) extra, 0,2 mM von jedem dNTP, 0,2 mM von jedem Primer und 1,5 U Dream Taq DNA Polymerase. Die PCR-Reaktionen wurden im Thermozykler Mastercycler EP Gradient (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) durchgeführt. Nach einer initialen Hitzedenaturierung von 94 °C für 4 min folgten 30 PCR-Zyklen mit einem Denaturierungsschritt bei 94 °C für 30 s, einem Annealingschritt bei 58 °C für 1 min und einem Elongationsschritt bei 72 °C für 2,5 min. Die Reaktion wurde mit einer finalen Elongation bei 72 °C für 5 min beendet. Um zu überprüfen in welchen Ligationsansätzen eine Amplifikation der benachbarten *trh*-Genregion stattgefunden hat, wurde eine Gel-Elektrophorese in einem 0,8 % igem Agarosegel durchgeführt, wie in 1.3.2.2 beschrieben.

Alle PCR-Ansätze, welche eine klare distinkte Bande zeigten, wurden mithilfe der *trh*-spezifischen Primer sequenziert (siehe Abbildung B 1.2). Die Sequenzen wurden als Vorlage für die Konstruktion der Primer verwendet, welche benachbart, jedoch nicht innerhalb des *trh*-Gens liegen und somit zur Amplifikation des gesamten Gens geeignet sind.

**Tabelle 2.8:** Verwendete Primer zur Amplifikation der benachbarten *trh*-Genregion.

Primername	Primersequenz 5' → 3'
Trh_fw_revgen1	TCGAR <sup>R</sup> GCATATGAGAGCGG
Trh_rv_revgen1	GGAGAAGGAAAAGGTAT <sup>N</sup> GATG

### 2.3.4.3 Amplifikation und Sequenzierung des *trh*-Gens

Für die Amplifikation des gesamten *trh*-Gens wurden verschiedene Primerkombinationen verwendet, welche in Tabelle 2.9 aufgelistet sind. Ein PCR-Reaktionsansatz mit 25 µl Gesamtvolumen enthielt 1 µl DNA (10 ng), 1 x PCR Puffer (2 mM MgCl<sub>2</sub>), 0,2 mM von jedem dNTP, 0,2 mM von jedem Primer und 1,5 U Dream Taq DNA Polymerase. Die Reaktionsbedingungen waren wie folgend gewählt: initiale Hitzedenaturierung bei 95 °C für 3 min, 30 Zyklen à 94 °C für 30 s, 54 °C für 30 s und 72 °C für 1 min, und eine finale Elongation bei 72 °C für 5 min. Für die Sequenzierung des *trh*-Gens wurde zusätzlich das *trh*-spezifische interne Primerpaar von Tada *et al.* (1992) verwendet (siehe Tabelle 2.7).

**Tabelle 2.9:** Liste der verwendeten Primer zur Amplifikation des gesamten *trh*-Gens.

Primer (forward)	Primersequenz 5' → 3'	Referenz
VPtrhx1_F	CGCATTTTTTCACCATTTCCC	Diese Arbeit
VPtrhx4_F	GGCCTCGCATTTTTTCACC	Diese Arbeit
Primer (reverse)	Primersequenz 5' → 3'	Referenz
VPtrhx1_R	TTCCCTCGAATTACGCAAC	Diese Arbeit
VPtrhx4_R	ACCTTCTGATTTAGTTCCTCG	Diese Arbeit
IS-ele-Rev1	GTAATGGCTAAGTCGCTGAAC	Diese Arbeit

#### 2.3.4.4 Multilokus-Sequenz-Typisierung (MLST)

Die MLST-Analyse wurde durchgeführt wie bereits von Gonzalez-Escalona *et al.* (2008) beschrieben. Bei dieser Methode werden Teilsequenzen von sieben Haushaltsgenen ermittelt und miteinander verglichen, um auf dieser Grundlage eine Aussage über den Verwandtschaftsgrad verschiedener *V. parahaemolyticus* Stämme zu treffen. Dazu wurden interne Fragmente folgender Haushaltsgene in einer PCR-Reaktion amplifiziert: *recA* (RecA Protein), *dnaE* (DNA Polymerase III, Alpha Untereinheit), *gyrB* (DNA Gyrase, Untereinheit B), *dtdS* (Threonine Dehydrogenase), *pntA* (Transhydrogenase Alpha Untereinheit), *pyrC* (Dihydroorotase) and *tnaA* (Tryptophanase). Verwendete Primer und PCR-Reaktionsbedingungen sind auf der *V. parahaemolyticus* MLST Webseite (<http://pubmlst.org/vparahaemolyticus/info/protocol.shtml>) aufgeführt. Die PCR-Produkte wurden aufgereinigt und sequenziert wie zuvor beschrieben. Die erhaltenen Teilsequenzen wurden mit abgelegten Teilsequenzen in der *V. parahaemolyticus* PubMLST Datenbank verglichen, um die verschiedenen Allele der sieben Haushaltsgene und den Sequenztyp (ST) zu bestimmen. Für neue Allele, welche noch nicht in der Datenbank abgelegt waren, wurden über den Kurator neue Nummern und entsprechend neue Sequenztypen zugewiesen. Die phylogenetische Analyse der MLST-Sequenzen erfolgte mit der Software MEGA 6.0 (Tamura *et al.* 2013). Für die Abschätzung der genetischen Divergenz wurde ein „Minimum Evolution Tree“ (ME) der konkatenierten MLST-Sequenzen mithilfe des Kimura-2-Parameter-Modells konstruiert.

#### 2.3.4.5 Virulotyping

Zur Abschätzung des pathogenen Potentials der *V. parahaemolyticus* Stämme wurden diese auf bestimmte potentielle Virulenzgene mittels PCR-Nachweis untersucht. Die Zielgene mit den dazugehörigen Primersequenzen wurden aus verschiedenen Publikationen übernommen (siehe Tabelle 2.10) bzw. einige Zielgene wurden von der Website VFDB-comparative pathogenomic organization of Vibrio ([http://www.mgc.ac.cn/cgi-bin/VFs/comp\\_graph.cgi?Genus=Vibrio&mode=0](http://www.mgc.ac.cn/cgi-bin/VFs/comp_graph.cgi?Genus=Vibrio&mode=0)) ausgewählt und die passenden Primer selbst konstruiert. Die Website VFDB enthält eine integrierte Datenbank bekannter Virulenzfaktoren zahlreicher pathogener Bakterien. Insgesamt wurde die Anwesenheit von 31 potentiellen Virulenzgenen im Genom der *V. parahaemolyticus* Stämme getestet. Die verwendeten Primersequenzen sowie die dazu gehörigen Annealingtemperaturen und

Amplifikatgrößen sind in Tabelle 2.10 aufgelistet. Die Zusammensetzung eines Reaktionsansatzes war wie folgt: 25 µl Gesamtvolumen enthielt 1 µl DNA (10 ng), 1 x PCR Puffer (mit 2 mM MgCl<sub>2</sub>), 1 mM MgCl<sub>2</sub> zusätzlich, 0,2 mM von jedem dNTP, 0,5 mM Forward- und Reverse Primer, 1,5 U Dream Taq DNA Polymerase und HPLC-Wasser. Folgende Reaktionsbedingungen wurden gewählt: eine initiale Hitzedenaturierung bei 95 °C für 3 min, 30 Zyklen à 94 °C für 30 s, 50-68 °C für 30 s und 72°C für 1 min, und eine finale Elongation bei 72 °C für 5 min. In einer weiteren PCR wurde die genetische Distanz zwischen dem *trh*-Gen und dem zum Urease Gencluster gehörenden Strukturgen *ureC* analysiert. Die PCR wurde mit kleinen Abänderungen wie bei Park *et al.* (2000) beschrieben durchgeführt. Der PCR-Ansatz mit einem 50 µl Volumen setzte sich aus 1 x Long PCR Puffer mit 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM von jedem dNTP, 0,5 µM von jedem Primer und 1,5 U Long PCR Enzyme Mix. Die Reaktionsbedingungen waren wie folgt: eine initiale Hitzedenaturierung bei 94 °C für 3 min, 30 Zyklen à 98 °C für 20 s, 53 °C für 20 s und 68 °C für 7 min, und eine finale Elongation bei 68 °C für 10 min.

**Tabelle 2.10:** Liste der Zielgene, PCR-Primer, Amplifikatgrößen und Annealingtemperaturen für das Virulotyping.

Gentarget (putative Funktion)	Primer	Primersequenz 5' → 3'	Ampli- fikat- größe (bp)	Anneal. Temp. (°C)	Referenz
<i>trh</i> (Hämolysin)	Trh-forward Trh-reverse	GGCTCAAATGGTTAAGCG CATTCCGCTCTCATATGC	251	62	Tada <i>et al.</i> 1992
<i>tdh</i> (Hämolysin)	Tdh-forward Tdh-reverse	CCACTACCACTCTCATATGC CCATCTGTCCCTTTCTGC	425	62	Tada <i>et al.</i> 1992
<i>vscP</i> (T3SS1)	VP1670F VP1670R	ACCGATTACTCAAGGCGATG TACGTTGTTGGCGTGATTGT	392	60	Noriea <i>et al.</i> 2010
<i>vscC2</i> (T3SS2α)	VPA1339F VPA1339R	GATTCGCGGAACTCAAGAAG CTTGCCGAGATCAACGTCA	343	60	Noriea <i>et al.</i> 2010
<i>vscS2</i> (T3SS2α)	VPA1335F VPA1335R	ATGTAACGGCGGCTAGCTTA CAAAGTGTGTCTAGTAGCACCA	174	60	Noriea <i>et al.</i> 2010
<i>vopB2</i> (T3SS2α)	VPA1362F VPA1362R	CTGCAGGTATCGCATCTTCA TTAGAACCAACCGACGAAGC	250	60	Noriea <i>et al.</i> 2010
<i>vopT</i> (T3SS2α)	VPA1327F VPA1327R	TGGCGAAAGAGCCATTAGAT TCAACTCCAATTTCGCCTTC	97	60	Noriea <i>et al.</i> 2010
<i>vscC2</i> (T3SS2β)	Beta_vscC2_F Beta_vscC2_R	GTACTTTGCTGTCTAACC CTTACTCTTAACTCCGACG	1404	60	Noriea <i>et al.</i> 2010
<i>vscS2</i> (T3SS2β)	Beta_vscS2_F Beta_vscS2_R	TTGATGTTGTTTCGGCTAGC CCACCGCCGAACTCGGCTAACAAG	184	60	Noriea <i>et al.</i> 2010
<i>vopB2</i> (T3SS2β)	Beta_vopB2_F Beta_vopB2_R	GAGCCTGTTGCTCTATGGAGCCAGG CGACACAGAACGCAATGCTTGCTCG	942	60	Noriea <i>et al.</i> 2010
<i>vopC</i> (T3SS2β)	Beta_vopC_F Beta_vopC_R	AACCAACTTGCGACTAAATC TCCCACAGTTTTTCTGCAC	594	60	Noriea <i>et al.</i> 2010
VPal-1 (genomische Insel)	LVPC0387F LVPC0387R	CTAACTCTGCCGATGCTGAC GACCTGCCGTGCCAATAAG	690	58	Xiao <i>et al.</i> 2011
VPal-2 (genomische Insel)	LVPC0643F LVPC0643R	AGCGTCTTGAGTTACCTAATGC CAGTGGAATAGTGCGAATTGAAC	737	58	Xiao <i>et al.</i> 2011
VPal-3 (genomische Insel)	LVPC1083F LVPC1083R	GGCTTCTTCGGTTAGTATGTCTC ATGCTGGCTTCTGATATGTTCTC	1010	68	Xiao <i>et al.</i> 2011
VPal-4 (genomische Insel)	PVP2137F PVP2137R	CAAGCAATACAACGCAAGGAAC GGTGGCAGGTTCAACATATCTC	350	58	Xiao <i>et al.</i> 2011
VPal-5 (genomische Insel)	PVP2905F PVP2905R	GCCATCGCCCAGCAAATATAG CTCCACAGCCTCATCTACATTG	400	58	Xiao <i>et al.</i> 2011

VPaI-6 (genomische Insel)	LVPCA1262F LVPCA1262R	GGACCTAACGGAGAACATTCATC CATTGGCGGAGCGAATAAGG	661	58	Xiao <i>et al.</i> 2011
<i>ureC</i> (Urease)	LVPCRPI11F LVPCRPI11R	TCTACGGCGAAGAGGTCAAG TCAACATATCCAAGTGCTCATCC	837	54	Xiao <i>et al.</i> 2011
<i>Vp1401</i> (T6SS)	LVPC1401F LVPC1401R	GCACGCCACTGAAGTTCTTG AACGACAGATTGAGCACTTGAAG	1057	58	Xiao <i>et al.</i> 2011
<i>Vp1390</i> (T6SS)	VP1390-F VP1390-R	TACCATCAGAGGATACAACC AACAATGAGAACATCAAACA	262	50	Chao <i>et al.</i> 2010
<i>Vp1405</i> (T6SS)	VP1405-F VP1405-R	AACCCAAGAAATATCCGCC TCACCCATTCAAATACCGCC	282	56	Chao <i>et al.</i> 2010
<i>Vp1409</i> (T6SS)	VP1409-F VP1409-R	TGTTGCTTTCTATTGCGAC CCATAACGACTTTTCTTTC	869	58	Chao <i>et al.</i> 2010
<i>Vp0950</i> (Biofilm )	VP0950-F VP0950-R	GCCAAACTTCTCAAACAACA ATGAAACGCAATTTACCATC	298	50	Chao <i>et al.</i> 2010
<i>Vp0952</i> (Biofilm )	VP0952-F VP0952-R	TATGATGGTGTGGTGC TGTTTTCTGAGCGTTTC	276	50	Chao <i>et al.</i> 2010
<i>Vp0962</i> (Biofilm )	VP0962-F VP0962-R	GACCAAGACCCAGTGAGA GGTAAAGCCAGCAAAGTT	358	50	Chao <i>et al.</i> 2010
<i>VP0394</i> (MTase)	MTase-F MTase-R	GTCTTGTCGAATAGAACTCTGA TAAGCTCCAAAATCCATACG	683	58	Wang <i>et al.</i> 2006
<i>trh-ureC</i>	P84-F URE6-R	CATTTCCGCTCTCATATGC ATGCTGGAATGATGTTAGGT	7945	53	Park <i>et al.</i> 2000
<i>VPA140</i> (capsular polysacch. <i>cpsA</i> )	VPA1403-F VPA1403-R	GCCAACGAGATTCAAACCAC GATAGCAAGCAGGATTGGTG	420	58	Diese Arbeit
<i>hutA</i> (heme receptor)	VPA0882-F VPA0882-R	CGTTCATTA ACTCTGCTCGC CCGTTGTAAGACTGCTTTCC	433	58	Diese Arbeit
<i>mshD</i> (putative MSHA pilin)	VP2695-F VP2695-R	GCGTGGTTTTGATGAGAACAG TCAGTGTCAGAGTTGAGTG	368	58	Diese Arbeit
<i>hutR</i> (heme receptor)	VPA1466-F VPA1466-R	TGAACAAAAGGGCGAACAG GCTTTCCGTATCACCAGAAC	424	58	Diese Arbeit
<i>acfD</i> (accessory colonization factor D)	VPA1376-F VPA1376-R	GACGCACAAAACGTTCAAAG CCCCTCCATTCCAATAAATC	436	56	Diese Arbeit

## 2.3.4.6 Real-Time PCR

Zur Detektion der *V. parahaemolyticus* Hämolyisin-Varianten *tdh1*, *tdh2*, *trh1* und *trh2* wurde eine Real-Time Multiplex-PCR nach Messelhäusser *et al.* (2010) durchgeführt. Verwendete Sonden und Primer sind in Tabelle 2.11 aufgelistet. Ein Reaktionsansatz mit einem Gesamtvolumen von 25 µl beinhaltete 2 ng chromosomale DNA, 12,5 µl 1 x TaqMan Universal Master Mix (mit ROX) (Applied Biosystems), 0,25 µM von jedem Primer, 0,2 µM von jeder Sonde und HPLC-Wasser. Die Reaktion erfolgte im ABI PRISM 7500 (Applied Biosystems) unter folgenden Bedingungen: initiale Hitzedenaturierung bei 95 °C für 15 min, gefolgt von 40 Zyklen mit einem Denaturierungsschritt bei 95 °C für 10 s und einem Elongationsschritt bei 55 °C für 60 s.

**Tabelle 2.11:** Liste der verwendeten Primer und TaqMan-Sonden für die Real-Time PCR nach Messelhäusser *et al.* (2010) zur Detektion der Virulenzgene *tdh1*, *tdh2*, *trh1* und *trh2*.

Primer/Sonde	Gen	Primersequenz 5' → 3'
VP_trh1_fw		AAAAGCGTTCACGGTCAATC
VP_trh1_re	<i>trh1</i>	CCAGAAAGAGCAGCCATTGT
VP_trh1_S		<b>CY5-TCACGACTTCAGGCTCAAAA-BHQ-2</b>
VP_trh2_fw		CCCCAGTTAAGGCAATTGTG
VP_trh2_re	<i>trh2</i>	AGGCGCTTAACCACTTTGAA
VP_trh2_S		<b>HEX-GGACTATTGGACAAACCGAAC-TAMRA</b>
VP_tdh_fw		CCATCTGTCCCTTTTTCTG
VP_tdh_re	<i>tdh1/tdh2</i>	TACGGTTTGTCCAAAAGTCAGA
VP_tdh_S	<i>tdh1</i>	<b>FAM-TAATACCCAAGCTCCGGTTCA-TAMRA</b>
VP_tdh2_S	<i>tdh2</i>	<b>FAM-TAATACCAATGCACCGGTCA-BHQ-1</b>

### 2.3.4.7 Quantitative Reverse Transkriptions-PCR (qRT-PCR)

Für die Transkriptionsanalyse der Virulenzgene *trh1*, *trh2*, *tdh* und *vopC* wurde die  $\Delta\Delta C_T$ -Methode ausgewählt (Livak *et al.* 2001). Bei dieser Methode wird eine relative Quantifizierung der mRNA erreicht, indem die Genexpression des zu untersuchenden Gens auf ein nicht reguliertes, konstant exprimiertes Haushaltsgen, das sog. Referenzgen, bezogen wird. Als Referenzgen wurde *gyrB* gewählt, welches für eine Untereinheit der DNA-Gyrase codiert (Caburlotto *et al.* 2010). Die konstitutive Expression des *gyrB*-Gens unter verschiedenen Wachstumsbedingungen (bei 37°C: nur LB-Medium, LB-Medium mit Gallenextrakt und LB-Medium mit Harnstoff, bei 20°C: nur LB-Medium) ermöglicht es, eine Aussage über den dazu relativen Expressionsunterschied der untersuchten Virulenzgene vorzunehmen. Dabei wurden die relativen Expressionsunterschiede jedes Stamms auf die Transkription bei 20°C, bezogen, welche somit als Kontrolle diente. Der  $2^{-\Delta\Delta C_T}$ -Wert gibt das Vielfache der Genexpression einer 37°C-Probe verglichen mit der Kontrolle an.

$$\Delta C_T = C_T \text{ Zielgen} - C_T \text{ Referenzgen}$$

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_T \text{ 37°C-Probe} - \Delta C_T \text{ Kontrolle}$$

$$\text{Ratio} = 2^{-\Delta\Delta C_T}$$

Primer und TaqMan-Sonden für die spezifische Detektion der Virulenzgene bzw. des Referenzgens sind in Tabelle 2.12 aufgeführt. Die relative Quantifizierung der Transkriptmenge der Zielgene erfolgte in einem Fluoreszenzdetektor mit integriertem Thermozykler (ABI PRISM 7500 von Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland). Die Taqman-Sonden wurden vor den eigentlichen Versuchen in Standardkurven-Experimenten getestet, um eine ausreichende PCR-Effizienz zu verifizieren. Ein Reaktionsansatz beinhaltete 1 x TaqMan Universal Master Mix (mit ROX) (Applied Biosystems), 0,25  $\mu\text{M}$  Primer, 0,2  $\mu\text{M}$  TaqMan-Sonde, 1  $\mu\text{l}$  cDNA als Templat und HPLC-Wasser. Die PCR-Bedingungen waren wie folgt: initiale Hitzedenaturierung bei 95 °C für 15 min, ein Zyklus von 95 °C für 15 s, 56 °C für 60 s und 72 °C für 30 s wurde 40 Mal wiederholt. Jede Probe aus drei unabhängigen Versuchen wurde als Triplikat gemessen. Die Analyse der Transkriptionsdaten erfolgte mit der ExpressionSuite v1.0.3 Software (Life Technologies, Darmstadt, Deutschland). Die Fehlerbalken in Abbildung 4.3 zeigen die errechneten maximalen (RQ Max) und minimalen (RQ Min) Expressionswerte, welche den Standardfehler des gemittelten Expressionswerts (RQ) repräsentieren. Damit definieren sie den

Expressionsbereich, in welchem der wahre Expressionswert am wahrscheinlichsten liegt. Die Berechnung erfolgte auf der Basis eines Konfidenzintervalls von 0,95.

**Tabelle 2.12:** Liste der verwendeten Primer und TaqMan-Sonden für die qRT-PCR.

Gen	Primer/ Sonde	Primersequenz 5' → 3'	Referenz
<i>gyrB</i>	Vp- <i>gyrB</i> -fw	TGAAGGTTTTGACTGCCGTTGT	Diese Arbeit
	Vp- <i>gyrB</i> -rev	TGGGTTTTTCGACCAAGAACTCA	
	Vp- <i>gyrB</i> -S2	<b>TAMRA</b> – TCACCCATCGCCGATTCAACCGCT – <b>BHQ-2</b>	
<i>tdh</i>	Vp- <i>tdh</i> -fw	TCCCTTTTCCTGCCCCC	Diese Arbeit
	Vp- <i>tdh</i> -rev	CGCTGCCATTGTATAGTCTTTATC	
	Vp- <i>tdh</i> -S1	<b>FAM</b> - TGACATCCTACATGACTGTG - <b>MGB-NFQ</b>	
<i>trh1</i>	VP- <i>trh1</i> -fw	AAAAGCGTTCACGGTCAATC	Messelhäusser <i>et al.</i> 2010
	VP- <i>trh1</i> -rev	CCAGAAAGAGCAGCCATTGT	
	VP- <i>trh1</i> -S	<b>CY5</b> –TCACGACTTCAGGCTCAAAA – <b>BHQ-2</b>	
<i>trh2</i>	VP- <i>trh2</i> -fw	CCCCAGTTAAGGCAATTGTG	Messelhäusser <i>et al.</i> 2010
	VP- <i>trh2</i> -rev	AGGCGCTTAACCACTTTGAA	
	VP- <i>trh2</i> -S	<b>HEX</b> – GGACTATTGGACAAACCGAAC – <b>BHQ</b>	
<i>vopC</i>	VP- <i>vopC</i> -fw	AGGTGACGTCAGTGTATTGAAAGG	Diese Arbeit
	VP- <i>vopC</i> -rev	CACAGGTAAATGGCAACTGCTTA	
	VP- <i>vopC</i> -S	<b>Fam</b> - AAGGGCATTGTTGGTGGAGAGAGCAA - <b>BHQ</b>	

### 2.3.5 Techniken für das Arbeiten mit Proteinen

#### 2.3.5.1 Agglutinationstest mit Kulturüberständen

Zum immunologischen Nachweis von sezerniertem TDH wurde ein Agglutinationstest durchgeführt. Das im KAP-RPLA (**K**anagawa **P**henomenon detection kit by **R**eversed **P**assive **L**atex **A**gglutination) „Seiken“ Kit (Denka Seiken, Tokyo, Japan) verwendete Kaninchen-Antiserum detektiert spezifisch TDH von *V. parahaemolyticus*. Der Test wurde nach den Angaben des Herstellers in einer Rundboden-Mikrotiterplatte durchgeführt (Auswertungsschema siehe Abbildung 2.1). Aufgrund der hohen Sensitivität des Agglutinationstests, können auch die geringen TDH-Mengen, welche von *V. parahaemolyticus* in den Überstand sezerniert werden, nachgewiesen werden. Da die Hämolyse TDH und TRH eine ähnliche Antigenität besitzen, wurde sowohl ein *trh* positiver als auch ein *tdh* positiver Stamm als Kontrolle mitgeführt. Allerdings wurde der Kulturüberstand des *trh* positiven Stammes über einen Filter aufkonzentriert, da TRH sehr viel geringer exprimiert wird als TDH. Für die Gewinnung der Überstände wurden die Übernachtskulturen (ÜNK)

gemäß des Herstellerprotokolls mit Mannit-Pepton-Medium angesetzt. Da Gallenextrakt (Bile bovine) eine induzierende Wirkung auf die Expression beider Hämolysine besitzt, wurde dieses in verschiedenen Konzentrationen zusätzlich (0 %, 0,04 %, 0,2 % und 1 %) verwendet. Die ÜNKs wurden bei 10 °C für 30 min zentrifugiert, der Kulturüberstand abgenommen und steril filtriert (0,2 µm Porengröße). 4 ml vom Überstand des *trh* positiven Stammes wurden mithilfe von Amicon Ultra Filtern (cut off 3K) nach Angaben des Herstellers aufkonzentriert. Anschließend wurde der Durchfluss verworfen und der Filter nochmals mit 3 ml Überstand beladen. Nach einem erneuten Zentrifugationsschritt für eine Stunde, besaß der aufkonzentrierte Überstand im Filter ein Volumen von ca. 700 µl. Nach mehrmaligem Spülen der Filterwand, um am Filter hängende Proteine zu lösen, wurde das gesamte Volumen mit einer Pipette aufgenommen und in ein Eppendorf-Röhrchen überführt. Im Agglutinationstest wurden 25 µl steril filtrierter Kulturüberstand mit 25 µl Diluent in einer Mikrotiterplatte verdünnt. Jeder Überstand wurde parallel mit 25 µl sensitivem Latex (mit spezifischen Antikörpern gegen TDH) und 25 µl Kontroll-Latex (ohne Antikörper) in fünf Verdünnungsschritten getestet. Die Mikrotiterplatte wurde über Nacht bei Raumtemperatur und im Dunkeln unter moderatem Schwenken inkubiert.

## 2.3.6 Phänotypische Methoden

### 2.3.6.1 Qualitativer Hämolyse nachweis

Eine klassische Methode zum Nachweis von *tdh* positiven *V. parahaemolyticus* Stämmen ist der qualitative Hämolyse-Test auf Wagatsuma-Agar (Miyamoto *et al.* 1969). Bei einer starken TDH-Sekretion tritt am Kolonierand eine β-Hämolyse in Form von „Hämolyse-Höfen“ auf, welche als sogenanntes „Kanagawa-Phänomen“ bezeichnet wird. Die Produktion des TDHs wird hierbei durch den pH-Wert im Medium angeregt und ist im Bereich von pH 5,5-6,5 am stärksten. Dieser pH-Wert wird durch die Zugabe von Mannitol zum Wagatsuma-Agar eingestellt. Um störende Maillard-Reaktionen und das Karamellisieren von Zuckern während des Autoklaviervorgangs zu verhindern, wurden Medium und Agar zunächst getrennt voneinander angesetzt. Zur Herstellung von 500 ml Wagatsuma-Agar (Tabelle 2.4.15) wurden 5 g Agar-Agar in 200 ml destilliertem Wasser autoklaviert und anschließend in ein 55 °C-Wasserbad gestellt. Parallel wurde das Medium aus folgenden Bestandteilen präpariert: 1,56 g Hefeextrakt, 5,2 g Pepton, 36,4 g NaCl, 2,6 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> und Aqua bidest (auf 270 ml aufgefüllt). Alle Bestandteile wurden durch 20 minütiges Rühren mit dem Magnetrührer gelöst und der pH-Wert auf 8,0 ± 0,2 eingestellt. Das Medium wurde

anschließend mithilfe einer Absaugpumpe mit einem 0,2 µm Filter steril filtriert. In einem Parallelansatz erfolgte die Herstellung einer 10 %igen Mannitol-Lösung. Hierzu wurden 5,2 g Mannitol in 52 ml destilliertem Wasser mithilfe eines Magnetrührers gelöst und ebenfalls durch einen 0,2 µm Filter steril filtriert. Humanes Erythrozytenkonzentrat (Blutspendedienst des Deutschen Roten Kreuzes, Berlin-Wannsee, Deutschland) wurde drei Mal mit 1 x PBS gewaschen und nach jedem Waschschrift bei 400 x g und Bremse 1 für 5 min zentrifugiert. 50 ml Mannitol-Lösung und 20 ml humanes Erythrozytenkonzentrat wurden jeweils in ein 50 ml Falcon-Röhrchen abgefüllt und im 37 °C-Wasserbad leicht erwärmt. Das steril filtrierte Medium wurde kurz in der Mikrowelle erhitzt, mit dem flüssigen Agar aus dem 55 °C-Wasserbad zusammengeführt und kurz auf dem Magnetrührer vermischt. Anschließend erfolgte die Zugabe der Mannitol-Lösung und des Erythrozytenkonzentrats. Dabei war zu beachten, dass die Temperatur des Wagatsuma-Agars nicht zu hoch ist, um eine Lyse der Erythrozyten zu vermeiden. Die Temperatur durfte jedoch auch nicht zu niedrig sein, was ein vorzeitiges Polymerisieren des Agars zur Folge gehabt hätte. Der fertige und noch flüssige Wagatsuma-Agar wurde nun unter ständigem Schwenken in Petrischalen abgefüllt (ca. 15 ml pro Petrischale) und war nach ca. 10 min auspolymerisiert. Die Bakterienstämme wurden in einem Verdünnungsaustich auf dem Wagatsuma-Agar ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Bei der Auswertung der hämolytischen Aktivität wurde unterschieden zwischen einer sehr starken Reaktion (++) mit einer klaren Zone von > 4 mm (Radius) um eine Kolonie, einer starken Reaktion (+) mit einer klaren Zone von < 4 mm (Radius), einer schwachen Reaktion (+/-) mit keiner klaren Zone, jedoch einem weiß verblassten oder grünlichen Kolonierand und keiner Reaktion (-) ohne sichtbare Veränderung.

Für den schnellen qualitativen Nachweis der hämolytischen Aktivität der zellfrei hergestellten Hämolytine wurde Columbia-Agar mit Kaninchen-, Schaf- bzw. humanen Erythrozyten und einem Antibiotikum verwendet. Das Kaninchenblut stammte von Kaninchen aus der BfR-eigenen Tierhaltung und wurde am Morgen des Versuchstages frisch abgenommen und mit Alsever-Lösung, einem Gerinnungshemmer, im Verhältnis 1:2 versetzt. Das defibrierte Schafblut (Thermo Scientific) und humanes Erythrozytenkonzentrat (Deutsches Rotes Kreuz) besaßen eine längere Haltbarkeit und wurden in einem Zeitraum von zwei Wochen verwendet. Alle Bluttypen wurden vor der Herstellung des Blutagars wie zuvor beschrieben drei Mal mit 1 x PBS gewaschen. Um eine ungefähr gleiche Anzahl der Erythrozyten in den drei verschiedenen Blutagars zu gewährleisten, wurden die Erythrozyten in einer Zählkammer (C-Chip) gezählt. Hierzu wurden 5 µl des gewaschenen Kaninchen-, Schaf- und humanen Bluts im Verhältnis 1:200 mit 1 x PBS verdünnt, gut gemischt und wiederum 20 µl abgenommen und mit 20 µl Methylenblau versetzt und gut gemischt. Von diesen 40 µl des Erythrozyten-Methylenblau-Gemisches wurden nun 2 x 10 µl für die Beladung des C-Chips

verwendet. Nach folgender Formel konnten die Erythrozyten pro Milliliter ermittelt werden: Erythrozyten/ml = Zellzahl in fünf Kästchen  $\times$  5  $\times$  400 (Verdünnungsfaktor)  $\times$   $10^4$  (Volumenfaktor). Die Konzentration der Kaninchen-, Schaf- und humanen Erythrozyten wurde nachfolgend auf  $\sim 8 \times 10^9$  Zellen/ml eingestellt. Die einheitlich verdünnten Erythrozytensuspensionen wurden im 37 °C-Wasserbad erwärmt. Der Columbia-Agar (Tabelle 2.4.7) wurde in der Mikrowelle aufgekocht und im Wasserbad auf 55 °C abgekühlt. Für die Herstellung von 250 ml Blutagar wurden 250  $\mu$ l Kanamycin (100  $\mu$ g/ml) in einem 500 ml-Erlenmeyerkolben vorgelegt, 240 ml flüssiger Columbia-Agar und 10 ml Kaninchen-, Schaf- bzw. humane Erythrozytensuspension dazu gegeben. Unter kontinuierlichem Schwenken wurde mithilfe eines kleinen Messzylinders eine Petrischale mit genau 15 ml Blutagar befüllt. 10  $\mu$ l der Translationsansätze mit den zellfrei exprimierten Hämolytinen wurden auf die Platten aufgetropft und über Nacht bei 37°C inkubiert.

### 2.3.6.2 Quantitativer Hämolyseachweis

Die hämolytische Aktivität der *V. parahaemolyticus* Stämme wurde, ähnlich wie bei Mahoney *et al.* (2010) beschrieben, gegen Schaf- und humanes Blut getestet. Dabei erfolgte eine getrennte Untersuchung der Bakterienkultur und der Kulturüberstände. Vor dem Hämolyse-Test wurden die Stämme in 20 ml LB-Medium mit 0,3 M NaCl bei 37 °C und 200 rpm bis zu einer  $OD_{600}$  von 0,6 kultiviert. Aus dieser späten Log-Phase Kultur wurden 2  $\times$  5 ml abgenommen und 1:2 verdünnt mit 5 ml LB-Medium (Kontrolle) bzw. 5 ml LB-Medium mit Gallenextrakt (Bile bovine, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland), so dass eine Konzentration an Gallenextrakt von 0,04 % im Endvolumen von 10 ml vorlag. Diese Konzentration entspricht ungefähr der Gallenkonzentration im menschlichen Darm (Gotoh *et al.* 2010). Die Subkulturen wurden nochmals bei 37 °C und 200 rpm für zwei Stunden inkubiert, um eine durch das Gallenextrakt induzierte Hämolytin-Produktion zu erreichen. Nach dem zweistündigen Inkubationsschritt wurden 150  $\mu$ l Bakterienkultur mit 800  $\mu$ l einer 2 %igen Erythrozytensuspension in PBS (human und Schaf) vermischt. Die Erythrozyten wurden zuvor drei Mal mit 1  $\times$  PBS gewaschen. Anschließend wurde das Bakterien-Erythrozyten-Gemisch bei 9000 rpm für 4 min pelletiert. Parallel wurden 1 ml der Bakterienkultur bei 5000  $\times$  g und 4 °C für 10 min zentrifugiert, der Kulturüberstand steril filtriert (0,2  $\mu$ m Porendurchmesser) und ebenfalls 150  $\mu$ l mit 800  $\mu$ l 2 %iger Erythrozytensuspension vermischt. Für alle Proben erfolgte nun eine Inkubation bei 37 °C und 200 rpm für vier Stunden. Nach der Inkubation wurden die Zellen nochmals bei 9000 rpm für 4 min zentrifugiert, der Überstand in eine Küvette überführt und die Absorption bei  $OD_{540}$  photometrisch gemessen. Dabei diente die Menge des durch Zellyse freigesetzten

Hämoglobins als indirektes Maß für die hämolytische Aktivität. Durch Zugabe von 4 %igem Triton X-100 bzw. alleiniger Zugabe von LB-Medium zur Erythrozytensuspension konnten die maximale Zellyse sowie die spontane Zellyse ermittelt werden. Alle Experimente wurden mindestens zwei Mal durchgeführt.

### 2.3.6.3 Serumresistenz

Um zu testen, ob die *V. parahaemolyticus* Stämme die Fähigkeit besitzen, im humanen Serum zu überleben, wurde ein Serumresistenz-Test nach Moll *et al.* (1979) im Rahmen dieser Arbeit etabliert. Das Testverfahren wurde auch erfolgreich mit *Vibrio vulnificus* (Bier *et al.* (2013)) und mit *Vibrio cholerae* (Schirmeister *et al.* (2014)) angewendet. Für den Serumresistenz-Test wurden die Stämme auf LB-Agar ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde eine Mikrotiterplatte mit 200 µl LB-Medium pro Well gefüllt, um diese anschließend mit Einzelkolonien der hochgewachsenen *V. parahaemolyticus* Stämme zu beimpfen. Dabei wurden zwei Einzelkolonien pro Stamm verwendet und mit jeder Einzelkolonie sechs Wells der Mikrotiterplatte beimpft, d.h. eine Reihe à 12 Wells pro Stamm. Die Mikrotiterplatte wurde über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Am folgenden Tag wurden die hochgewachsenen Übernachtskulturen mithilfe eines Vielpunktinokulators (6 x 8) in eine Mikrotiterplatte mit 100 µl LB-Medium transferiert, um nach ungefähr drei Stunden unter gleichen Wachstumsbedingungen eine vitale Log-Kultur zu erhalten. Parallel wurde das humane Serum bei Raumtemperatur aufgetaut, welches von mehreren BfR-Mitarbeitern gesammelt und vereinigt wurde. Im Serumresistenz-Test wurden Serumkonzentrationen von 80 %, 60 %, 40 %, 20 %, 10 %, 5 % und 0 % getestet. Um die Vitalität der Bakterien in den jeweiligen Serumkonzentrationen überprüfen zu können, wurde Medium (Barsikow-Bouillon, BAR-B) mit einem pH-Farbindikator (0,0075 % Bromthymolblau) hinzugefügt (siehe Tabelle 2.4.1). Dieser pH-Farbindikator diente als indirektes Maß für die Bakterienvitalität, indem er die aus der Verstoffwechslung von Glucose resultierende Ansäuerung des Mediums als Farbumschlag anzeigte. Die Log-Kulturen wurden mithilfe des Vielpunktinokulators in die vorbereitete Mikrotiterplatte mit 100 µl BAR-B, versetzt mit verschiedenen Serumkonzentrationen, überimpft und der Assay für ca. 18 Stunden bei 37 °C inkubiert. Anschließend konnte das Ergebnis anhand des Farbumschlags abgelesen werden, wobei ein Farbumschlag von blau nach gelb Bakterienwachstum anzeigte. Als Positivkontrolle diente der *E. coli* Stamm O18:K1 RS228 mit dem Plasmid pKT107 und als Negativkontrolle wurde *E. coli* K12 DSM423 eingesetzt. Die Experimente wurden mindestens drei Mal wiederholt.

#### 2.3.6.4 Biofilmbildung

Um zu untersuchen, ob *V. parahaemolyticus* Stämme die Fähigkeit besitzen, einen Biofilm zu bilden, wurde ein Biofilm-Assay in Anlehnung an Mahoney *et al.* (2010) entwickelt und etabliert. Der Assay wurde auch erfolgreich mit *V. cholerae* (Schirmeister *et al.* (2014)) angewendet. Für den Biofilm-Assay wurden die *V. parahaemolyticus* Stämme in 4 ml LB-Medium über Nacht angezogen und davon 200 µl in eine Mikrotiterplatte überführt. Von den Übernachtskulturen wurden nun zwei weitere Verdünnungen im Verhältnis 1:10 und 1:100 mit HI-Medium durchgeführt, wobei jede Verdünnung vierfach angesetzt wurde. Die verdünnten Bakterienkulturen wurden bei 37 °C und 200 rpm für vier Stunden inkubiert und anschließend mit einer Absaugpumpe vorsichtig aus den Wells entfernt. Um das Bakterienwachstum nach der vierstündigen Inkubation zu dokumentieren, wurde die optische Dichte bei OD<sub>600</sub> gemessen. Die geleerten Wells wurden nun vorsichtig zwei Mal mit 250 µl bidestilliertem Wasser gewaschen und über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet. Darauf folgte eine Fixierung bei 60 °C für eine Stunde und das Anfärben des fixierten Biofilms mit 250 µl einer 0,1 %igen Kristallviolett-Lösung. Die Einwirkzeit der Kristallviolett-Lösung betrug 20 min und wurde durch dreimaliges Waschen mit 300 µl bidestilliertem Wasser beendet.

An dieser Stelle wurde eine erste visuelle Auswertung der Biofilmbildung unter folgenden Kriterien vorgenommen: eine sehr starke Reaktion (++) zeichnete sich durch eine starke Violettfärbung am Boden und dem Rand des Wells aus, eine starke Reaktion (+) wies eine Violettfärbung am Boden und als Ring am Rand des Wells auf, als schwache Reaktion (+/-) wurden leichte Violettfärbungen des Wells gewertet und bei keiner Reaktion (-) konnte keine Färbung beobachtet werden.

Nach dem Trocknen der Mikrotiterplatte wurde das am Biofilm haftende Kristallviolett mit 300 µl einer 33 %igen Essigsäure für 30 min bei Raumtemperatur gelöst. Vor der photometrischen Messung bei OD<sub>570</sub> musste das gelöste Kristallviolett in einer neuen Mikrotiterplatte 1:2 mit Essigsäure in einem Gesamtvolumen von 100 µl verdünnt werden, um Extinktionswerte in einem guten Messbereich zu erhalten. Bei allen Biofilm-Experimenten wurde Stamm VN-0071 mitgeführt, welcher einen extrem starken Biofilm gebildet hat und als 100 % Wert bei der Auswertung genutzt wurde.

### 2.3.6.5 Protease

Der Magermilch-Agar (Tabelle 2.4.12) wurde ähnlich zu Mahoney *et al.* (2010) hergestellt. Zunächst wurden 4 g Magermilchpulver in 1 l HI-Medium gelöst und anschließend 15 g Bacto-Agar dazugegeben. Nach dem Autoklavieren konnten die Platten gegossen werden. Zum Nachweis der Proteaseaktivität wurden die *V. parahaemolyticus*-Flüssigkulturen auf den Magermilch-Agar aufgetropft und bei 37 °C für ca. 24 Stunden inkubiert. Bei der Auswertung der proteolytischen Aktivität wurde unterschieden zwischen einer sehr starken Reaktion (++) mit einer klaren Zone von > 4 mm (Radius) um eine Kolonie, einer starken Reaktion (+) mit einer klaren Zone von < 4 mm (Radius), einer schwachen Reaktion (+/-) mit einer klaren Zone unterhalb der Kolonie, nachdem diese abgekratzt wurde und keiner Reaktion (-) ohne sichtbare Veränderung.

### 2.3.6.6 Urease

Um die Ureaseaktivität der *V. parahaemolyticus* Stämme zu testen, wurden Einzelkolonien von LB-Agar auf Harnstoff-Dextrose-Schrägagar (Tabelle 2.4.10) transferiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Eine pinkfarbene Verfärbung des Agars wurde als positive Reaktion gewertet.

### 2.3.6.7 Chitinase

Um die einzelnen Chitinketten zu verkürzen und somit der Chitinase besser zugänglich zu machen, wurde die kristalline Struktur der Chitinfibrillen mittels Säurebehandlung aufgebrochen (abgeändert nach Rodriguez-Kabana *et al.* 1983). Zur Gewinnung von kolloidalem Chitin wurden 25 g Chitin langsam in 250 ml 10 N HCl gegeben und über Nacht bei 4 °C unter starkem Rühren inkubiert bis das Chitin hydrolysiert war. Die Chitinlösung wurde nun vorsichtig zu bidestilliertem Wasser gegeben (ca. 12 fach verdünnt) und unter andauerndem Rühren über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Damit sich das kolloidale Chitin absetzt, wurde die Chitin-Suspension für drei Tage bei 8 °C stehen gelassen. Anschließend wurde der Überstand langsam abgegossen und weiteres Wasser hinzugegeben. Dieser Vorgang wurde mehrfach wiederholt bis ein pH-Wert von ca. 6 erreicht und eine ausreichende Menge an kolloidalem Chitin präzipitiert war. Das Präzipitat wurde anschließend auf Filterpapier getrocknet. Die Lagerung des kolloidalen Chitins erfolgte im

Kühlschrank bei 8 °C. Zur Herstellung des Chitin-Agars wurden 20 g kolloidales Chitin abgewogen und in 1 l HI-Medium unter Rühren gelöst. Anschließend wurden 15 g Bacto-Agar dazugegeben, alles autoklaviert und anschließend in Platten gegossen. Der Nachweis der Chitinase-Aktivität erfolgte analog zum Nachweis der Protease-Aktivität (siehe 1.3.6.5)

### 2.3.6.8 Schwärmen

Das Schwärmverhalten der *V. parahaemolyticus* Stämme wurde mittels Schwärm (+)- und Schwärm (-)-Agar nach Jaques *et al.* (2006) untersucht. Der Schwärm(+)-Agar enthielt 15 g Bacto-Agar auf 1 l HI-Medium, während sich der Schwärm(-)-Agar aus 20 g Bacto-Agar auf 1 l HI-Medium zusammensetzte. Beide Schwärmagars wurden autoklaviert und anschließend in Platten gegossen. *V. parahaemolyticus*-Flüssigkulturen wurden in HI-Medium über Nacht angezogen und auf die Platten aufgetropft. Die Schwärm(+)-Agarplatten und Schwärm(-)-Agar-Platten wurden bei 37 °C inkubiert und nach ca. 24 Stunden konnte das Schwärmverhalten ausgewertet werden. Hierbei wurde der Koloniedurchmesser eines Stammes auf dem Schwärm (+)- und Schwärm(-)-Agar verglichen, um ein Schwärmverhalten eindeutig identifizieren zu können. Zusätzlich wurde das Schwärmverhalten auf Feuchtagar-Platten untersucht und wie oben verfahren. Zeigte sich auf mindestens einem der verschiedenen Schwärmagars Schwärmverhalten, so wurde dies als positiv bewertet.

## 2.3.7 Zellfreie Proteinsynthese

### 2.3.7.1 Expressions-PCR

Über eine zweistufige Expressions-PCR (E-PCR) werden die PCR-Produkte des jeweiligen Hämolysin-Gens generiert, die bei der *in vitro* Translation eingesetzt werden. Die 1. PCR-Stufe (E-PCR1) dient der Amplifikation des Hämolysin-Gens und der Implementierung von Anhängen für die Anlagerung der Primer der 2. PCR-Stufe. Als Template für die E-PCR1 kann sowohl chromosomale DNA als auch ein Plasmid eingesetzt werden.

Das E-PCR1-Produkt wird als Template für die 2. PCR-Stufe (E-PCR2) verwendet, in welcher das Einbringen wichtiger regulatorischer Sequenzen (z.B. T7-Promoter und T7-Terminator) sowie Protein-Tags in das E-PCR2-Produkt erfolgen. Die verwendeten Primer für die 1. E-PCR sind in Tabelle 2.13 und die Primer für die 2. E-PCR sind in Tabelle 2.14 aufgelistet. Die verschiedenen Primerkombinationen, welche für die Konstruktion der

Hämolyysin-Varianten genutzt wurden, sind in Tabelle 2.15 aufgeführt. Ein Reaktionsansatz der E-PCR1 mit 50 µl Gesamtvolumen beinhaltete 10 x Fermentas PCR-Puffer, 0,2 mM von jedem dNTP, 0,5µM Forward und Reverse Primer, 0,05 U/µl Taq DNA Polymerase, 2 – 10 ng DNA und HPLC-Wasser. Die Reaktionsbedingungen der E-PCR1 waren wie folgt: initiale Hitzedenaturierung bei 95 °C für 10 min, 30 Zyklen à 94 °C für 30 s, 54 °C (*tdh*) bzw. 56 °C (*trh*) für 30 s und 72 °C für 45 s, und eine finale Elongation bei 72 °C für 5 min. 100 ng PCR-Produkt der 1. E-PCR wurden direkt für die 2. E-PCR verwendet. Die E-PCR2 wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt (EasyXpress Linear Template Kit PLUS, Qiagen, Hilden, Deutschland). Der Reaktionsansatz umfasste ein Gesamtvolumen von 25 µl mit 5 µl 5 x High Fidelity PCR-Puffer, 2,5 µl von jedem Adapterprimer, 0,05 U/µl High Fidelity DNA Polymerase. Die Reaktionsbedingungen waren wie folgt: initiale Hitzedenaturierung von 95 °C für 5 min, 30 Zyklen à 94 °C für 60 s, 50 °C für 60 s, 72 °C für 45 s und eine finale Elongation bei 72 °C für 10 min. Alle E-PCR2 Produkte wurden mittels Elektrophorese in einem 1 %igen Agarosegel analysiert, um Qualität und Konzentration anhand von DNA-Markern zu bestimmen.

**Tabelle 2.13:** Liste der verwendeten Primer in der E-PCR1 (Expressions-PCR) zur Amplifikation/Modifikation der *tdh*-Varianten [A] und der *trh*-Varianten [B]. Abkürzungen: pre = Vorläuferprotein (preprotein), m = reifes Protein (mature protein), SF = Verlängerungssequenz für die N-terminalen Strep-Tag-Adapter-Primer und HR = Verlängerungssequenz für C-terminale 6x-His-Tag-Adapter-Primer.

**[A]**

Primer	Gen	Primersequenz 5' → 3'
X-Vpara-preTDH-F	<i>tdh1/tdh2</i>	AGA AGG AGA TAA ACA - ATG – <b>AAG TAC CGA TAT TTT GC</b>
X-Vpara-preTDH-SF		AAA AGC GCT GAA AAC CTG ATC GAA GGC CGT - <b>AAG TAC CGA TAT TTT GC</b>
X-Vpara-mTDH-F		AGA AGG AGA TAA ACA - ATG – <b>TTT GAG CTT CCA TCT GT CCC</b>
X-Vpara-mTDH-SF		AAA AGC GCT GAA AAC CTG ATC GAA GGC CGT – <b>TTT GAG CTT CCA TCT GT CCC</b>
X-Vpara-TDH-R		CTT GGT TAG TTA GTT A - TTA – <b>TTG TTG ATG TTT ACA TTC AA</b>
X-Vpara-TDH-HR		TG GTG ATG GTG GTG ACC CCA – <b>TTG TTG ATG TTT ACA TTC AA</b>

**[B]**

Primer	Gen	Primersequenz 5' → 3'
X-para-preTRH1-F	<i>trh1</i>	AGA AGG AGA TAA ACA – ATG – <b>AAA CTA AAA CTC TAC TTT GCC</b>
X-para-mTRH1-F		AGA AGG AGA TAA ACA – ATG – <b>ATT GAC CTG CCA TCC ATA CCT</b>
X-Vpara-mTRH1-R		C TTG GTT AGT TAG TTA – <b>TTA ATT TTG TGA CAT ACA TTC ATC A</b>
X-para-TRH1-HR		TG GTG ATG GTG GTG ACC CCA – <b>ATT TTG TGA CAT ACA TTC ATC A</b>
X-Vpara-mTRH1(VN-28)-F		AGA AGG AGA TAA ACA – ATG – <b>ATT GAC CTA CCA TCC GTA CCT</b>
X-Vpara-mTRH1(VN-28)-R		C TTG GTT AGT TAG TTA – <b>TTA AAT TTG TGA TTT ACA TTC GCC A</b>
X-para-preTRH2-F	<i>trh2</i>	AGA AGG AGA TAA ACA – ATG – <b>AAA CTA AGA CTC TAC TTT GCA</b>
X-Vpara-mTRH2-F		AGA AGG AGA TAA ACA – ATG – <b>ATT GAT CTG CCA TCA ATA CCT</b>
X-Vpara-mTRH2-R		C TTG GTT AGT TAG TTA – <b>TTA AAT TTG TGA TTT ACA TTC GCC A</b>
X-para-TRH2-HR		TG GTG ATG GTG GTG ACC CCA – <b>AAT TTG TGA TTT ACA TTC GCC A</b>

**Tabelle 2.14:** Liste der verwendeten Primer in der E-PCR2 (Expressions-PCR) zur Modifikation der *tdh*-Varianten und der *trh*-Varianten.

Primer	Primersequenz 5'→3'
No tag Sense Primer	ATGATATCTCGAGCGGCCGCTAGCTAATACGACTCACTATAGGGAGACCACAAC GGTTTCCCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATAAACA
No tag Antisense Primer	ATGATATCACCGGTGAATTCGGATCCAAAAACCCCTCAAGACCCGTTTAGA GGCCCCAAGGGGTACAGATCTTGGTTAGTTAGTTATTA
<i>Strep</i> -tag™ Sense Primer	ATGATATCTCGAGCGGCCGCTAGCTAATACGACTCACTATAGGGAGACCACAAC GGTTTCCCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATAAACA <b>ATGTGGTC</b> TCATCCGCAATTCGAAAAAAGCGCTGAAAACCTGATCGAAGGCCGT
6xHis tag Antisense Primer	ATGATATCACCGGTGAATTCGGATCCAAAAACCCCTCAAGACCCGTTTAGAGGC CCCAAGGGGTACAGATCTTGGTTAGTTAGTTATTA <b>ATGATGGTGATGGTGTTGACCCCA</b>

**Tabelle 2.15:** Übersicht der Primerkombinationen, welche für die Konstruktion der *tdh*-Varianten [A] und *trh*-Varianten [B] in der zweistufigen E-PCR genutzt wurden. Abkürzungen: pre = Vorläuferprotein (preprotein), m = reifes Protein (mature protein), SF = Verlängerungssequenz für die N-terminalen Strep-Tag-Adapter-Primer, HR = Verlängerungssequenz für C-terminale 6x-His-Tag-Adapter-Primer, S = Sense Primer und AS = Antisense Primer.

<b>[A]</b>		<b>E-PCR1</b>		<b>E-PCR2</b>		
<b>Name des Gens</b>	<b>Amplifiziertes Gen</b>	<b>Forward Primer</b>	<b>Reverse Primer</b>	<b>Forward Primer</b>	<b>Reverse Primer</b>	<b>Amplifikatgröße [bp]</b>
preTDH	preTDH2	X-Vpara-preTDH-F	X-Vpara-TDH-R	No tag-S	No tag-AS	794
preTDH-His	preTDH2-His	X-Vpara-preTDH-F	X-Vpara-TDH-HR	No tag-S	His tag-AS	822
Strep-preTDH	Strep-preTDH2	X-Vpara-preTDH-SF	X-Vpara-TDH-R	Strep tag-S	No tag-AS	863
Strep-preTDH-His	Strep-preTDH2-His	X-Vpara-preTDH-SF	X-Vpara-TDH-HR	Strep tag-S	His tag-AS	891
mTDH	mTDH1 and mTDH2	X-Vpara-mTDH-F	X-Vpara-TDH-R	No tag-S	No tag-AS	728
mTDH-His	mTDH1-His and mTDH2-His	X-Vpara-mTDH-F	X-Vpara-TDH-HR	No tag-S	His tag-AS	756
Strep-mTDH	Strep-mTDH1 and Strep-mTDH2	X-Vpara-mTDH-SF	X-Vpara-TDH-R	Strep tag-S	No tag-AS	797
Strep-mTDH-His	Strep-mTDH1-His and Strep-mTDH2-His	X-Vpara-mTDH-SF	X-Vpara-TDH-HR	Strep tag-S	His tag-AS	825

<b>[B]</b>		<b>E-PCR1</b>		<b>E-PCR2</b>		
<b>Name des Gens (Stamm)</b>	<b>Amplifiziertes Gen</b>	<b>Forward Primer</b>	<b>Reverse Primer</b>	<b>Forward Primer</b>	<b>Reverse Primer</b>	<b>Amplifikatgröße [bp]</b>
preTRH1-His	preTRH1-His	X-para-preTRH1-F	X-para-TRH1-HR	No tag-S	His tag-AS	822
mTRH1-His	mTRH1-His	X-para-mTRH1-F	X-para-TRH1-HR	No tag-S	His tag-AS	756
mTRH1	mTRH1	X-Vpara-mTRH1-F	X-Vpara-mTRH1-R	No tag-S	No tag-AS	728
mTRH1 (VN-0028)	mTRH1	X-Vpara-mTRH1(VN-28)-F	X-Vpara-mTRH1(VN-28)-R	No tag-S	No tag-AS	728
preTRH2-His	preTRH2-His	X-para-preTRH2-F	X-para-TRH2-HR	No tag-S	His tag-AS	822
mTRH2-His	mTRH2-His	X-para-mTRH2-F	X-para-TRH2-HR	No tag-S	His tag-AS	756
mTRH2	mTRH2	X-Vpara-mTRH2-F	X-Vpara-mTRH2-R	No tag-S	No tag-AS	728

### 2.3.7.2 Proteinsynthese im *E. coli* basierten gekoppelten *in vitro* Transkriptions- und Translationssystem

Für die Expression der Proteine im zellfreien System wurden E-PCR2-Produkte unaufgereinigt als Template verwendet und mit *E. coli*-Lysat vermischt, wie in Brödel *et al.* (2013) beschrieben. Ein typischer Reaktionsansatz mit 50 µl Gesamtvolumen beinhaltete 35 % (v/v) *E. coli*-Lysat mit T7-RNA-Polymerase, 40 % Reaktionspuffer mit Aminosäuren (1,2 mM jeder proteinogenen Aminosäure), 25 x XE-Lösung (EasyXpress linear template Kit Plus, Qiagen), 9 µl lineares E-PCR2-Produkt und <sup>14</sup>C-markiertes Leucin (Perkin Elmer, Leucin, L-[<sup>14</sup>C(U)], finale Konzentration: 50 µM; 4DPM/pmol). Die gekoppelte Reaktion erfolgte im Thermomixer bei 37 °C und 500 rpm für 90 min. Anschließend wurde eine Analyse der zellfrei exprimierten Proteine durchgeführt wie in 2.3.7.4 beschrieben.

### 2.3.7.3 Proteinsynthese im entkoppelten *in vitro* Transkriptions- und Translationssystem (eukaryotisch)

Die zellfreie Expression der Toxine wurde außerdem im entkoppelten System basierend auf einem eukaryotischen Zelllysate (Insektenzelllysate) getestet. Hierbei laufen die *in vitro* Transkriptions- und Translationsreaktionen getrennt voneinander ab. Auch bei dieser Methode dient das E-PCR2-Produkt als Template für die Transkriptionsreaktion und Gewinnung der mRNA. Ein typischer Reaktionsansatz mit einem Gesamtvolumen von 50 µl enthielt: E-PCR2-Produkt (100 ng/µl), 1 x Transkriptionspuffer, 1 x NTPs, 1 x Transkriptionsenzym-Mix und MiliQ-H<sub>2</sub>O. Die Reaktion erfolgte bei 37 °C und 500 rpm über Nacht. Im Anschluss wurde die mRNA mittels DyeEx-Säulen aufgereinigt und die Konzentration der aufgereinigten mRNA im Bio-Photometer bei 260 nm bestimmt. Für die nachfolgende Translationsreaktion wurden 1 µg aufgereinigte mRNA eingesetzt und mit folgenden Komponenten vermischt: 1 x T-Mix mit 2,5 mM Magnesium, 1 x E-Mix, 40 % Insektenzelllysate und MiliQ-H<sub>2</sub>O. In Eukaryoten passieren Proteine, die sekretiert werden, zunächst das endoplasmatische Retikulum (ER) und anschließend den Golgi-Apparat. Das ER besteht zum Teil aus Mikrosomen, kleine Membran-begrenzte Vesikel, welche auch im eukaryotischen Zelllysate enthalten sind. Dabei sammeln sich die zellfrei synthetisierten Proteine im Inneren dieser mikrosomalen Vesikel oder in der Vesikelmembran, wo sie posttranslational modifiziert werden (Sachse *et al.* 2014).

Um zu untersuchen, ob sich die zellfrei synthetisierten Hämolyse in die Membran der mikrosomalen Vesikel einlagern, wurde für jede Probe ein vesikelfreier Ansatz und ein Ansatz mit Vesikeln pipettiert. Für den vesikelfreien Ansatz wurden die Vesikel im Vormix, bevor dieser mit der mRNA vermischt wurde, bei 16,000 x g und 4 °C für 10 min abzentrifugiert und nur der Überstand für die Translationsreaktion verwendet. Nach dem Zusammenpipettieren aller Komponenten wurden die Reaktionsansätze bei 27 °C und 500 rpm für 90 min inkubiert.

### 2.3.7.4 Analytik der zellfrei synthetisierten Proteine

In der Analytik wurden die Ausbeute, Größe und Homogenität des zellfrei synthetisiertem Gesamtproteins und des löslichen Proteins bestimmt. Hierzu wurden nach dem Zusammenpipettieren aller Komponenten 50 µl des Reaktionsansatzes abgenommen, mit <sup>14</sup>C-Leucin versetzt und mit den anderen Ansätzen wie oben beschrieben inkubiert. Nach der Translationsreaktion wurde ein Teil des Ansatzes für 10 min bei 16,000 x g bei Raumtemperatur zentrifugiert und anschließend der Überstand für die Analyse des löslichen Proteinanteils abgenommen.

Für die Bestimmung der Proteinausbeuten wurde mit einem Teil des <sup>14</sup>C-Leucin-markierten Ansatzes eine TCA-Fällung durchgeführt. Hierzu wurden 5 µl der Translationsreaktion (Gesamtansatz und Überstand) durch die Zugabe von 3 ml TCA (10 %ige Lösung mit 2 % Caseinhydrolysat) gestoppt. Um die neu synthetisierten Proteine zu präzipitieren und die Aminosäuren von den beladenen t-RNAs zu hydrolysieren, wurden die TCA-haltigen Proben für 15 min in kochendes Wasser gestellt und anschließend für 30 min auf Eis gekühlt. Nachfolgend erfolgte die Beladung der Filter (Machery-Nagel, MN GF-3) mit den TCA-präzipitierten Proteinen. Die proteinbeladenen Filter wurden zwei Mal mit TCA (5 %ige Lösung w/o Caseinhydrolysat) gewaschen und zwei Mal mit Aceton abgespült. Die getrockneten Filter wurden nun in ein Szintillationsfläschchen gelegt und mit 3 ml Szintillations-Cocktail (Zinsser Analytic, Quicksafe A) bedeckt.

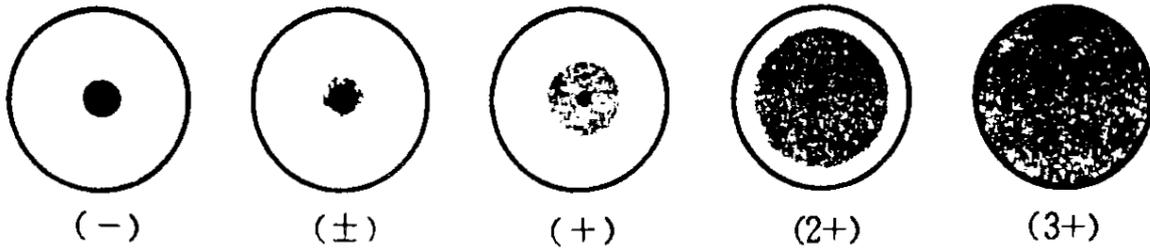
Anschließend erfolgte die Radioaktivitäts-Messung im Flüssigkeitsszintillator (Beckmann Coulter, LS 6500 Multi Purpose Scintillation Counter). Im Szintillator wird die Energie der β-Strahlung in Licht umgewandelt. Der Szintillations-Cocktail erfüllt dabei drei Aufgaben: er dient als Lösungsmittel, um die Probe zu lösen, er gewährleistet, dass die Probe in einer homogenen Suspension vorliegt und nimmt gleichzeitig die Energie der β-Strahlung auf und transformiert sie in Photonen, kleine Lichtblitze, welche dann über eine Photokatode detektiert und in einem Photomultiplier in elektrische Impulse umgewandelt werden. Die

Anzahl der pro Zerfall emittierten Photonen ist abhängig von der Energie des primären Strahlungsteilchens und wird als sog. CPMs (counts per minute) angezeigt.

Um Homogenität und Größe der zellfrei synthetisierten Proteine zu bestimmen, wurden 5 µl Aliquots der <sup>14</sup>C-Leucin-markierten Translationsreaktionen (Gesamtansatz und Überstand) mit Wasser verdünnt (1:10), 150 µl eisgekühltes Aceton dazugegeben und die Proben für 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 16,000 x g und 4 °C für 5 min. Das Proteinpellet wurde in 20 µl Probenpuffer (Life Technologies, LDS-Probenpuffer) resuspendiert und auf ein 10 %iges Bis-Tris NuPAGE Novex Gel (Life Technologies) aufgetragen. Nach Auftrennung der Proteine (200 V, 35 min) und anschließender Coomassie-Färbung wurde das Proteingel für eine Stunde getrocknet und im Anschluss mit einer Phosphor-Speicherfolie (GE Healthcare, Mounted GP) für 24 Stunden bedeckt. Die Energie der β-Strahlung wird hierbei von der Speicherfolie absorbiert und in Form von Ladungszuständen gespeichert. Im Phosphor-Imager (Typhoon Trio+, GE Healthcare) wird durch laserinduzierte Stimulation Licht, welches proportional zur Menge an Radioaktivität in der Probe ist, von der Speicherfolie emittiert und als digitales Bild visualisiert.

#### 2.3.7.5 Immunologischer Nachweis von zellfrei synthetisiertem TDH und TRH

Zum immunologischen Nachweis von zellfrei synthetisierten TDH- und TRH-Proteinen wurde ein Agglutinationstest durchgeführt. Das im KAP-RPLA (**K**anagawa **P**henomenon detection kit by **R**eversed **P**assive **L**atex **A**gglutination) „Seiken“ Kit (Denka Seiken, Tokyo, Japan) verwendete Kaninchen-Antiserum detektiert spezifisch TDH von *V. parahaemolyticus*. Der Test wurde nach den Angaben des Herstellers in einer Rundboden-Mikrotiterplatte durchgeführt. 5 µl des Ansatzes der Translationsreaktion wurden zu 95 µl Diluent (mit Rinderserumalbumin in 1x PBS) gegeben und zweifache Verdünnungen mit 25 µl Diluent in einer Mikrotiterplatte vorgenommen. Jeder Translationsansatz wurde parallel mit 25 µl sensitivem Latex (mit spezifischen Antikörpern gegen TDH) und 25 µl Kontroll-Latex (ohne Antikörper) in fünf Verdünnungsschritten getestet. Als Positiv-Kontrolle diente ein im Kit enthaltenes Kontrolltoxin und in der Negativ-Kontrolle wurden die Latexpartikel mit Diluent vermischt. Die Mikrotiterplatte wurde über Nacht bei Raumtemperatur und im Dunkeln unter moderatem Schwenken inkubiert. Die Auswertung erfolgte visuell mithilfe des in Abbildung 2.1 gezeigten Schemas. Eine Agglutination ab der Stärke (+) wurde als positiv bewertet.



**Abbildung 2.1:** Schema zur Auswertung des KAP-RPLA (Seiken)-Tests.

### 2.3.7.6 Nachweis der hämolytischen Aktivität der zellfrei synthetisierten Proteine

Um die hämolytische Aktivität der zellfrei synthetisierten Hämolsine qualitativ zu untersuchen, wurden 10 µl Aliquots der Translationsreaktionen direkt auf eine Blutplatte gespottet. Für die TDH-Proteine erfolgte zuvor eine einheitliche Verdünnung der löslichen Proteinkonzentrationen auf 120 µg/ml mit *E. coli*-Lysat. Da die Ausbeuten des zellfrei synthetisierten TRH-Proteins wesentlich geringer waren, wurden für den Hämolyse-Test die Konzentrationen an löslichem TRH-Protein auf 5 µg/ml eingestellt. Die Herstellung der Blutagarplatten erfolgte mit Columbia-Agar und 4 % gewaschenen Erythrozyten (Schaf-, Kaninchen- oder humane Erythrozyten) wie bereits in 2.3.6.1 beschrieben. Die Hämolysehöfe wurden nach einer Inkubationszeit von 20 Stunden bei 37 °C visuell bestimmt. 1 %iges Triton X-100 diente dabei als Positivkontrolle.

Um die hämolytische Aktivität der zellfrei hergestellten Hämolsine besser miteinander vergleichen zu können, wurde ein semi-quantitativer Hämolyse-Test durchgeführt. Hierbei erfolgte zunächst eine Einstellung der löslichen Proteine auf eine einheitliche Konzentration (TDH: 120 µg/ml, TRH: 5 µg/ml), welche dann zweifach über mehrere Stufen mit 60 µl PBS verdünnt wurden. Zu den Verdünnungsstufen wurde nun jeweils 60 µl 4 %ige Erythrozytensuspension (Kaninchen-, Schaf- oder humane Erythrozyten) in PBS dazugegeben und die Proben für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubation erfolgte eine Zentrifugation bei 400 x g für 5 min, um entstandene Zelltrümmer zu sedimentieren. Der Überstand wurde in eine Mikrotiterplatte überführt und bei OD<sub>570</sub> spektrophotometrisch gemessen. Dabei wird das durch Zellyse freigesetzte Hämoglobin gemessen, welches als indirektes Maß der hämolytischen Aktivität dient. Die Extinktionswerte wurden ins Verhältnis zur maximalen Zellyse gesetzt, welche durch Zugabe von 4 %igem Triton X-100 erreicht wurde.

### **2.3.8 *In silico*-Analyse der TRH-Varianten und TDH2**

Für die *in silico*-Analyse der TRH-Varianten und TDH2 wurden die Aminosäuresequenzen der reifen Proteine eingesetzt. Hierzu erfolgte zunächst ein Alignment der Aminosäuresequenzen mit der Software Accelrys Gene Version 2.5 (Accelrys Ltd., Cambridge, UK).

Ein Homologie-Modelling zur Visualisierung der möglichen 3D-Struktur der TRH-Proteine wurde über den SWISS Model server (<http://swissmodel.expasy.org/interactive>) mit anschließender Bildbearbeitung mithilfe von Accelrys Gene Software durchgeführt. Die Kristallstruktur des TDH2-Proteins (PDB: 3A57) diente dabei als Template.

## 3 Ergebnisse

Im ersten Teil werden die genotypischen und phänotypischen Nachweisverfahren, welche im Rahmen dieser Arbeit etabliert wurden, vorgestellt. Der zweite Teil behandelt die Etablierung des zellfreien Systems zur Herstellung und Untersuchung von *V. parahaemolyticus* Hämolysinen. Im dritten Teil wurden die etablierten Methoden aus dem ersten und zweiten Teil bei der Charakterisierung von *trh* positiven *V. parahaemolyticus* Stämmen angewendet.

### 3.1 Etablierung von Methoden

#### 3.1.1 Genotypische Methoden

##### 3.1.1.1 Standard-PCR

Über die Standard-PCR mit Agarosegelelektrophorese wurden *V. parahaemolyticus* Stämme auf einige (potentiell) virulenzassoziierte Gene hin untersucht. Der Großteil der Zielgene wurde nach der PCR-Etablierung ausschließlich in *trh* positiven *V. parahaemolyticus* Stämmen untersucht, welche in 3.3 behandelt werden. Für die PCR-Etablierung und -Validierung zur Detektion der Virulenzgene *tdh*, *trh* und Komponenten des Typ 3 Sekretionssystems 2 (T3SS2 $\alpha$  und des T3SS2 $\beta$ ) sowie der Speziesmarker *toxR* und *vscP* (T3SS1) wurde eine Versuchsreihe mit 44 *V. parahaemolyticus* Isolaten aus Deutschland und dem Ausland durchgeführt (siehe Tabelle 1.1). Die Ergebnisse des Virulotypings sind in Tabelle 3.1 aufgeführt. Alle 44 getesteten Stämme wiesen das *toxR*-Gen und die T3SS1-Komponente *vscP* auf. Bei 13 (29,5 %) Isolaten wurde das *tdh*-Gen detektiert, acht (18,2 %) Isolate wiesen das *trh*-Gen auf, neun (20,5 %) Stämme besaßen beide Hämolysin-Gene (*trh* und *tdh*) und bei 14 (31,8 %) Stämmen wurde weder *tdh* noch *trh* nachgewiesen. Alle *tdh* positiven Stämme trugen T3SS2 $\alpha$ , während *trh* positive Stämme und Stämme mit beiden Hämolysin-Genen T3SS2 $\beta$  aufwiesen.

Um die Prävalenz der Virulenzgene in deutschen *V. parahaemolyticus* Isolaten abschätzen zu können, erfolgte das Virulotyping mit 54 in Deutschland isolierten Stämmen (siehe Tabelle 1.2). Diese Isolate stammten aus der Umwelt (Nord- und Ostsee), dem Lebensmittelhandel und der Primärproduktion von NordseemuscheIn. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.2

aufgeführt. Wie zu erwarten, wiesen alle Isolate die Gene *toxR* und *vscP* (T3SS1) auf. Die untersuchten Virulenzgene zeigten jedoch eine sehr niedrige Prävalenz in dieser Stammaswahl, mit nur vier *trh* positiven Stämmen und einem Stamm, welcher *tdh* und T3SS2 $\alpha$  aufwies. Aufgrund der geringen Häufigkeit der Virulenzmarker *tdh* und *trh* wurde von einer weiteren Charakterisierung dieser Auswahl an Isolaten abgesehen, da es sich bei dem Großteil wahrscheinlich um Umweltstämme ohne pathogenes Potential handelte. Stattdessen wurde der Fokus der Untersuchung auf einheimische *trh* positive *V. parahaemolyticus* Stämme gelegt, um deren pathogenes Potential genauer zu analysieren und mit *trh* positiven Isolaten aus anderen Regionen zu vergleichen (siehe 3.3).

**Tabelle 3.1:** Übersicht der Ergebnisse zur Untersuchung der genotypischen und phänotypischen Eigenschaften von 44 deutschen und ausländischen *V. parahaemolyticus* Stämme.

Anmerkungen zu Tabelle 3.1:

Genotyp <i>tdh</i> <sup>+</sup> / <i>trh</i> <sup>+</sup>	Positive Reaktion
Genotyp <i>tdh</i> <sup>+</sup> / <i>trh</i> <sup>-</sup>	Intermediäre Reaktion*
Genotyp <i>tdh</i> <sup>-</sup> / <i>trh</i> <sup>+</sup>	Negative Reaktion
Genotyp <i>tdh</i> <sup>-</sup> / <i>trh</i> <sup>-</sup>	

\* als intermediäre Reaktion wurden alle schwachen und nicht eindeutigen Reaktionen bezeichnet. Genauere Erläuterungen zu der Bewertung der phänotypischen Tests sind in Material und Methoden (2.3.6) aufgeführt.

Stamm-Nr.	Quelle	isoliert aus	Land	Jahr	toxR	tdh	trh	T3SS1	T3SS2α	T3SS2β	Hämolyse (qualitativ)	Protease	Schwärmverhalten	Biofilm (visuell)	Chitinase
VN-0024	Ringversuch	unbekannt	unbekannt	2006	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+/-	+
VN-0038	Klinisch	Fäzes	Peru	2007	+	+	+	+	-	+	++	++	+	-	+
VN-0045	Klinisch	Fäzes	USA	1988	+	+	+	+	-	+	+/-	+	+	-	+
VN-0046	Klinisch	Fäzes	USA	1994	+	+	+	+	-	+	+/-	-	+	+/-	+
VN-0050	Klinisch	Fäzes	Thailand	1994	+	+	+	+	-	+	+/-	++	+	+/-	+
VN-0055	Umwelt	Auster	USA	1999	+	+	+	+	-	+	+/-	+/-	+	+/-	+
VN-0057	Umwelt	Auster	USA	1999	+	+	+	+	-	+	+/-	+	+	++	+
VN-0058	Umwelt	Auster	USA	1999	+	+	+	+	-	+	+/-	+	+	+/-	+
VN-0077	Klinisch	Fäzes	Norwegen	2001	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+/-	+
VN-0025	Klinisch	Fäzes	Chile	2007	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	+
VN-0039	Klinisch	Fäzes	Spanien	1999	+	+	-	+	+	-	+	++	+	-	+
VN-0041	Klinisch	Fäzes	Peru	2002	+	+	-	+	+	-	++	+/-	+	++	+
VN-0042	Klinisch	Fäzes	Peru	2005	+	+	-	+	+	-	++	+	+	+/-	+
VN-0043	Klinisch	Fäzes	Peru	2000	+	+	-	+	+	-	++	++	+	-	+
VN-0047	Klinisch	Fäzes	Spanien	2004	+	+	-	+	+	-	++	+	+	+	+
VN-0048	Klinisch	Fäzes	Japan	1996	+	+	-	+	+	-	++	+	+	-	+
VN-0051	Umwelt	Meerwasser	Spanien	2006	+	+	-	+	+	-	++	+	+	-	+
VN-0062	Klinisch	Fäzes	Japan	1983	+	+	-	+	+	-	+/-	+	+	-	+
VN-0063	Klinisch	Fäzes	Indien	1996	+	+	-	+	+	-	++	++	+	++	+
VN-0064	Umwelt	Meerwasser	Peru	2002	+	+	-	+	+	-	++	++	+	-	+
VN-0076	Ringversuch	unbekannt	unbekannt	2008	+	+	-	+	+	-	++	+	+	+	+

VN-0082	Klinisch	Fäzes	Chile	2008	+	+	-	+	+	-	++	+/-	+	+	+
VN-0028	Klinisch	Fäzes	Deutschland	1995	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+
VN-0029	Klinisch	Fäzes	Deutschland	1995	+	-	+	+	-	+	+/-	+	+	+	+
VN-0030	Umwelt	Meerwasser	Deutschland	1999	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+
VN-0049	Klinisch	Fäzes	Thailand	1991	+	-	+	+	-	+	+	++	-	+/-	+
VN-0061	Umwelt	Plankton	Spanien	2006	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+
VN-0078	Klinisch	Fäzes	Thailand	2000	+	-	+	+	-	+	-	+	+	++	+
VN-0084	Lebensmittel	unbekannt	UK	2009	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+
VN-0085	Ringversuch	unbekannt	unbekannt	2010	+	-	+	+	-	+	-	+/-	-	++	+
VN-0022	Lebensmittel	Muschel	Deutschland	2010	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+
VN-0027	Lebensmittel	Muschel	Deutschland	2009	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+
VN-0040	Klinisch	Fäzes	Peru	2001	+	-	-	+	-	-	-	+/-	+	+	+
VN-0054	Umwelt	Fisch	Asien	1998	+	-	-	+	-	-	-	++	+	++	+
VN-0060	Umwelt	Plankton	Spanien	2006	+	-	-	+	-	-	-	++	+	++	+
VN-0071	Umwelt	Muschel	Dänemark	1996	+	-	-	+	-	-	-	+	-	++	+
VN-0073	Lebensmittel	Muschel	Niederlande	2008	+	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+
VN-0074	Lebensmittel	Muschel	Italien	2008	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+
VN-0079	Lebensmittel	Muschel	unbekannt	2008	+	-	-	+	-	-	-	+	+	++	+
VN-0080	Lebensmittel	Garnele	Deutschland	2008	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-	+
VN-0081	Lebensmittel	Muschel	Deutschland	2008	+	-	-	+	-	-	-	++	+	+	+
VN-0083	Lebensmittel	Garnele	Deutschland	2009	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-	+
VN-0086	Lebensmittel	Garnele	Deutschland	1995	+	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+
VN-0089	Lebensmittel	Garnele	Deutschland	1995	+	-	-	+	-	-	-	+	++	+	+

**Tabelle 3.2:** Ergebnisse des Virulotypings der 54 in Deutschland isolierten *V. parahaemolyticus* Stämme.

Stamm-Nr.	Quelle	<i>toxR</i>	<i>tdh</i>	<i>trh</i>	T3SS1	T3SS2 $\alpha$
VN-0199	Lebensmittel	+	-	-	+	-
VN-0200	Lebensmittel	+	-	-	+	-
VN-0202	Lebensmittel	+	-	-	+	-
VN-0286	Lebensmittel	+	+	-	+	+
VN-0289	Lebensmittel	+	-	-	+	-
VN-0290	Primärproduktion*	+	-	-	+	-
VN-0291	Primärproduktion*	+	-	-	+	-
VN-0293	Primärproduktion*	+	-	+	+	-
VN-0294	Primärproduktion*	+	-	-	+	-
VN-0295	Lebensmittel	+	-	+	+	-
VN-0296	Lebensmittel	+	-	+	+	-
VN-10003	Primärproduktion*	+	-	-	+	-
VN-10006	Primärproduktion*	+	-	-	+	-
VN-10008	Primärproduktion*	+	-	-	+	-
VN-10014	Primärproduktion*	+	-	-	+	-
VN-10018	Primärproduktion*	+	-	-	+	-
VN-10022	Primärproduktion*	+	-	-	+	-
VN-10027	Primärproduktion*	+	-	-	+	-
VN-10052	Primärproduktion*	+	-	-	+	-
VN-10058	Primärproduktion*	+	-	-	+	-
VN-10074	Primärproduktion*	+	-	-	+	-
VN-10078	Primärproduktion*	+	-	-	+	-
VN-10082	Primärproduktion*	+	-	-	+	-
VN-3102	Umwelt	+	-	-	+	-
VN-3103	Umwelt	+	-	-	+	-
VN-3109	Umwelt	+	-	-	+	-
VN-3122	Umwelt	+	-	-	+	-
VN-3143	Umwelt	+	-	-	+	-
VN-3144	Umwelt	+	-	-	+	-
VN-3149	Umwelt	+	-	-	+	-
VN-3160	Umwelt	+	-	-	+	-
VN-3164	Umwelt	+	-	-	+	-
VN-5002	Lebensmittel	+	-	-	+	-
VN-5051	Lebensmittel	+	-	-	+	-
VN-5052	Lebensmittel	+	-	-	+	-
VN-5055	Lebensmittel	+	-	-	+	-
VN-5067	Lebensmittel	+	-	-	+	-
VN-5074	Lebensmittel	+	-	-	+	-
VN-5077	Lebensmittel	+	-	-	+	-
VN-5084	Lebensmittel	+	-	-	+	-
VN-5090	Lebensmittel	+	-	-	+	-
VN-5097	Lebensmittel	+	-	-	+	-
VN-5104	Lebensmittel	+	-	-	+	-
VN-5110	Lebensmittel	+	-	-	+	-
VN-5111	Lebensmittel	+	-	-	+	-
VN-5112	Lebensmittel	+	-	-	+	-
VN-5118	Lebensmittel	+	-	-	+	-
VN-5119	Lebensmittel	+	-	-	+	-
VN-5120	Lebensmittel	+	-	-	+	-
VN-5131	Lebensmittel	+	-	-	+	-

Stamm-Nr.	Quelle	<i>toxR</i>	<i>tdh</i>	<i>trh</i>	T3SS1	T3SS2 $\alpha$
VN-5189	Lebensmittel	+	-	+	+	-
VN-5208	Lebensmittel	+	-	-	+	-
VN-5247	Lebensmittel	+	-	-	+	-
VN-5262	Lebensmittel	+	-	-	+	-

\*Muschelzuchten im Wattenmeer an der deutschen Nordseeküste

### 3.1.1.2 Real-Time PCR

Für die Detektion der *tdh*-Varianten *tdh1* und *tdh2* sowie der *trh*-Varianten *trh1* und *trh2* wurde eine Real-Time Multiplex-PCR mit Taqman-Sonden (Messelhäusser *et al.* (2010)) durchgeführt. Hierzu wurden sechs *V. parahaemolyticus* Stämme, welche laut Standard-PCR sowohl *tdh* als auch *trh* in ihrem Genom aufwiesen, getestet. Zusätzlich wurden drei *tdh* positive Stämme inklusive des pandemischen Stammes RIMD2210633 untersucht. Als Kontrolle diente ein nicht-toxischer Stamm (VN-0022). Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.3 gezeigt. Von den sechs *tdh* und *trh* positiven Stämmen zeigten alle ein Signal für *tdh2*, jedoch keines für *tdh1*. Alle sechs Stämme trugen außerdem die *trh1*-Genvariante. Von den drei ausschließlich *tdh* positiven Stämmen trugen zwei beide *tdh*-Genvarianten (*tdh1* und *tdh2*), während ein Stamm (VN-0059) nur *tdh1* aufwies, welches später zellfrei exprimiert wurde. Bei dem Kontrollstamm wurde kein Signal detektiert.

**Tabelle 3.3:** Ergebnisse der Real-Time PCR zur Detektion von *tdh*- und *trh*-Varianten.

Stamm	<i>trh1</i>	<i>trh2</i>	<i>tdh1</i>	<i>tdh2</i>
VN-0038	+	-	-	+
VN-0045	+	-	-	+
VN-0055	+	-	-	+
VN-0056	-	-	+	+
VN-0057	+	-	-	+
VN-0058	+	-	-	+
VN-0059	-	-	+	-
VN-0077	+	-	-	+
VN-0022	-	-	-	-
RIMD2210633	-	-	+	+

### 3.1.2 Inverse PCR – Konstruktion von Primern zur Amplifikation des gesamten *trh*-Gens

Über die Methode der inversen PCR konnten die flankierenden Sequenzen des *trh*-Gens bestimmt und als Grundlage für die Konstruktion der Primer UreR-forw (5'- CCT GAA CAG TGT TCA AGA ATT G-3') und IS-ele-Rev1 (5'- GTA ATG GCT AAG TCG CTG AAC-3') verwendet werden. Der Forward-Primer UreR-forw bindet an eine Sequenz des Gens *ureR*, welches im Urease-Gencluster lokalisiert ist und für einen Transkriptionsaktivator codiert. Der Reverse-Primer IS-ele-Rev1 bindet an eine Sequenz innerhalb einer Insertionssequenz (IS-Element), welche benachbart zum *trh*-Gen liegt. Der Primer IS-ele-Rev1 wurde in Kombination mit dem Forward-Primer VPtrhx1\_F und VPtrhx4\_F erfolgreich für die Amplifikation und Sequenzierung des *trh*-Gens von mehreren *V. parahaemolyticus* Stämmen eingesetzt (siehe Tabelle C 1).

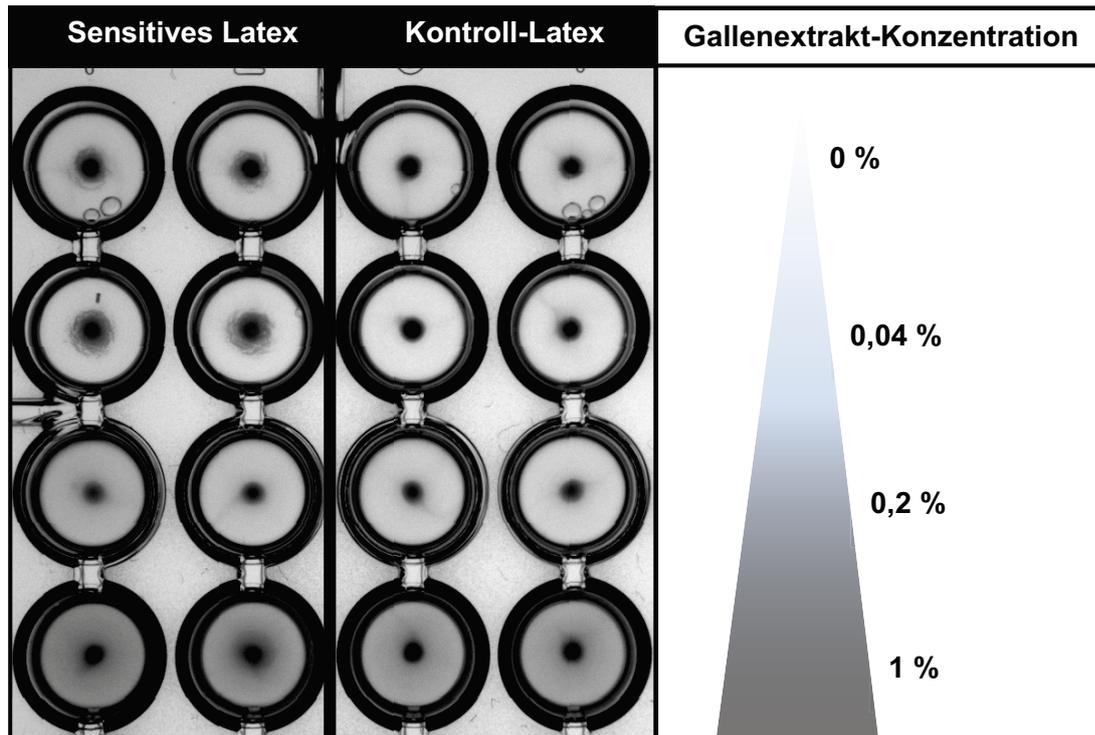
### 3.1.3 Agglutinationstest mit Kulturüberständen

Zur Untersuchung der Hämolyisin-Sekretion wurden ein *tdh* positiver und ein *trh* positiver *V. parahaemolyticus* Stamm in unterschiedlichen Konzentrationen von Gallenextrakt (0 %, 0,04 %, 0,2 % und 1 %) kultiviert. Gallenextrakt wirkt induzierend auf die Expression von TDH (Osawa *et al.* 1996) und TRH1 (3.3.4). Aufgrund der sehr niedrigen TRH-Expression erfolgte eine Aufkonzentrierung des Kulturüberstandes des *trh* positiven Stammes.

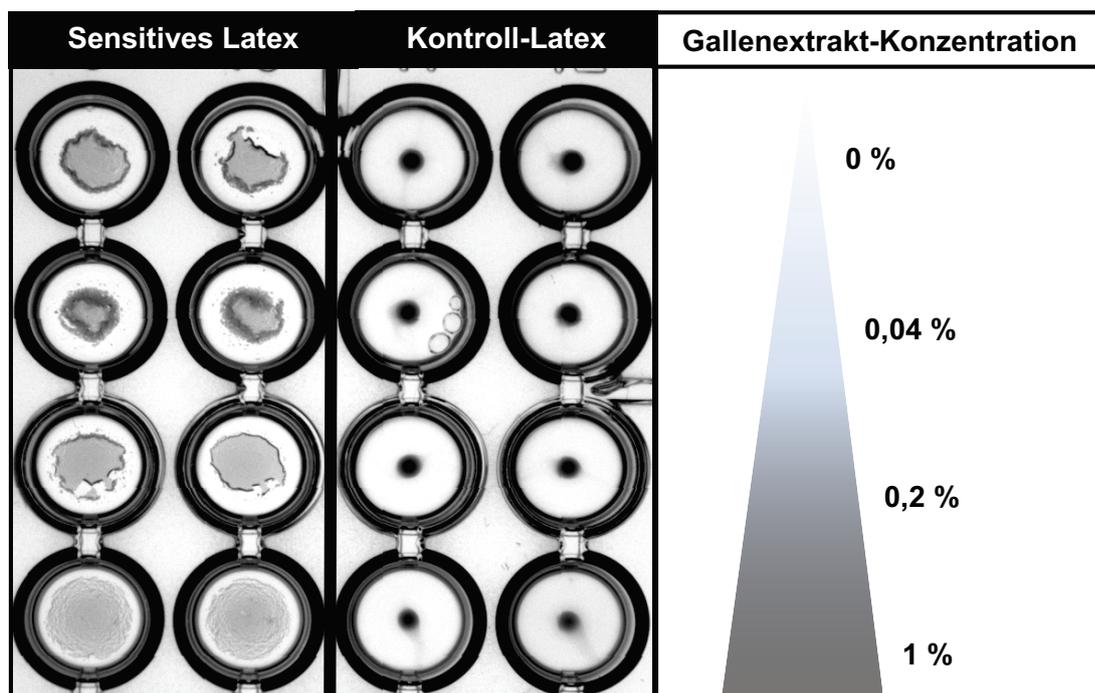
Für den immunologischen Nachweis der Hämolyisine im Kulturüberstand wurde ein Agglutinationstest (KAP-RPLA) durchgeführt. Die in dem Test verwendeten anti-TDH-Antikörper sind an Latexpartikel gekoppelt, welche sich bei einer Antigen-Antikörper-Reaktion flächig vernetzen. Da TDH und TRH eine ähnliche Antigenität besitzen, wurde untersucht, ob auch TRH mithilfe des Tests nachgewiesen werden kann. Um unspezifische Reaktionen auszuschließen, wurde jeder Ansatz parallel mit Kontroll-Latex ohne Antikörper getestet. Die Ergebnisse in Abbildung 3.1 zeigen eine deutliche Agglutination in den Ansätzen mit sensitivem Latex und dem Kulturüberstand des *tdh* positiven Stammes. Dabei wurde mit zunehmender Gallenextrakt-Konzentration eine Zunahme der Agglutination beobachtet. Bei den Ansätzen mit sensitivem Latex und dem Kulturüberstand des *trh* positiven Stammes lässt sich eine sehr leichte bzw. leichte Agglutination bei einer Gallenextrakt-Konzentration von 0 % bzw. 0,04 % beobachten. Alle Ansätze mit Kontroll-

Latex zeigten keine Agglutination, die Latexpartikel präzipitierten in kompakter Form (knopfförmig).

[A]



[B]



**Abbildung 3.1: Ergebnis des Agglutinationstests (KAP-RPLA) mit einem aufkonzentrierten Kulturüberstand eines *trh* positiven *V. parahaemolyticus* Stammes [A] und mit einem nicht aufkonzentrierten Kulturüberstand eines *tdh* positiven *V. parahaemolyticus* Stammes [B].**

### 3.1.4 Phänotypische Methoden

Für die Untersuchung potentiell pathogener phänotypischer Eigenschaften wurden einige qualitative Nachweisverfahren etabliert und mit der oben genannten Auswahl an 44 *V. parahaemolyticus* Isolaten aus dem In- und Ausland getestet (siehe Tabelle 3.1). Analysiert wurde die hämolytische Aktivität auf Wagatsuma-Agar mit humanem Blut, die proteolytische Aktivität auf Magermilch-Agar, das Schwärmverhalten auf viskosen Oberflächen, die Fähigkeit einen Biofilm zu bilden und die Chitinase-Produktion. Bei der Auswertung wurde unterschieden zwischen einer sehr starken Reaktion (++), einer starken Reaktion (+), einer schwachen Reaktion (+/-) und keiner Reaktion (-). Die Hämolyse auf Wagatsuma-Agar ist eine klassische Methode zum Nachweis TDH-produzierender *V. parahaemolyticus* Stämme (Miyamoto *et al.* 1969).

Die Untersuchungen haben ergeben, dass fast alle *tdh* positiven Stämme eine hämolytische Aktivität von sehr stark bis stark zeigten. Nur der Referenzstamm RIMD2210633 zeigte eine schwache Reaktion. Dagegen wurde bei fast allen Isolaten, die beide Hämolsin-Gene (*tdh* und *trh*) aufwiesen, eine schwache Hämolyse beobachtet, nur VN-0038 zeigte eine sehr starke sowie VN-0077 eine starke Hämolyse. *Trh* positive Stämme zeigten größtenteils keine hämolytische Aktivität auf Wagatsuma-Agar, bis auf VN-0029 (schwach) und VN-0049 (stark). Alle nicht-toxischen (*tdh* und *trh* negativ) *V. parahaemolyticus* Stämme zeigten keine Hämolyse. Eine proteolytische Aktivität auf Magermilch-Agar konnte bei fast allen Isolaten nachgewiesen werden, nur ein Stamm zeigte keine Aktivität. Der Nachweis von sezernierter Chitinase auf Chitin-Agar war bei allen getesteten *V. parahaemolyticus* Stämmen erfolgreich. Die Fähigkeit zu Schwärmen wurde auf Schwärmagar (Jaques *et al.* 2005) und auf einem Feuchtagar untersucht. Konnte man auf einem der beiden Agartypen Schwärmen beobachten, so wurde dies als positiv bewertet. Von insgesamt 44 Stämmen zeigten lediglich sieben Isolate kein Schwärmverhalten. Im Biofilmtest mit anschließender visueller Auswertung zeigte sich unter den getesteten *V. parahaemolyticus* Stämmen ein diverses Bild mit einigen starken Biofilmbildnern bis hin zu Stämmen, welche keinen Biofilm produzierten.

## 3.2 Entwicklung des zellfreien Systems zur Untersuchung von Hämolytinen

### 3.2.1 Vergleich: *E. coli* – und Insektenzelllysate

Bei beiden Systemen wird das Template für die zellfreie Proteinsynthese zunächst über eine zweistufige Expressions-PCR (E-PCR) amplifiziert bzw. modifiziert. Das System basierend auf *E. coli*-Lysat zeichnet sich durch eine gekoppelte *in vitro* Transkriptions- und Translationsreaktion aus. Dagegen ist das zellfreie System, welches Insektenzelllysate als Expressionsapparat nutzt, entkoppelt, d.h. Transkription und Translation sind zwei getrennt voneinander ablaufende Reaktionen.

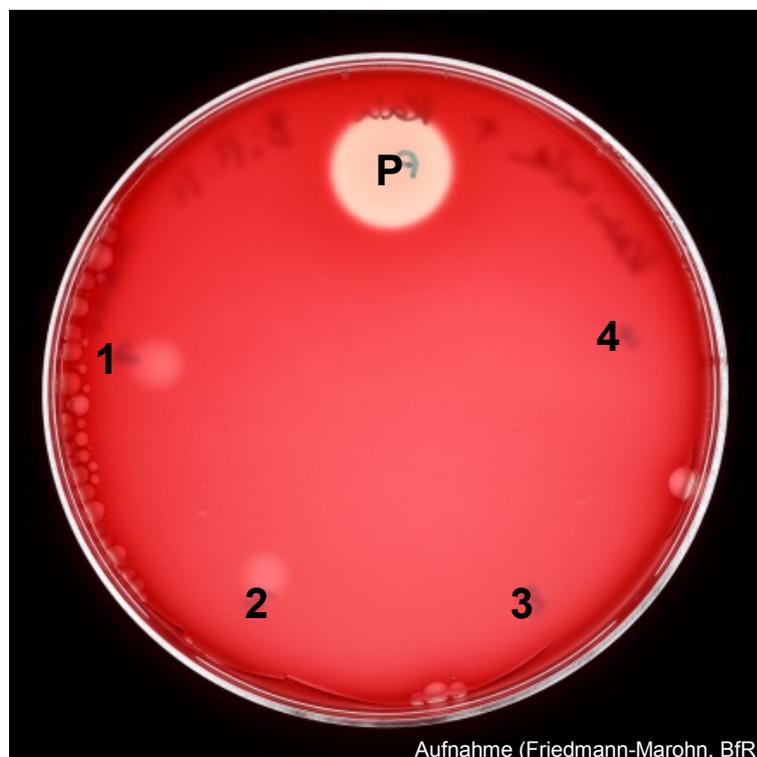
#### 3.2.1.1 Zellfreie Proteinsynthese im eukaryotischen System

Zunächst wurde eine zellfreie Expression im eukaryotischen System mit den vier folgenden Hämolytinen durchgeführt: TDH1 (VN-0059), TDH2 (Plasmid pJET2-TDH2), TRH1(VN-0024) und TRH2 (VN-0029). Da die meisten *tdh2* positiven *V. parahaemolyticus* Stämme zusätzlich ein *tdh1*-Gen in ihrem Genom aufweisen, wurde ein Plasmid mit dem *tdh2*-Gen verwendet, um dieses isoliert testen zu können. Bei Stamm VN-0059 konnte zuvor über eine Real-Time PCR bestätigt werden, dass das Genom „nur“ das *tdh1*-Gen, jedoch nicht das *tdh2*-Gen aufwies (siehe Tabelle 3.3). Alle vier Hämolytine wurden ohne Signalsequenz, also als sog. reifes Protein (mature protein) mittels zellfreier Synthese exprimiert, da das translatierte *Vibrio*-spezifische Signalpeptid für den intrazellulären Transport im eukaryotischen System nicht erkannt wird. Des Weiteren wurde über die E-PCR2 an alle Hämolytin-Varianten ein His-Tag am C-Terminus angehängt, um die Möglichkeit einer Proteinaufreinigung zu gewährleisten.

Sowohl im Autoradiogramm als auch im Flüssigkeitsszintillator wurden geringe Mengen an zellfrei synthetisiertem Protein von jedem Hämolytin detektiert. Aufgrund der sehr geringen Pipettier Volumina konnte keine quantitative Aussage über die genauen Proteinausbeuten und somit auch nicht über den Einfluss der Vesikel gemacht werden. Ein Vergleich der Bandenstärke der markierten Proteine im Autoradiogramm zwischen dem eukaryotischen und dem prokaryotischen System zeigte jedoch eine deutlich höhere Proteinausbeute in den Ansätzen basierend auf *E. coli*-Lysat.

### 3.2.1.2 Evaluation der Funktionalität über Hämolyse (eukaryot. System)

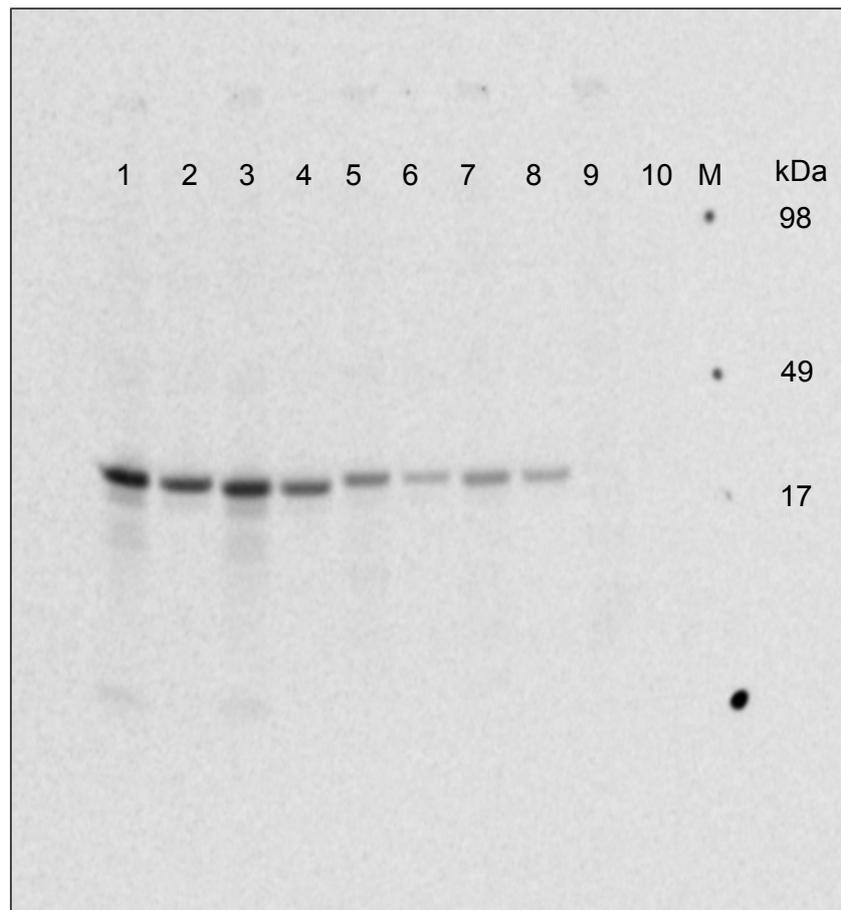
Um die Aktivität der zellfrei exprimierten Hämolysin-Varianten zu testen, wurden die Translationsansätze (10  $\mu$ l) auf Schaf-, Kaninchen- und humanen Blutplatten aufgetropft und über Nacht inkubiert. Neben der Positivkontrolle Triton X-100 ließ sich nur bei beiden Translationsansätzen mit TDH2 (ohne Vesikel: Spot 1; mit Vesikel: Spot 2) eine leichte hämolytische Aktivität auf Kaninchenblut beobachten (siehe Abbildung 3.2), während die Translationsansätze mit TDH1, TRH1 und TRH2 keine Reaktion zeigten. Weder auf Schafblut noch auf humanem Blut konnte eine hämolytische Reaktion aller synthetisierter Hämolysin-Varianten festgestellt werden (Fotos nicht gezeigt).



**Abbildung 3.2: Spotttest auf Kaninchenerythrozyten.** Translationsansätze (10  $\mu$ l) basierend auf Insektenzelllysat. 1: mTDH2-His (ohne Vesikel), 2: mTDH2-His (mit Vesikel), 3: mTDH1-His (ohne Vesikel), 4: mTDH1-His (mit Vesikel), P: Triton X-100 (Positivkontrolle). m = mature protein

### 3.2.1.3 Zellfreie Proteinsynthese im prokaryotischen System

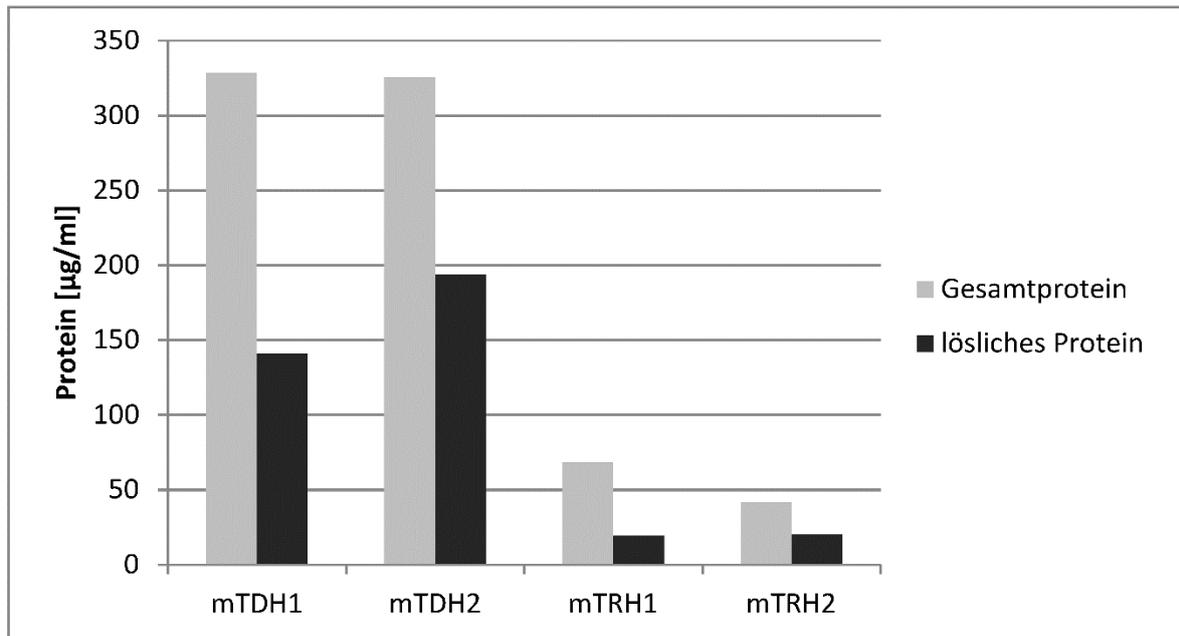
Die gleichen Hämolysin-Varianten (TDH1, TDH2, TRH1 und TRH2) wurden anschließend im *E. coli*-Lysat basierten System zellfrei exprimiert. Die Homogenität und die Größe der zellfrei hergestellten und <sup>14</sup>C-markierten Proteine wurden in einem SDS-PAGE mit anschließender Messung der Radioaktivität im Phosphor-Imager überprüft (siehe Abbildung 3.3). Wie in Abbildung 3.4 zu sehen, war der lösliche Proteinanteil der TDH-Varianten mit bis zu 194 µg/ml deutlich höher im Vergleich zu den löslichen Ausbeuten der TRH-Varianten von ca. 20 µg/ml. Der Gesamtproteinanteil der TRH-Varianten betrug ca. 320 µg/ml und der Gesamtproteinanteil der TRH-Varianten belief sich auf 68 µg/ml (mTRH1) und 42 µg/ml (mTRH2). Sehr ähnliche Proteinausbeuten von TRH1 und TRH2 wurden in einem Wiederholungsexperiment zur zellfreien Proteinsynthese mit *E. coli*-Lysat erzielt. Hierbei wurden außerdem die beiden TRH-Varianten mit Signalpeptid, also als Vorläuferprotein (preprotein) exprimiert, welche einen Gesamtproteinanteil von 344 µg/ml (preTRH1) und 230 µg/ml (preTRH2) und einen löslichen Proteinanteil von 19 µg/ml (preTRH1) und 11 µg/ml (preTRH2) aufwiesen.



**Abbildung 3.3: Autoradiogramm der im prokaryotischen System hergestellten Hämolysine.** Qualitative Analyse der  $^{14}\text{C}$ -Leucin-markierten Proteine nach einer Aceton-Fällung und nachfolgender Auftrennung über SDS-PAGE und Autoradiographie. Jeweils 5  $\mu\text{l}$ -Aliquots an Gesamtprotein (Suspension) und löslichem Protein (Überstand) wurden aufgetragen.

1: mTDH2-His (Gesamtprotein), 2: mTDH2-His (lösliches Protein), 3: mTDH1-His (Gesamtprotein), 4: mTDH1-His (lösliches Protein), 5: mTRH1-His (Gesamtprotein), 6: mTRH1-His (lösliches Protein), 7: mTRH2-His (Gesamtprotein), 8: mTRH2-His (lösliches Protein), 9: NTC (Gesamtprotein), 10: NTC (lösliches Protein), M: Marker.

m = mature protein

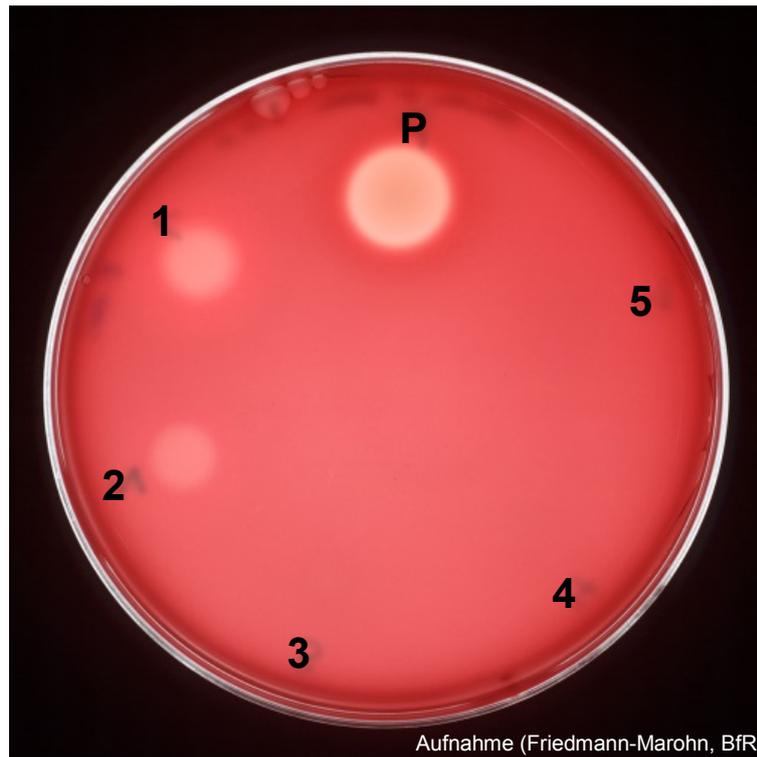


**Abbildung 3.4: Proteinausbeuten der im prokaryotischen System hergestellten Hämolyse.** Quantitative Analyse der  $^{14}\text{C}$ -Leucin-markierten Proteine nach einer TCA-Fällung im Flüssigkeitsszintillator. Der Gesamtproteinanteil in der Suspension und der Anteil an löslichem Protein im Überstand wurden analysiert.

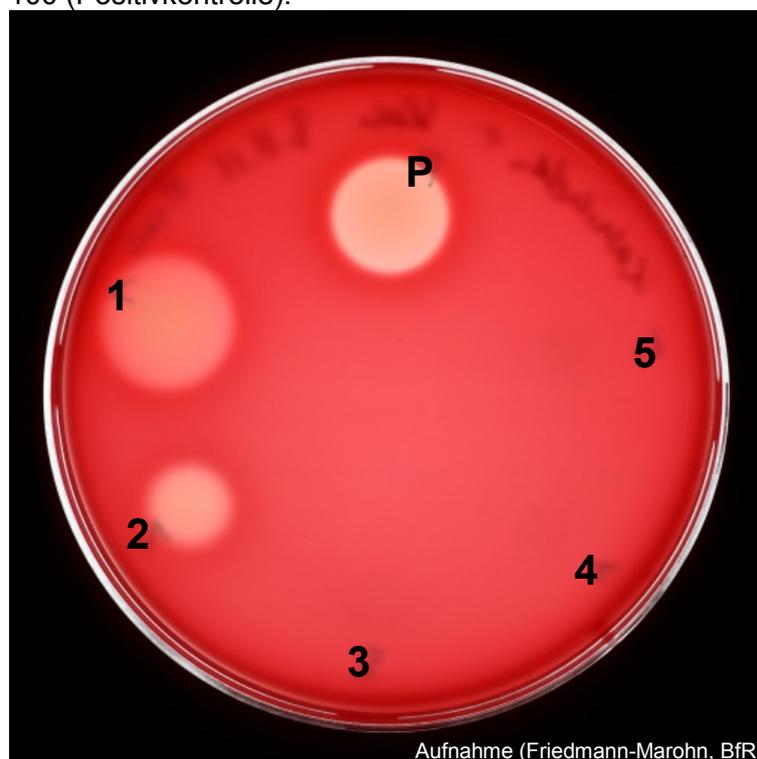
m = mature protein

### 3.2.1.4 Evaluation der Funktionalität über Hämolyse (prokaryot. System)

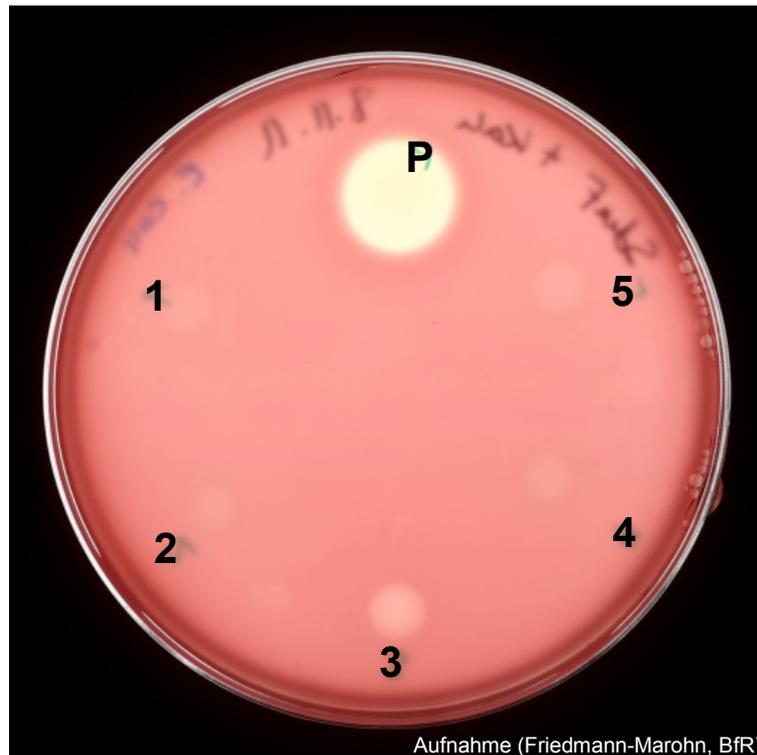
Beim Aktivitätstest auf Schaf-, Kaninchen- und humanen Blutplatten zeigten beide mTDH-Varianten eine starke Hämolyse auf der Kaninchen- und der humanen Blutplatte, wobei die hämolytische Aktivität auf humanem Blut durch beide TDH-Varianten ähnlich war, jedoch mTDH2 auf Kaninchenblut eine wesentlich stärkere Reaktion hervorrief als mTDH1 (siehe Abbildungen 3.5 und 3.6). Auf Schafblut konnte für beide mTDH-Varianten keine Hämolyse beobachtet werden. Gegensätzlich dazu zeigten beide mTRH-Varianten keine hämolytische Aktivität auf der Kaninchen- und der humanen Blutplatte. Auf der Schafblutplatte zeigte mTRH1 eine schwache Reaktion, während für mTRH2 keinerlei Aktivität festgestellt wurde (siehe Abbildung 3.7). Dieses Ergebnis wurde in zwei unabhängigen Experimenten bestätigt. Die zellfrei hergestellten TRH-Vorläuferproteine, preTRH1 und preTRH2, zeigten keine hämolytische Aktivität auf Schafblut.



**Abbildung 3.5: Spotttest auf humanen Erythrozyten.** Translationsansätze (10  $\mu$ l) basierend auf *E. coli*-Lysat. 1: mTDH2-His, 2: mTDH1-His, 3: mTRH1-His, 4: mTRH2-His, 5: NTC, P: Triton X-100 (Positivkontrolle).



**Abbildung 3.6: Spotttest auf Kaninchenerthrozyten.** Translationsansätze (10  $\mu$ l) basierend auf *E. coli*-Lysat. 1: mTDH2-His, 2: mTDH1-His, 3: mTRH1-His, 4: mTRH2-His, 5: NTC, P: Triton X-100 (Positivkontrolle).

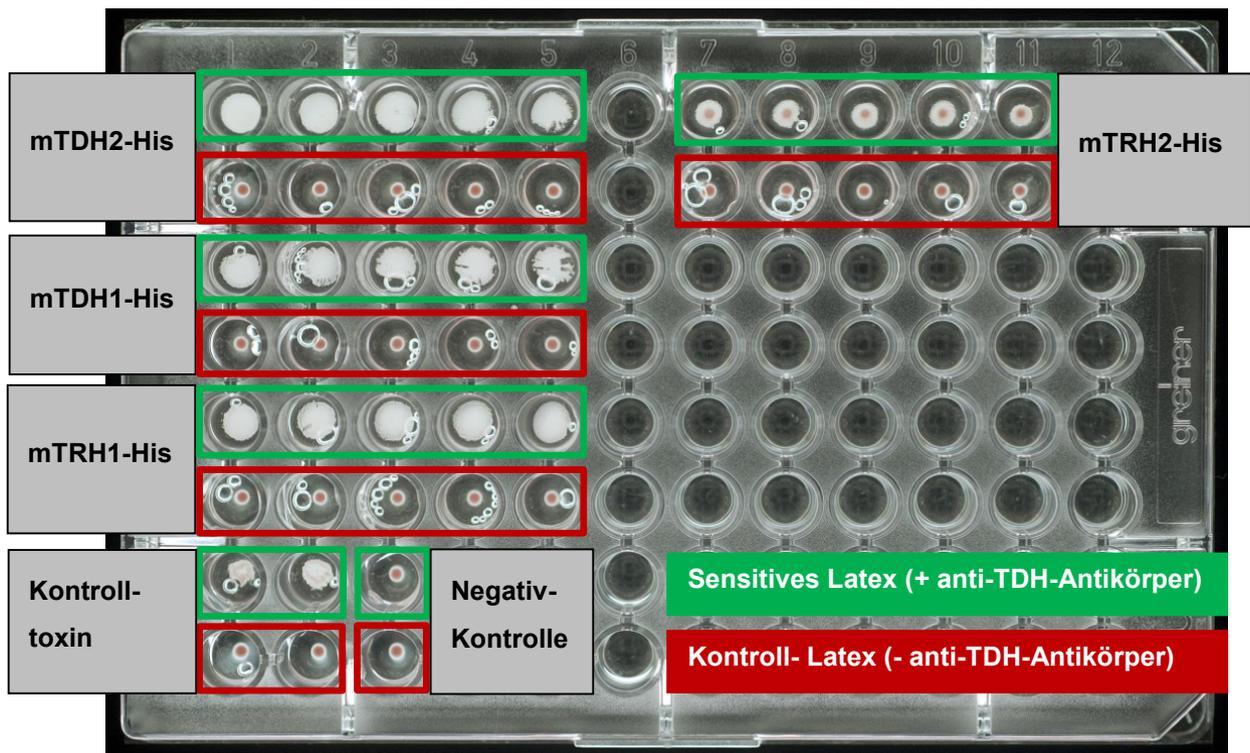


**Abbildung 3.7: Spotttest auf Schaferythrozyten.** Translationsansätze (10  $\mu$ l) basierend auf *E. coli*-Lysat. 1: mTDH2-His, 2: mTDH1-His, 3: mTRH1-His, 4: mTRH2-His, 5: NTC, P: Triton X-100 (Positivkontrolle).

### 3.2.1.5 Immunologischer Nachweis der zellfrei synthetisierten Proteine

Für den spezifischen Nachweis der TDH-Varianten (mTDH1-His und mTDH2-His) wurde ein Agglutinationstest wie in 2.3.7.5 beschrieben durchgeführt. Der Nachweis erfolgte mit einem Kit, in welchem anti-TDH-Kaninchenantikörper an Latexpartikel gekoppelt sind (KAP-RPLA, Denka Seiken, Japan). Kommt es zu einer Antigen-Antikörper-Reaktion, so werden die Latexpartikel flächenförmig miteinander vernetzt. Die zellfreien Translationsansätze wurden nach Angaben des Herstellers mit dem sensitiven Latexpartikeln (mit anti-TDH-Antikörper) und dem Kontrolllatex (ohne anti-TDH-Antikörper) verdünnt und über Nacht inkubiert. Aufgrund der ähnlichen Antigenität von TDH und TRH wurden zusätzlich die zellfrei hergestellten TRH-Varianten (mTRH1-His und mTRH2-His) getestet. Für beide TDH-Varianten ließ sich eine starke Agglutination der TDH-Antikörper-behafteten Latexpartikel in allen Verdünnungsstufen beobachten. Auch mTRH1-His zeigte eine gleich starke Reaktion, während die Agglutination bei mTRH2-His geringer ausfiel, jedoch auch als positiv bewertet wurde (siehe Abbildung 3.8).

[A]



[B]

Toxin		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
mTDH2-His	A	2 <sup>1</sup> Sen. Latex	2 <sup>2</sup> Sen. Latex	2 <sup>3</sup> Sen. Latex	2 <sup>4</sup> Sen. Latex	2 <sup>5</sup> Sen. Latex		2 <sup>1</sup> Sen. Latex	2 <sup>2</sup> Sen. Latex	2 <sup>3</sup> Sen. Latex	2 <sup>4</sup> Sen. Latex	2 <sup>5</sup> Sen. Latex	mTRH2-His
mTDH2-His	B	2 <sup>1</sup> Kontroll Latex	2 <sup>2</sup> Kontroll Latex	2 <sup>3</sup> Kontroll Latex	2 <sup>4</sup> Kontroll Latex	2 <sup>5</sup> Kontroll Latex		2 <sup>1</sup> Kontroll Latex	2 <sup>2</sup> Kontroll Latex	2 <sup>3</sup> Kontroll Latex	2 <sup>4</sup> Kontroll Latex	2 <sup>5</sup> Kontroll Latex	mTRH2-His
mTDH1-His	C	2 <sup>1</sup> Sen. Latex	2 <sup>2</sup> Sen. Latex	2 <sup>3</sup> Sen. Latex	2 <sup>4</sup> Sen. Latex	2 <sup>5</sup> Sen. Latex							
mTDH1-His	D	2 <sup>1</sup> Kontroll Latex	2 <sup>2</sup> Kontroll Latex	2 <sup>3</sup> Kontroll Latex	2 <sup>4</sup> Kontroll Latex	2 <sup>5</sup> Kontroll Latex							
mTRH1-His	E	2 <sup>1</sup> Sen. Latex	2 <sup>2</sup> Sen. Latex	2 <sup>3</sup> Sen. Latex	2 <sup>4</sup> Sen. Latex	2 <sup>5</sup> Sen. Latex							
mTRH1-His	F	2 <sup>1</sup> Kontroll Latex	2 <sup>2</sup> Kontroll Latex	2 <sup>3</sup> Kontroll Latex	2 <sup>4</sup> Kontroll Latex	2 <sup>5</sup> Kontroll Latex							
Kontrolltoxin	G	2 <sup>1</sup> Sen. Latex	2 <sup>2</sup> Sen. Latex	Diluent + Sen. Latex	Negativ-kontrolle								
Kontrolltoxin	H	2 <sup>1</sup> Kontroll Latex	2 <sup>2</sup> Kontroll Latex	Diluent + Kontroll Latex	Negativ-kontrolle								

**Abbildung 3.8: Immunologischer Nachweis der im prokaryotischen System zellfrei hergestellten Hämolysine.** 5 µl-Aliquots des Gesamtproteins wurden 2fach über fünf Stufen verdünnt und im Agglutinationstest mit anti-TDH-Antikörper beschichteten Latex-Beads (Sensitives Latex) sowie unbeschichteten Kontroll-Latex-Beads getestet. Als Positiv-Kontrolle diente das Kontrolltoxin [A]. Pipettierschema des Agglutinationstests [B].

### 3.2.2 Vergleich der zellfrei synthetisierten TDH-Konstrukte

Auch wenn gezeigt werden konnte, dass eine zellfreie Synthese der *V. parahaemolyticus* Hämolyse im eukaryotischen System möglich ist, so wird empfohlen, ein System zu wählen, welches der nativen Umgebung der zellfrei exprimierten Proteine weitestgehend entspricht (Kubick 2012). Des Weiteren waren die erzielten Proteinausbeuten im prokaryotischen System basierend auf *E. coli*-Lysat deutlich höher, so dass dieses in den nachfolgenden Versuchen zur zellfreien Proteinsynthese verwendet wurde.

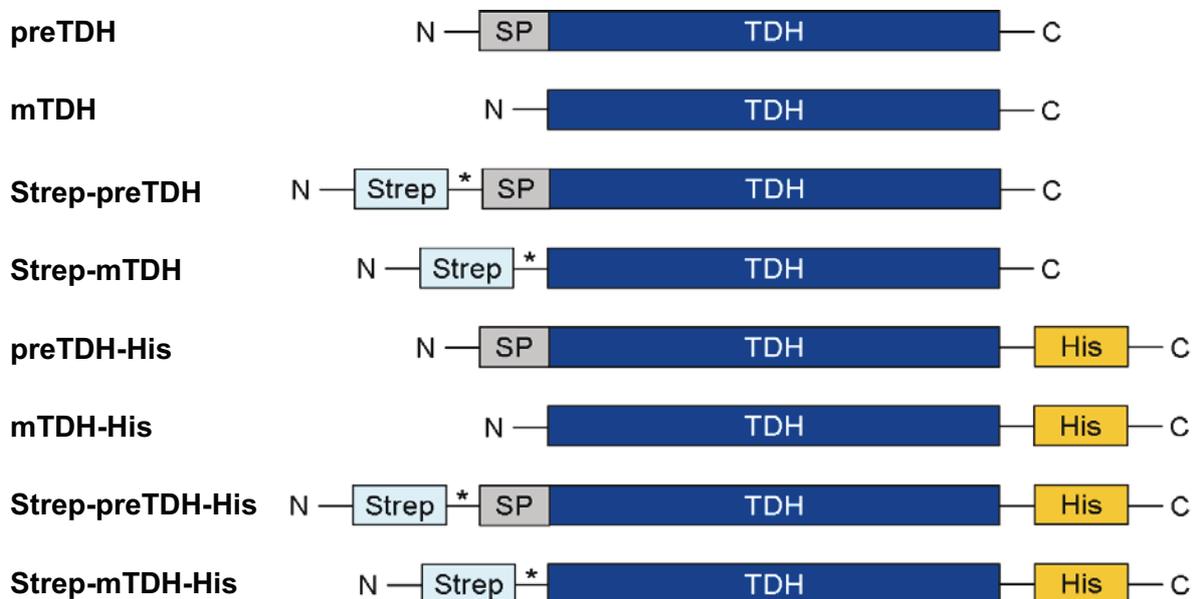
#### 3.2.2.1 PCR-Amplifikation der TDH-Konstrukte

Acht verschiedene TDH-Konstrukte wurden mithilfe der zellfreien Proteinsynthese auf Basis von *E. coli*-Lysat hergestellt. Als Template für die zweistufige E-PCR wurde die genomische DNA des pandemischen *V. parahaemolyticus* Stammes PMA1.6 mit dem Serotyp O3:K6 eingesetzt (siehe Abbildung 3.10). Die Oligonukleotide, welche in der E-PCR1 eingesetzt wurden, bestehen aus genspezifischen Sequenzen sowie Adaptersequenzen für die Primer der zweiten PCR-Stufe (E-PCR2). Alle genspezifischen Primersequenzen wurden der kodierenden Sequenz (coding DNA sequence = CDS) des *tdh2*-Gens entnommen. Zum einen wurde die gesamte CDS amplifiziert, also das *tdh2*-Gen mit Signalsequenz, welches für das TDH2-Vorläuferprotein (preTDH) codiert. Der für die Amplifikation der kompletten *tdh*-CDS verwendete Forward-Primer enthielt die Sequenz 5'-AAG TAC CGA TAT TTT GC-3', welche der Nukleotidabfolge direkt hinter dem Startcodon ATG entspricht. Zum anderen wurde das *tdh*-Gen ohne Signalsequenz amplifiziert, was der Sequenz entspricht, die für das reife Protein codiert.

Für die Amplifikation der *tdh*-Gensequenz, welche für das reife TDH-Protein (mTDH) codiert, wurde ein Forward-Primer mit der genspezifischen Sequenz 5'-TTT GAG CTT CCA TCT GT CCC-3' verwendet. Diese Sequenz ist identisch mit der 3'-Region unterhalb der Signalsequenz. Die Signalsequenz codiert für das Signalpeptid, welches während der Proteinsekretion abgespalten wird. Alle Reverse-Primer enthielten die genspezifische Sequenz 5'-TTG TTG ATG TTT ACA TTC AA-3', welche der Sequenz oberhalb des Stoppcodons entspricht. Der pandemische Stamm PMA1.6 enthält zwei TDH-Varianten (*tdh1* und *tdh2*) in seinem Genom, welche eine identische Länge aufweisen. Der zur Amplifikation der kodierenden Sequenz des mTDHs verwendete Forward-Primer heftet sich an die Sequenz beider TDH-Varianten, während der zur Amplifikation der gesamten CDS

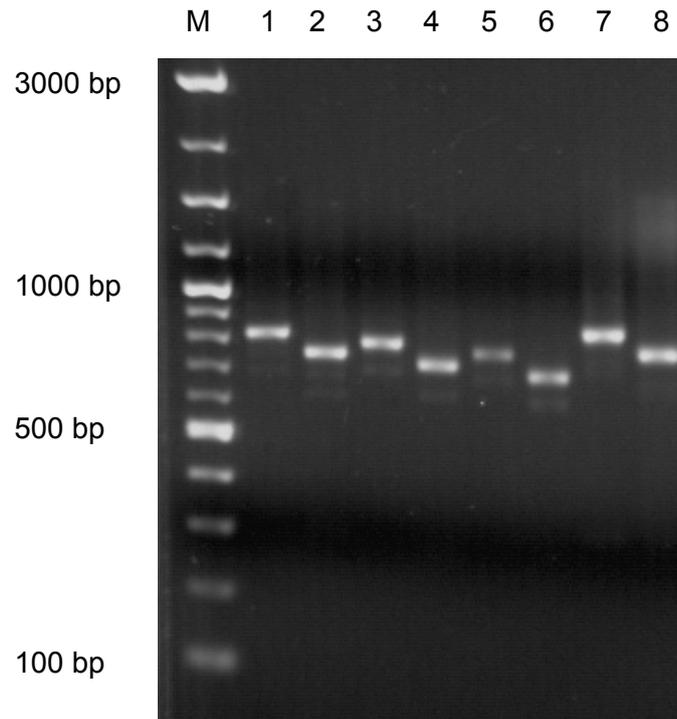
verwendete Forward-Primer mit seinem genspezifischen Teil nur die Signalsequenz des *tdh2*-Gens bindet. Das liegt daran, dass sich die Signalsequenz des *tdh1*-Gens innerhalb der Primer-Bindungsstelle in zwei Nukleotiden von der *tdh2*-Signalsequenz unterscheidet (siehe Abbildung B 2). Folglich enthalten E-PCR1-Produkte, welche für die Synthese des mTDHs eingesetzt werden, Amplifikate des *tdh1*- und *tdh2*-Gens. Dagegen enthalten die E-PCR1-Produkte für die Synthese des Vorläuferproteins preTDH ausschließlich Amplifikate, welche für *tdh2* kodieren.

Während der zweiten PCR-Stufe (E-PCR2) wurden neben regulatorischen Sequenzen auch Sequenzen für Protein-Tags in die kodierende Region der Hämolyse integriert. Damit sollte die Möglichkeit einer schnellen Aufreinigung der zellfrei hergestellten Hämolyse gewährleistet sein. Die acht verschiedenen TDH-Konstrukte sind in Abbildung 3.9 gezeigt. Die verschiedenen Templates trugen entweder die Sequenz für ein N-terminales Strep-Tag mit einer Spaltstelle für den Protease-Faktor Xa, ein C-terminales 6xHis-Tag, beide Tags (N-terminales Strep-Tag und C-terminales 6xHis-Tag) oder gar kein Tag. Somit sollte untersucht werden, ob die Signalsequenz und die verwendeten Proteintags einen Einfluss auf die Proteinausbeuten und die Proteinfunktionalität haben. Alle E-PCR2-Produkte wurden in der erwarteten Größe und mit gleicher Effizienz produziert und anschließend direkt für die zellfreie Synthese der TDH-Konstrukte eingesetzt.



**Abbildung 3.9: Schema der zellfrei synthetisierten TDH-Konstrukte.**

Abkürzungen: SP = Signalpeptid, Strep = Strep-Tag, His = His-Tag, pre = Vorläuferprotein ("preprotein"), m = reifes Protein ("mature protein"), \*Spaltungsstelle für Protease-Faktor Xa.

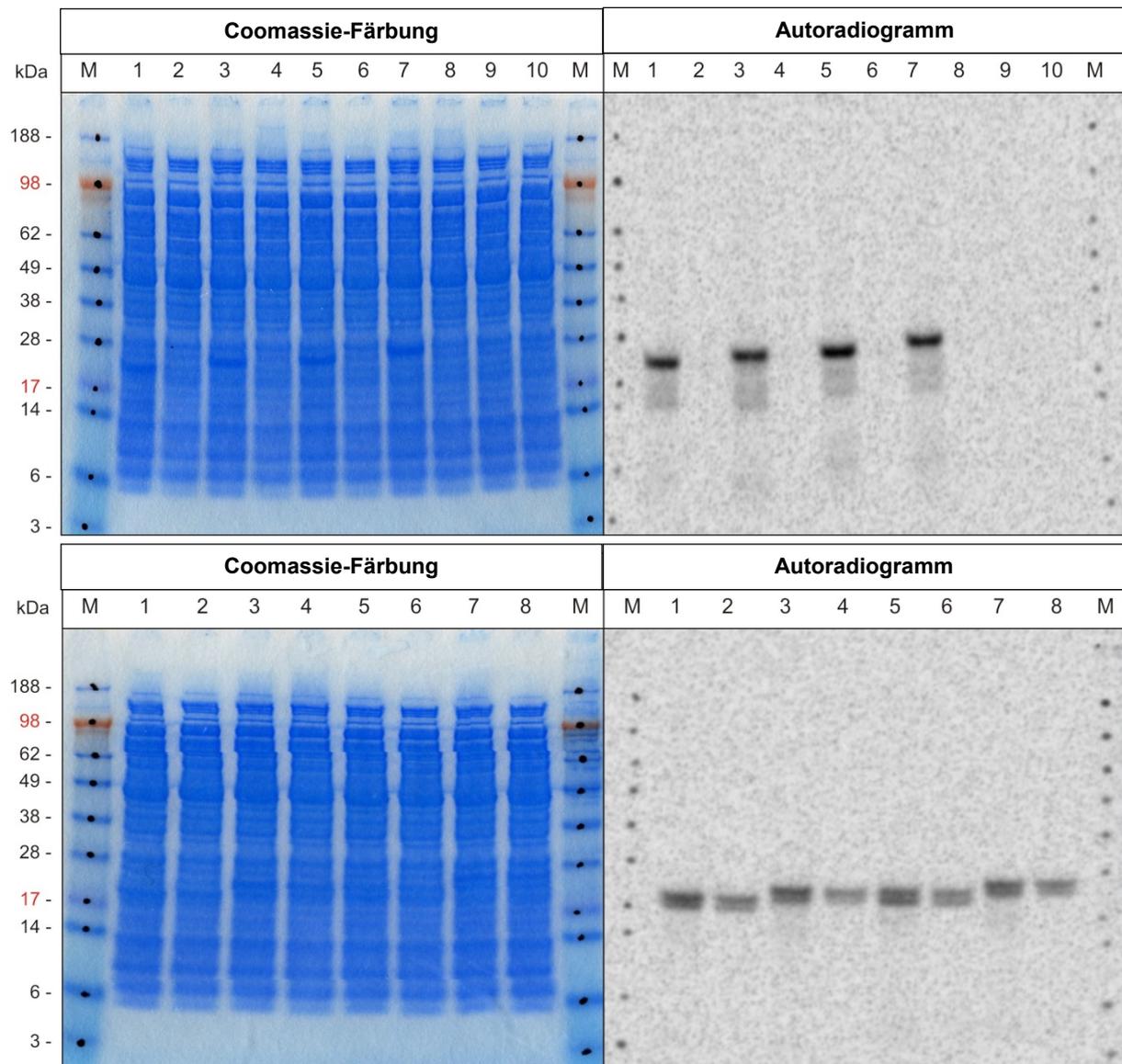


**Abbildung 3.10: E-PCR2-Produkte, welche für die zellfreie Expression der TDH-Konstrukte eingesetzt wurden.** Ein Aliquot (1 $\mu$ l) der E-PCR2-Produkte wurde in einem 1%igen Agarosegel analysiert, M: DNA-Marker, 1: Strep-preTDH, 2: Strep-mTDH, 3: preTDH-His, 4: mTDH-His, 5: preTDH, 6: mTDH, 7: Strep-preTDH-His, 8: Strep-mTDH-His.

### 3.2.2.2 Zellfreie Synthese der TDH-Proteine

Die zellfreie Proteinexpression erfolgte im prokaryotischen *in vitro* Transkriptions-Translations-System mit *E. coli*-Lysat. Um die Syntheserate der Proteine zu bestimmen, wurde in einem Parallelansatz ein Teil der Proteine mithilfe von  $^{14}\text{C}$ -Leucin während der Translationsreaktion radioaktiv markiert. Anschließend wurde die Radioaktivität in einem Flüssigkeitsszintillator gemessen. Dabei wurden der komplette Translationsansatz und der Überstand analysiert, um die Ausbeute an Gesamtprotein und an löslichem Protein zu bestimmen. Die Proteinausbeuten der verschiedenen TDH-Konstrukte sind in Abbildung 3.12 dargestellt. Hierbei zeigte sich eine sehr ähnliche Syntheserate bei den acht Konstrukten. Die Varianten des Vorläuferproteins preTDH waren allesamt nicht löslich, während der Gesamtproteinanteil um 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$  rangierte. Die TDH-Konstrukte des reifen Proteins ohne Signalpeptid wiesen einen Gesamtproteinanteil von ca. 300  $\mu\text{g}/\text{ml}$  auf, während der lösliche Anteil mit ca. 150  $\mu\text{g}/\text{ml}$  gemessen wurde. Zur Bestimmung der Homogenität und der Größe der zellfrei hergestellten TDH-Konstrukte wurden das radioaktiv markierte Gesamtprotein und der lösliche Proteinanteil in einem SDS-PAGE aufgetrennt, um anschließend die Menge

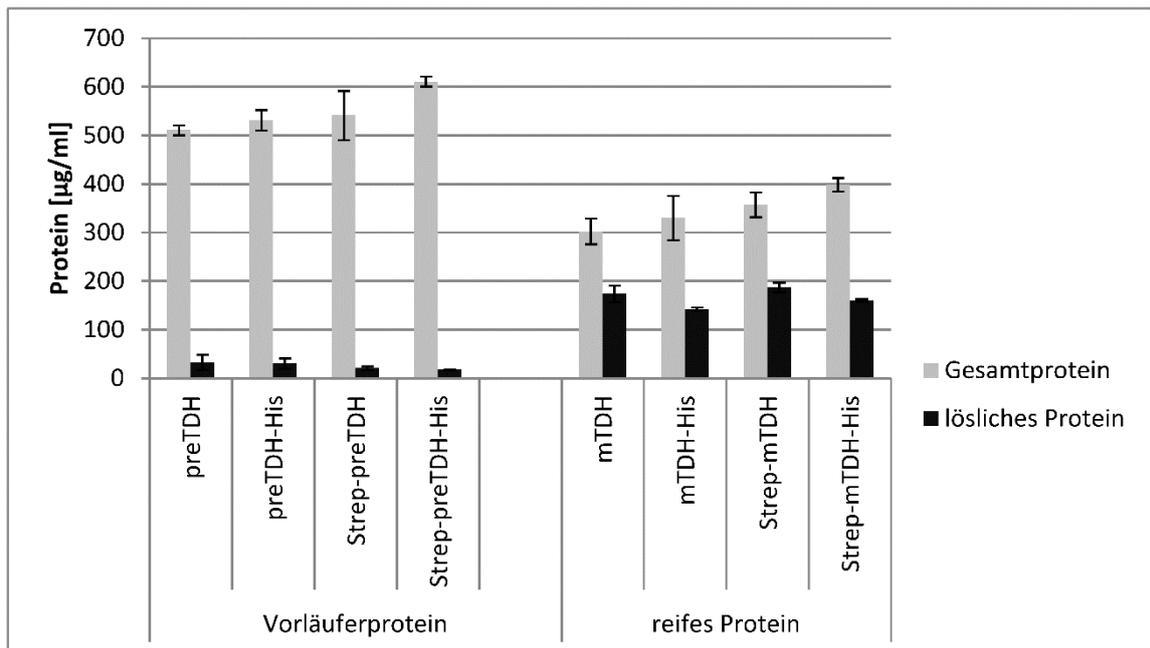
an Radioaktivität im Phosphor-Imager zu visualisieren. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.11 dargestellt. Bei den Konstrukten des TDH-Vorläuferproteins (preprotein) zeigte sich nur eine Proteinbande, während die Konstrukte des reifen Proteins (mature protein) zwei Proteinbanden aufwiesen.



**Abbildung 3.11: Synthese der <sup>14</sup>C markierten Proteine (TDH-Konstrukte).** 5 µl Aliquots der radioaktiv markierten zellfreien Translationsreaktionen (Suspension und Überstand) wurden in einem 10 % Bis-Tris NuPAGE Novex Gel (links) analysiert; <sup>14</sup>C-markierte Proteine wurden nach der Elektrophorese über ein Phosphorimager -System (Typhoon TRIO+ Imager, GE Healthcare) sichtbar gemacht (rechts).

**[Oben] Vorläuferproteine.** M: Marker, 1: preTDH (Suspension), 2: preTDH (Überstand), 3: preTDH-His (Suspension), 4: preTDH-His (Überstand), 5: Strep-preTDH (Suspension), 6 Strep-preTDH (Überstand), 7: Strep-preTDH-His (Suspension), 8: Strep-preTDH-His (Überstand), 9 no template control reaction (NTC) (Suspension), 10: NTC (Überstand).

**[Unten] Reife Proteine.** M: Marker, 1: mTDH (Suspension), 2: TDH (Überstand), 3: mTDH-His (Suspension), 4: mTDH-His (Überstand), 5: Strep-mTDH (Suspension), 6: Strep-mTDH (Überstand), 7: Strep-mTDH-His (Suspension), 8: Strep-mTDH-His (Überstand).



**Abbildung 3.12: Expressionsausbeuten der im zellfreien prokaryotischen System hergestellten TDH-Konstrukte.**

Die quantitative Analyse der  $^{14}\text{C}$ -Leucin-markierten Proteine erfolgte im Flüssigkeitszintillator nach einer heißen TCA-Präzipitation. Das Gesamtprotein wurde in der Suspension und das lösliche Protein im Überstand analysiert.

### 3.2.2.3 Immunologischer Nachweis des TDHs mit KAP-RPLA

Für den spezifischen Nachweis des TDH-Proteins und seiner Konstrukte erfolgte ein Agglutinationstest (KAP-RPLA). Die zellfreien Translationsansätze mit den enthaltenen TDH-Konstrukten sowie der Translationsansatz ohne Template (NTC) wurden nach Angaben des Herstellers mit dem sensitiven Latexpartikeln (mit anti-TDH-Antikörper) und dem Kontroll-Latex (ohne anti-TDH-Antikörper) inkubiert. Während die NTC keine Agglutination mit dem sensitivem Latex zeigte, wurde bei allen Ansätzen mit den enthaltenen TDH-Konstrukten und in ihren jeweiligen Verdünnungsschritten eine eindeutige Agglutinationsreaktion mit dem sensitivem Latex beobachtet (Tabelle 3.4). Alle Translationsansätze wurden in fünf Zweifach-Verdünnungen gemessen. Wie zu erwarten gab es mit dem Kontroll-Latex keine Reaktion.

**Tabelle 3.4: Immunologischer Nachweis von TDH.** 2,5 µl Aliquots der Translationsreaktionen mit den TDH-Varianten wurden im Agglutinationstest mit anti-TDH-Antikörper beschichteten Latex-Beads getestet (KAP-RPLA -Test).

Konstrukt	Hämolytische Aktivität	Proteinanteil (µg in 2,5 µl)	Agglutinationsaktivität	
			Sensitives Latex*	Kontroll-Latex**
preTDH	(+)	1,21	> 320	< 20
mTDH	+	0,68	> 320	< 20
preTDH-His	-	1,26	> 320	< 20
mTDH-His	+	0,75	> 320	< 20
Strep-preTDH	-	1,28	> 320	< 20
Strep-mTDH	+	0,82	> 320	< 20
Strep-preTDH-His	-	1,45	> 320	< 20
Strep-mTDH-His	+	0,92	> 320	< 20
NTC	-	-	< 20	< 20
Diluent	-	-	< 20	< 20

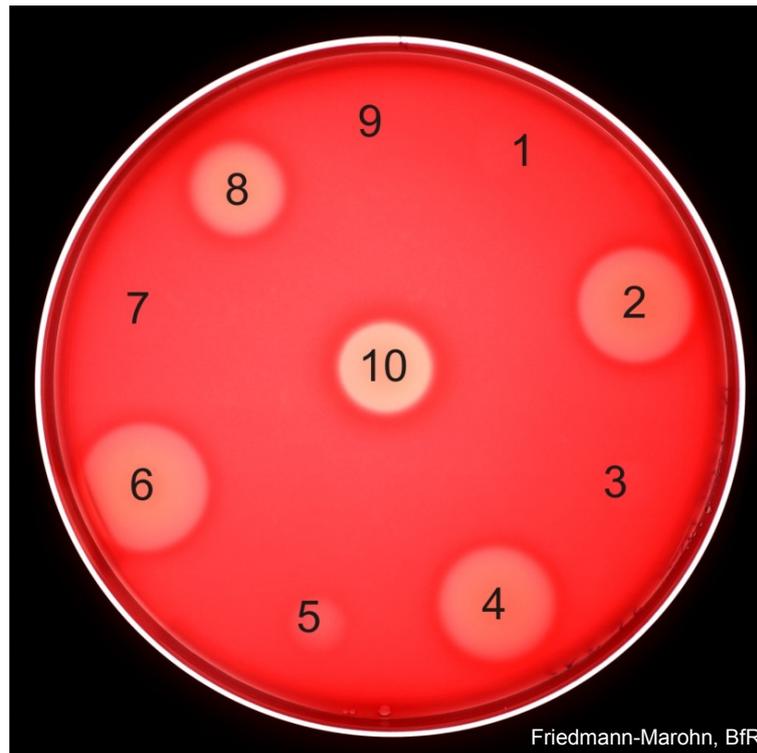
\* Kehrwert des Agglutinationstiters mit Antiserum (Kaninchen IgG gegen TDH)

\*\* keine Agglutination, niedrigste Verdünnung

+ positiv, (+) schwach positiv, - negativ

#### 3.2.2.4 Evaluation der Proteinfunktionalität durch Hämolyse

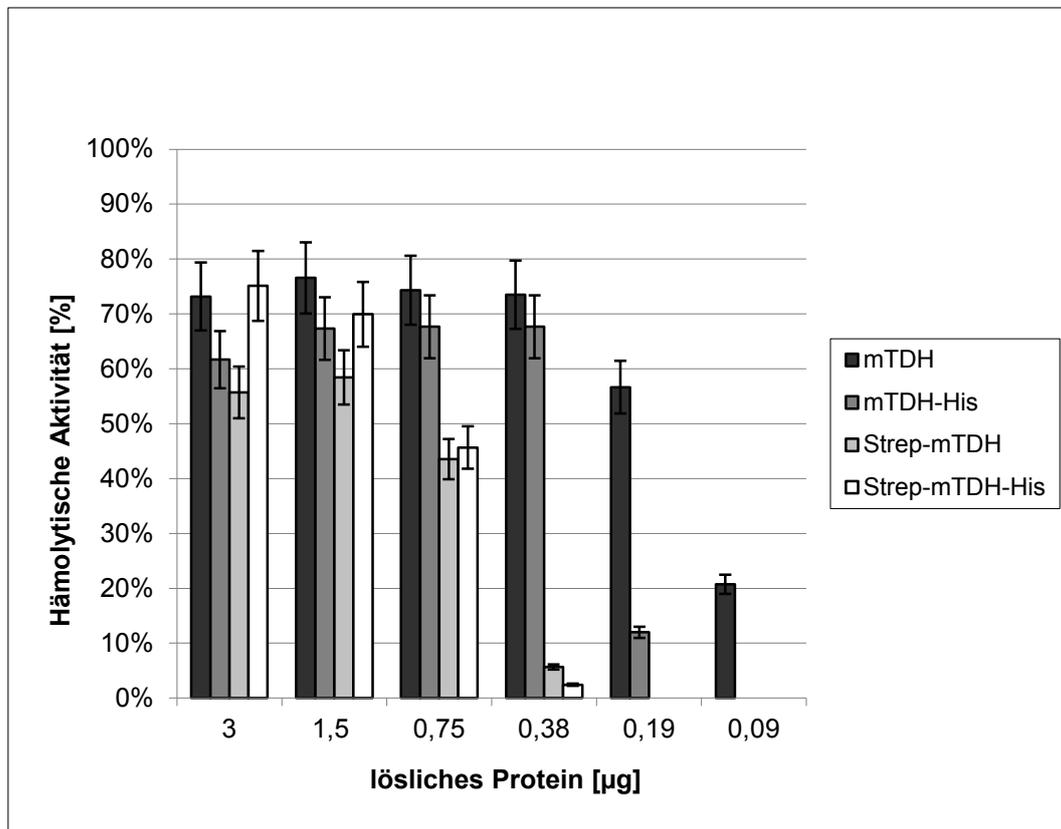
Um zu untersuchen, ob das zellfrei synthetisierte TDH und seine Konstrukte funktionell sind, wurde die hämolytische Aktivität getestet. Dazu wurden zuvor die Konzentrationen an löslichem Protein im Überstand einheitlich verdünnt (120 µg/ml). Die hämolytische Aktivität wurde zum einen qualitativ bestimmt, indem Aliquots des Überstands auf Kaninchenblutagar aufgetropft wurden. Nach einer 20-stündigen Inkubation bei 37 °C waren klare Hämolyse-Höfe auf der Platte sichtbar (Abbildung 3.13). Von den mTDH-Konstrukten, also den reifen Proteinen, zeigte das doppelt getaggte Protein (N-terminales Strep-Tag und C-terminales 6xHis-Tag) die schwächste hämolytische Aktivität, während der größte Hämolyse-Hof vom nativen mTDH ohne Tag verursacht wurde. Weder die NTC-Reaktion noch die Überstände der preTDH-Konstrukte zeigten eine sichtbare Hämolyse mit Ausnahme des nativen preTDHs ohne Tags, welches einen sehr kleinen Hämolyse-Hof bildete.



**Abbildung 3.13: Spotttest auf Kaninchenerythrozyten.**

10  $\mu$ l der Translationsreaktionen mit den preTDH-Proteinen und 10  $\mu$ l der Überstände (ÜS) mit den mTDH-Proteinen (eingestellt auf 120  $\mu$ g/ml an löslichem Protein) wurden auf eine Blutagarplatte aufgetropft. 1: Strep-preTDH, 2: Strep-mTDH, 3: preTDH-His, 4: mTDH-His, 5: preTDH, 6: mTDH, 7: Strep-preTDH-His, 8: Strep-mTDH-His, 9: NTC Translationsreaktion als Negativkontrolle, 10: 1% Triton X als Positivkontrolle.

Um die hämolytische Aktivität genauer quantifizieren zu können, erfolgte ein semiquantitativer Hämolyse-Test mit den reifen Proteinen, also den mTDH-Konstrukten. Denn für die Vorläuferproteine (preTDHs) konnte beim qualitativen Hämolyse-Test keine bzw. nur eine sehr geringe hämolytische Aktivität festgestellt werden. Es erfolgten zweifache Verdünnungen der löslichen Proteine im Überstand, welche anschließend mit einer 4 %igen Suspension aus Kaninchenerythrozyten inkubiert wurden. Anschließend wurde die Lyse der Erythrozyten über die photometrische Messung des freigesetzten Hämoglobins bestimmt. Wie im Ergebnis in Abbildung 3.14 zu sehen, zeigte das native mTDH ohne Protein-Tags erneut die höchste hämolytische Aktivität, indem es als einziges Konstrukt in der höchsten Verdünnungsstufe mit 0,09  $\mu$ g Protein eine hämolytische Reaktion hervorrief. Das TDH-Konstrukt mit dem C-terminalen His-Tag wies die zweithöchste hämolytische Aktivität auf, während die beiden anderen Konstrukte (Strep-mTDH und Strep-mTDH-His) die schwächste hämolytische Reaktion zeigten.



**Abbildung 3.14: Semiquantitativer Hämolysetest.** Überstände (ÜS) mit dem enthaltenen mTDH und seinen Varianten wurden mit Kaninchenerythrozyten vermisch. Hierzu erfolgte eine zweifache serielle Verdünnung der Überstände mit 3 µg Proteinanteil als Anfangswert, welche mit 4 % Kaninchenerythrozyten in PBS gemischt wurden. Die Proben wurden für eine Stunde bei 37 °C inkubiert, gefolgt von einem Zentrifugationsschritt und einer anschließenden photometrischen Messung des freigesetzten Hämoglobins bei 570 nm.

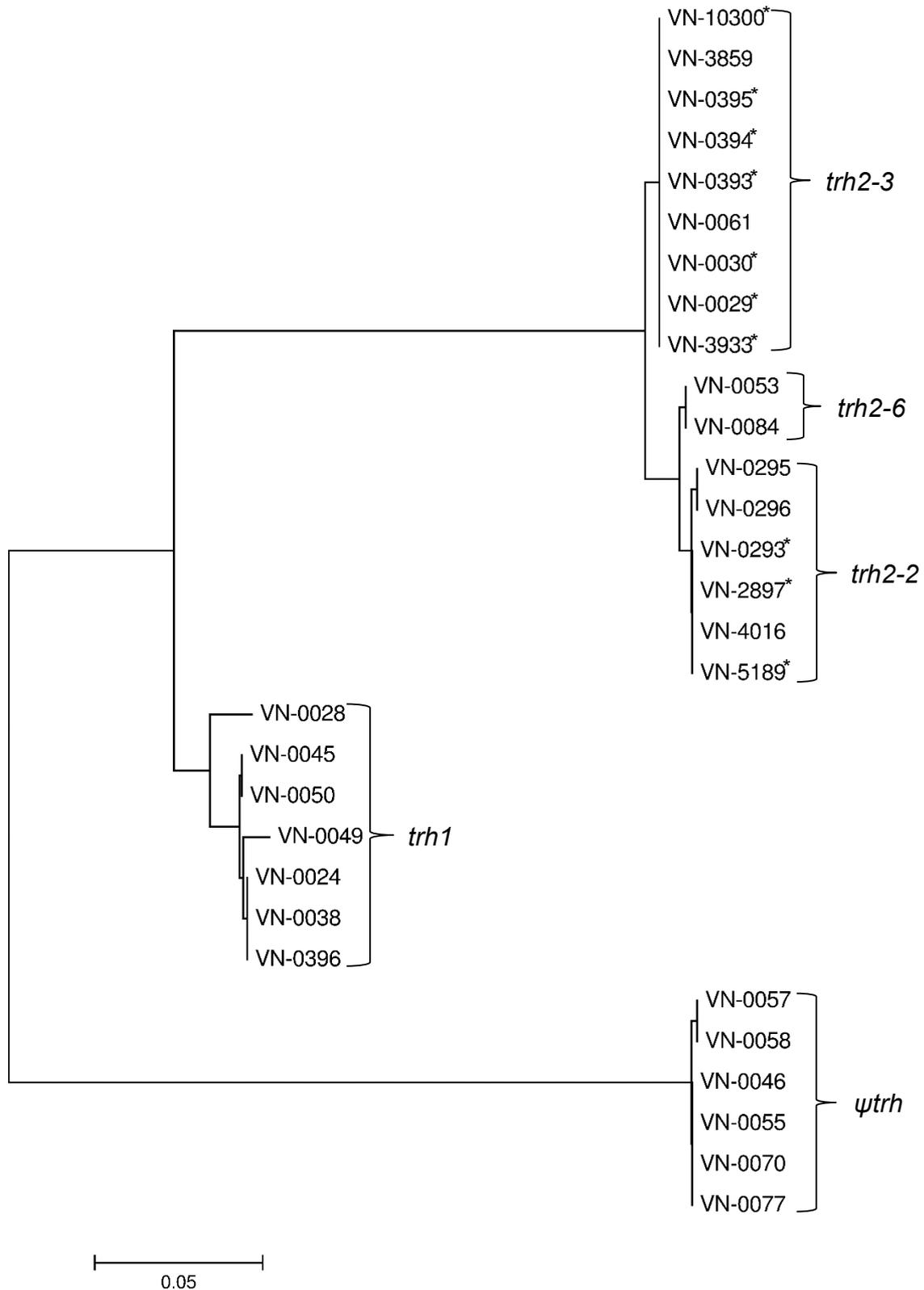
### 3.3 Anwendung der etablierten Methoden zur Charakterisierung von *trh* positiven *V. parahaemolyticus* Stämmen aus Deutschland

#### 3.3.1 Sequenzanalyse der *trh*-Gene

Über einen PCR-Nachweis mithilfe der Primer *Trh-forward* und *Trh-reverse* (Tada *et al.* 1992) konnten *trh* positive *V. parahaemolyticus* Stämme identifiziert werden (siehe Tabelle 1.3). Dabei wurde eine konservierte interne DNA-Sequenz von 251 bp amplifiziert, welche sowohl in *trh1*- als auch in *trh2*-Genvarianten enthalten ist. Anschließend erfolgte eine Sequenzanalyse der gesamten codierenden Sequenz des *trh*-Gens (570 bp), welches in 31 *V. parahaemolyticus*-Isolaten detektiert wurde. Für die Amplifikation wurden der unter 2.3.2.6

(inverse PCR) ermittelte Primer IS-ele-Rev1 sowie die Vptrx1- und Vptrx4-Primer verwendet. Unter den 31 Stämmen wurden zehn verschiedene *trh*-Genvarianten gefunden. Zur Abschätzung der genetischen Divergenz zwischen den *trh*-Genvarianten wurde ein „Minimum Evolution Tree“ (Software Mega 6.0, <http://www.megasoftware.net>) mithilfe des Kimura-2-Parameter-Modells konstruiert. Die phylogenetische Analyse der *trh*-Gensequenzen zeigte ein „Clustering“ von *trh1*-, *trh2*-Varianten und einer dritten *trh*-Variante (siehe Abbildung 4.1). Diese dritte Variante wies ein modifiziertes Startcodon (ATA) anstelle eines ATGs auf und zeichnete sich durch ein verfrühtes Stoppcodon (382 bp) aus. Das Stoppcodon ist vermutlich die Folge einer Deletion. Daher handelt es sich vermutlich um die Sequenz eines Pseudogens, welches nicht für ein funktionelles Protein codiert. Nachfolgend wird diese *trh*-Variante als  $\psi trh$  bezeichnet. Sechs der untersuchten 31 Isolate wiesen das Pseudogen  $\psi trh$  auf, von denen fünf zusätzlich ein *tdh*-Gen trugen, während ein Stamm (VN-0070) nur das Pseudogen besaß.

Die zehn aus deutschen Gewässern stammenden Isolate enthielten alle ein *trh2*-Gen in ihrem Genom. Eine weitere Differenzierung der *trh2*-Gene erfolgte nach der Nomenklatur von Ellingsen *et al.* (2013), wobei die Subvarianten *trh2-2* und *trh2-3* in den deutschen Stämmen nachgewiesen wurden. Es sollte darauf hingewiesen werden, dass die Nomenklatur von Ellingsen *et al.* (2013) auf einer verkürzten *trh*-Sequenz beruht und 72 bp am Ende des Gens nicht berücksichtigt wurden. Unter den 31 *trh* positiven Stämmen konnte eine neue *trh2*-Variante (VN-0394) entdeckt werden, welche als *trh2-6* bezeichnet wurde.



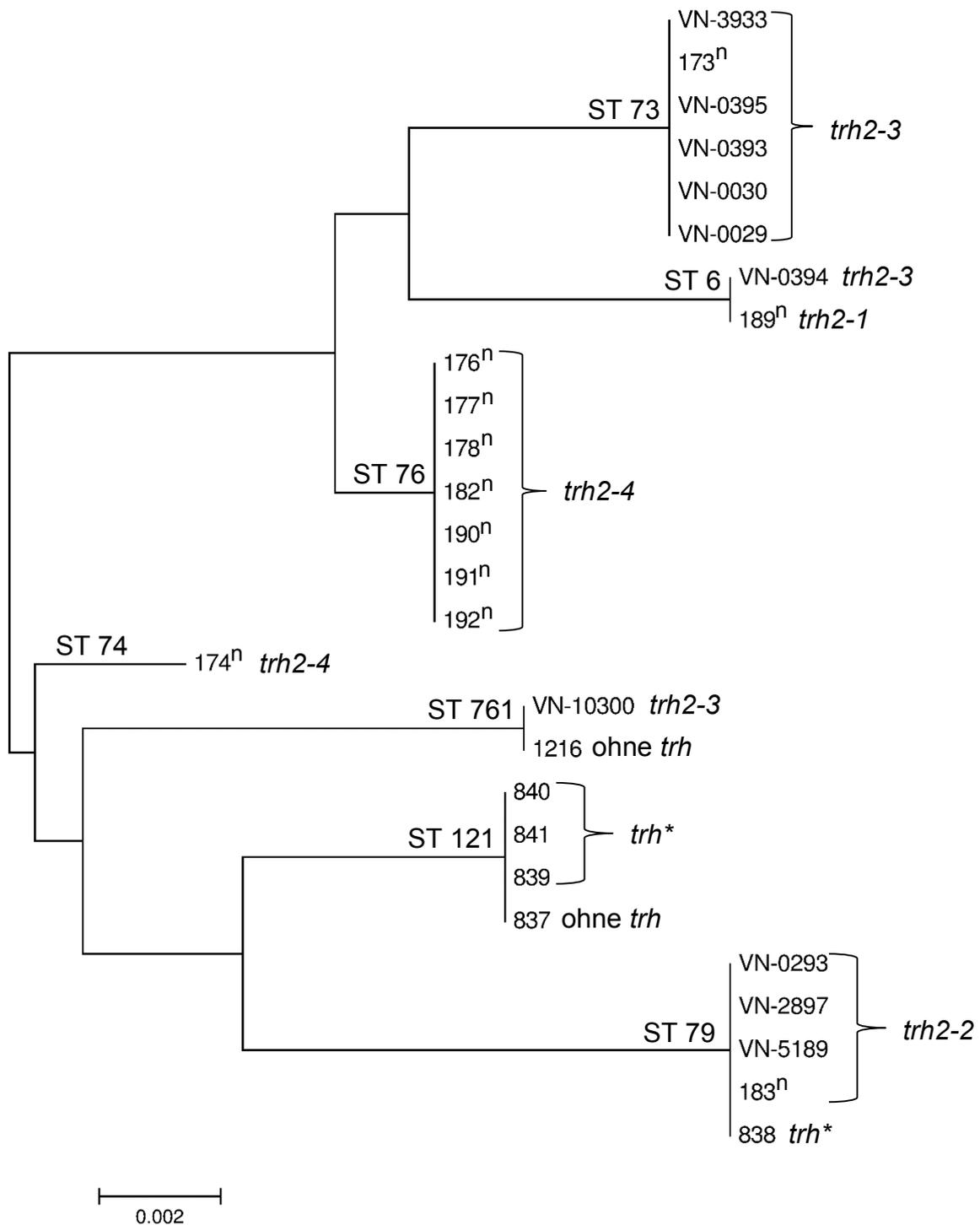
**Abbildung 4.1: Phylogenetische Verwandtschaft der *trh*-Genvarianten** (auf der Basis der kodierenden Sequenzen ("Minimum Evolution Tree" (ME))) Die aus deutschen Gewässern isolierten Stämme sind mit einem Stern gekennzeichnet.

### 3.3.2 Multilokus-Sequenz-Typisierung

29 der *trh* positiven Stämme wurden erfolgreich mittels Multilokus-Sequenz-Typisierung (MLST) typisiert wie bereits in Gonzalez-Escalona *et al.* (2008) beschrieben. Die Bestimmung der Allelnummern sowie der Sequenztypen erfolgte nach den Vorgaben der PubMLST Datenbank. Die ermittelten Teilsequenzen der Referenzgene wurden außerdem in der vorgegebenen Loci-Reihenfolge konkateniert, um eine Sequenz von 3682 bp für jeden Stamm zu erhalten.

Die Amplifikation des *recA*-Gens erwies sich bei einigen Stämmen als schwierig wie schon bereits von Ellingsen *et al.* (2013) beschrieben. Bei den Stämmen VN-0295 und VN-0296 war es nicht möglich, eine vollständige *recA*-Teilsequenz per PCR zu erhalten. Der Grund dafür waren eine Duplikation und eine Inversion eines Genteils. Daher wurden beide Stämme bei der MLST-Analyse nicht berücksichtigt. Der hauptsächliche Fokus der MLST-Analyse lag auf der Untersuchung von Verwandtschaftsbeziehungen innerhalb der zehn *trh* positiven Stämme, welche aus deutschen Gewässern isoliert wurden (acht Stämme aus der Ostsee und zwei Stämme aus der Nordsee). Die phylogenetische Analyse, basierend auf den konkatenierten MLST-Sequenzen, ist in einem „Minimum Evolution Tree“ in Abbildung 4.2 dargestellt. Den zehn Stämmen konnten vier verschiedene Sequenztypen (ST) zugewiesen werden, welche bereits in der Datenbank vorlagen. Alle Isolate, welche die *trh2-2*-Subvariante trugen, besaßen ST79. Die meisten Stämme mit der Subvariante *trh2-3* wiesen ST73 auf, außer VN-0394 (ST6) und VN-10300 (ST761). In die phylogenetische Analyse wurden zusätzlich andere *trh* positive *V. parahaemolyticus* Stämme mit gleichen Sequenztypen mit einbezogen (siehe Diskussion, *trh*<sup>+</sup> bedeutet, dass keine vollständige *trh*-Sequenz zu diesen Stämmen vorlag).

Die STs der restlichen *V. parahaemolyticus* Isolate aus dieser Studie sind in Tabelle 3.5 aufgeführt. Insgesamt wurden vier neue Sequenztypen gefunden (Stämme VN-0028, VN-0053, VN-0084 und VN-4016). Detaillierte Informationen über das Allel-Profil der gefundenen STs befinden sich in Tabelle C2.



**Abbildung 4.2: Phylogenetischer Baum (Minimum Evolution Tree) auf Basis der konkatenierten sieben Locus-Sequenzen (MLST).** Die Sequenztypen (STs) der deutschen Stämme dieser Studie (VN-Nummern) wurden mit anderen *trh* positiven Stämmen mit identischen oder ähnlichen STs aus der PubMLST-Datenbank verglichen (Stammnummern aus Datenbank übernommen). Alle aus der Datenbank übernommenen Stämme stammen aus Norwegen (mit einem n markiert) oder Deutschland. Bei einigen Stämmen ist keine Information über die *trh*-Sequenz erhältlich, daher wurden diese als *trh\** markiert. Zwei Stämme besitzen kein *trh*-Gen.

### 3.3.3 Genotypisierung potentieller Virulenzgene

Mittels verschiedener Multiplex-PCRs wurden die 31 *trh* positiven *V. parahaemolyticus* Isolate auf die Anwesenheit verschiedener Virulenz-assoziiierter Gene untersucht (siehe Tabelle 3.5). Die analysierten, potentiellen Virulenzgene kommen im Genom des pandemischen Stammes RIMD2210633 vor oder wurden für *trh* positive Stämme bereits publiziert (Noriea *et al.* 2010). Der *tdh* positive Stamm RIMD2210633 diente daher als Positiv-Kontrolle bei fast allen PCR-Reaktionen. Von den 31 *trh* positiven *V. parahaemolyticus* Stämmen wiesen neun zusätzlich ein *tdh*-Gen auf (positives Ergebnis in der Diagnostik-PCR mit Tdh-Forward und Tdh-Reverse Primern, Tabelle 2.7). Die Anwesenheit von T3SS1 konnte für alle Stämme nachgewiesen werden, während das T3SS2 ausschließlich in *tdh* und/oder *trh* positiven Stämmen detektiert wurde. Beim Nachweis des T3SS2 wurde zwischen T3SS2 $\alpha$  und T3SS2 $\beta$  differenziert. Hierbei zeigte sich, dass drei der getesteten T3SS2 $\beta$ -Komponenten (*vscC2*, *vscS2* und *vopB2*) in allen *trh* positiven Stämmen mit Ausnahme von Stamm VN-0070 vorkamen. Die vierte Komponente, *vopC*, konnte in fast allen der *trh* positiven Stämme mit Ausnahme der Gruppe von Stämmen, welche ein  $\Psi$ *trh* anstelle eines funktionellen *trh*-Gens aufwiesen, gefunden werden. Das T3SS2 $\alpha$  wurde in keinem der untersuchten Stämme bis auf Stamm RIMD2210633 detektiert.

Zusätzlich wurden die *V. parahaemolyticus* Isolate auf die Anwesenheit von verschiedenen genomischen Inseln (Vpal-1 bis Vpal-6) überprüft. Vpal-1, Vpal-3, Vpal-4, Vpal-5 und Vpal-6 konnten in keinem der Stämme detektiert werden, während das Gen *vp0643* von Vpal-2 in fünf Stämmen (VN-0028, VN-0046, VN-0055, VN-077 und VN-4016) vorhanden war. Die Verteilung der untersuchten Gene des Typ 6 Sekretionssystems (T6SS) zeigte kein einheitliches Muster. Während die Gene *vp1390* und *vp1405* in keinem der Stämme detektiert wurden, konnte *vp1401* in 20 Isolaten und *vp1409* in 19 Isolaten nachgewiesen werden. Das MSHA Pilin Protein kodierende Gen *mshD* wurde in sieben Stämmen detektiert. Folgende potentielle Virulenz-assoziierte Gene wurden in allen untersuchten *V. parahaemolyticus* Stämmen gefunden: die mit der Biofilmbildung assoziierten Gene *vp0950*, *vp0952* und *vp0962*, das Gen *vp1403*, welches für eine „capsular polysaccharide biosynthesis glycosyltransferase“ kodiert, zwei Häm-Rezeptorgene *hutA* und *hutR*, und sowohl das Strukturgen des Urease-Genclusters *ureC* an sich als auch der Abstand von 7,9 kB zwischen dem *trh*-Gen und dem *ureC*-Gen. Für alle Stämme, welche das *ureC*-Gen aufwiesen, konnte eine Urease-Aktivität auf Urea-Dextrose-Schrägagar nachgewiesen werden. Die genetische Kopplung der *trh*-Sequenzen mit dem Urea-Biosynthese-Cluster (*trh*-

ure) konnte nur bei dem Stamm VN-0070 nicht nachgewiesen werden, welcher ein  $\Psi_{trh}$  aufwies. Auch der biochemische Nachweis der Urease-Aktivität war bei Stamm VN-0070 negativ. Das für die MTase kodierende Gen und das untersuchte *acfD*-Gen wurden in keinem der Stämme detektiert mit Ausnahme der Positiv-Kontrolle RIMD2210633.

**Tabelle 3.5:** Genotypisierung der *trh* positiven *V. parahaemolyticus* Stämme.

\* Stämme wurden aus deutschen Gewässern isoliert

\*\*als Positiv-Kontrolle diente der pandemische Stamm RIMD2210633

Stamm	ST	Hämolyysin		T3SS1	T3SS2α					T3SS2β				Vpal-1	Vpal-2	Vpal-3	Vpal-4	Vpal-5	Vpal-6	T6SS				Biofilm			MTase	cpsA	mshD	Häm-Rezeptor		acfD	ureC	trh-ureC (7.9 kb)	
		tdh	trh		vscp	vscC2	vscS2	vopB2	vopT	vscC2	vscS2	vopB2	vopC							Vp1390	Vp1401	Vp1405	Vp1409	Vp0950	Vp0952	Vp0962				Vp0394	VPA 1403				Vp2695
VN-0029*	73	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
VN-0030*	73	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
VN-0293*	79	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
VN-0393*	73	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
VN-0394*	6	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
VN-0395*	73	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
VN-2897*	79	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
VN-3933*	73	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
VN-5189*	79	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
VN-0053	967	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
VN-0061	64	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
VN-0084	985	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
VN-0295	uk	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
VN-0296	uk	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
VN-3859	73	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
VN-4016	987	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
VN-0028	966	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
VN-0049	91	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
VN-0396	1	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
VN-0024	50	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
VN-0038	64	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
VN-0045	36	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
VN-0050	83	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
VN-0046	34	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
VN-0055	35	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
VN-0057	26	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
VN-0058	26	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
VN-0077	34	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
VN-0070	452	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Kontrolle**	3	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

### 3.3.4 Quantifizierung der mRNA von Virulenzgenen durch qRT-PCR

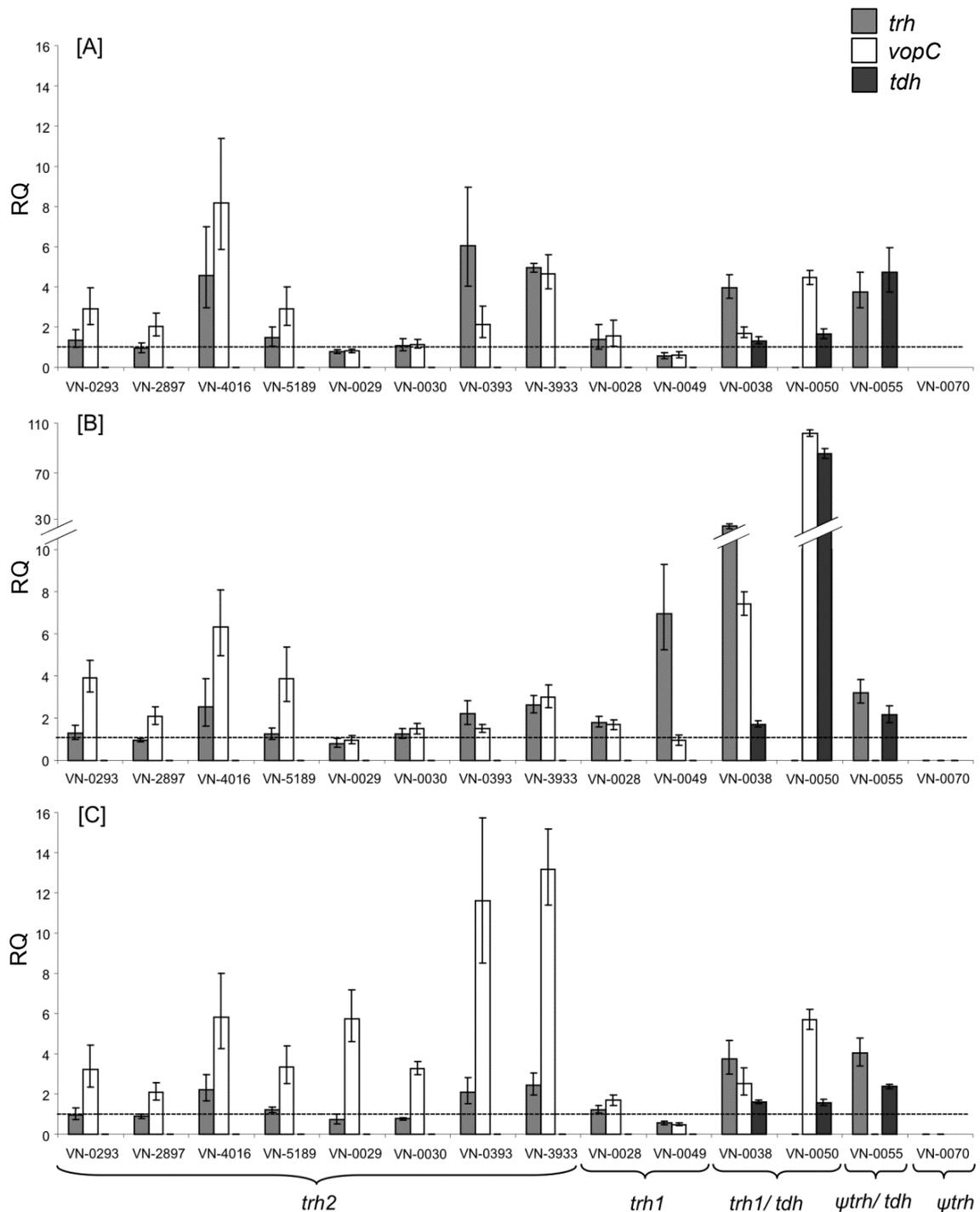
In einer Transkriptionsstudie wurde die Expression der verschiedenen Virulenzgene *trh1*, *trh2* und *tdh* sowie *vopC* im Verhältnis zu *gyrB*, einem konstant exprimierten Haushaltsgen, untersucht (Caburlotto *et al.* 2010). Des Weiteren wurden der Einfluss von Gallenextrakt und Harnstoff sowie Temperaturunterschiede auf die Expression analysiert. Hierzu erfolgte zunächst eine Kultivierung der Stämme in 20 ml LB-Medium (0,3 M NaCl) bei 37 °C und 200 rpm bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,6. Anschließend wurde die Kultur 1:2 in vier Subkulturen à 10 ml Volumen verdünnt. Eine Subkultur enthielt nur LB-Medium (0,3 M NaCl) und wurde als Kontrolle genutzt. Zwei Subkulturen wurden mit 0,04 % Gallenextrakt bzw. 0,1 % Harnstoff versetzt, um die Wirkung beider Leberprodukte, welche in den menschlichen Darm ausgeschieden werden, auf die Transkription der Virulenzgene zu untersuchen. Diese drei Subkulturen wurden bei 37 °C und 200 rpm für zwei Stunden inkubiert. Um den Einfluss von Temperaturunterschieden zu testen, wurde die vierte Subkultur, welche nur LB-Medium (0,3 M NaCl) enthielt, bei 20 °C und 200 rpm für zwei Stunden inkubiert. Nach Extraktion der RNA und Umschreibung in cDNA wurde die cDNA in einer qRT-PCR untersucht. Die Analyse der Transkriptionsdaten erfolgte anschließend mithilfe der Delta-Delta-CT-Methode. Hierbei wurde die Transkription bei 20 °C als Nullwert gewählt und mit dem Transkriptionsmuster bei 37 °C mit und ohne den Einfluss von Gallenextrakt und Harnstoff verglichen.

Insgesamt wurden für die Transkriptionsstudie 14 Stämme ausgewählt: acht *trh2* tragende Stämme (vier *trh2-2* und vier *trh2-3*, sieben aus deutschen Gewässern), zwei Stämme mit dem *trh1*-Gen, zwei *trh1* und *tdh* positive Stämme, ein Stamm mit der Genkombination  $\Psi$ *trh* und *tdh* und ein Stamm nur mit  $\Psi$ *trh*. Die einzelnen *V. parahaemolyticus* Stämme zeigten ein diverses Transkriptionsmuster der untersuchten Virulenzfaktoren und reagierten unterschiedlich auf die getesteten Wachstumsbedingungen (siehe Abbildung 4.3):

Die Transkription von *trh2* war leicht erhöht bei einer Temperatur von 37 °C in einigen Stämmen (VN-0393, VN-3933 und VN-4016), jedoch konnte weder ein Einfluss von Gallenextrakt noch von Harnstoff beobachtet werden. Die *trh1*-Transkription der Stämme VN-0038 und VN-0049 wurde durch die Anwesenheit von Gallenextrakt induziert, während die beiden anderen *trh1* positiven Stämme entweder keine Induktion der Transkription (VN-0028) oder überhaupt keine Transkription (VN-0050) zeigten. Harnstoff zeigte keinen Einfluss auf die Transkription von *trh1*.

Die Transkription des *tdh*-Gens wurde in Stamm VN-0050 durch die Anwesenheit von Gallenextrakt stark erhöht, während in den anderen *tdh* positiven Stämmen (VN-0038 und VN-0055) keine Zunahme der Expression beobachtet wurde. Harnstoff hatte keinen Einfluss auf die *tdh*-Transkription. *Ψtrh* zeigte überhaupt keine Transkription (VN-0070) bzw. eine niedrige Transkriptionsrate (VN-0055).

Eine durch Gallenextrakt induzierte Transkription des *vopC*-Gens, einem Effektor des T3SS2 $\beta$ , konnte in den *tdh/trh1* positiven Stämmen (VN-0038 und VN-0050) beobachtet werden. Eine induzierte *vopC*-Transkription durch die Anwesenheit von Harnstoff konnte dagegen nur in Stämmen mit der *trh2-3*-Variante (VN-0029, VN-0030, VN-0393 und VN-3933) detektiert werden. Stämme, welche die *trh2-2*-Variante aufwiesen, zeigten fast keine Transkriptionsunterschiede unter allen drei Wachstumsbedingungen bei 37 °C.



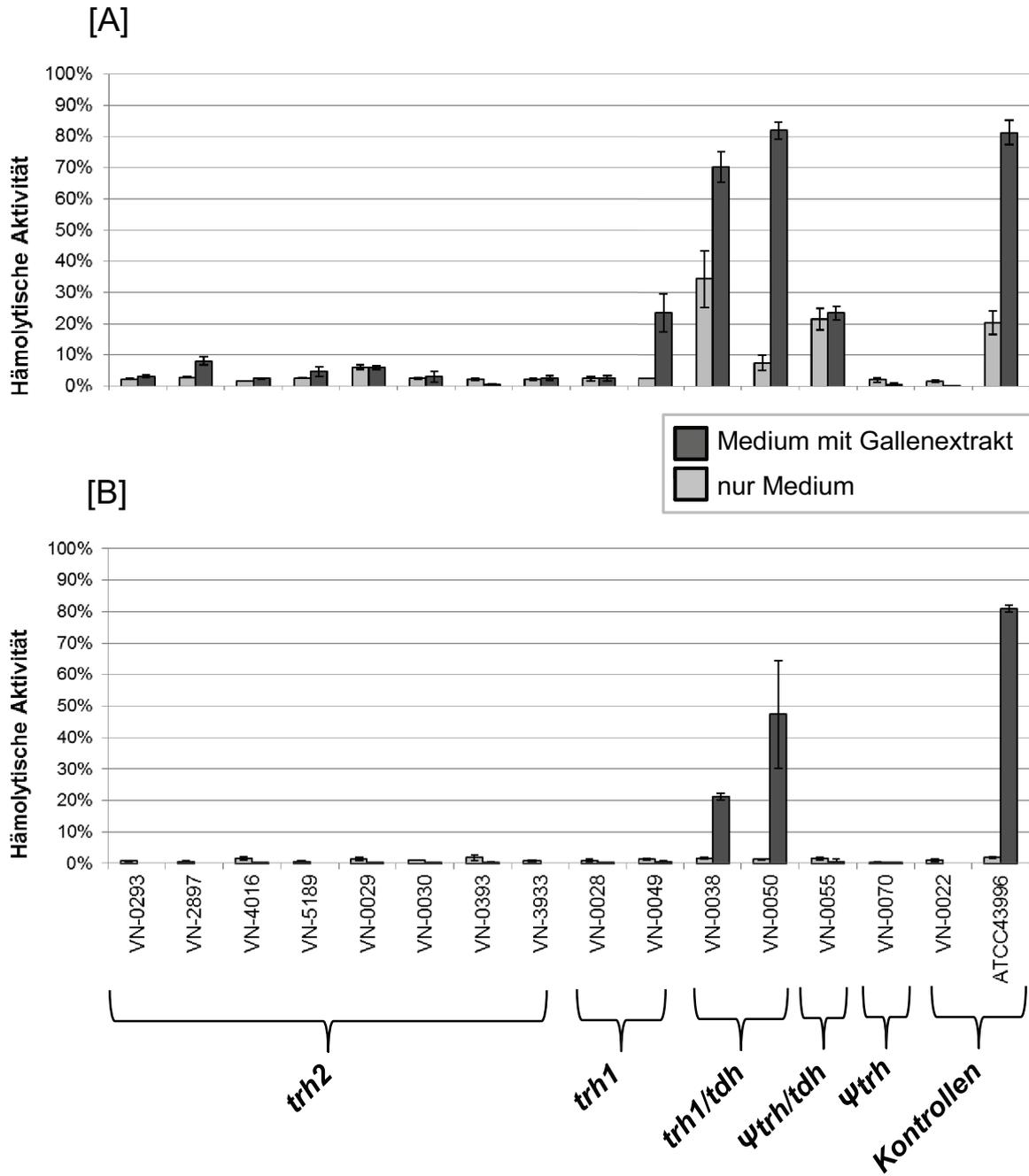
**Abbildung 4.3: Variation der Genexpression der *V. parahaemolyticus* Stämme unter verschiedenen Wachstumsbedingungen.** Die Bakterien wurden bei 20 °C in LB-Medium (Kontrolle, gestrichelte Linie) und bei 37 °C unter folgenden Bedingungen kultiviert: [A] LB-Medium, [B] LB-Medium mit 0,04 % Gallenextrakt und [C] LB-Medium mit 0,1 % Harnstoff. Die Expression der Virulenzgene *trh1*, *trh2*, *vopC* und *tdh* sowie des Haushaltsgens *gyrB* wurde in einer qRT-PCR bestimmt. Mithilfe der Delta-delta-CT-Methode ( $\Delta\Delta C_T$ ) erfolgte eine relative Quantifizierung (RQ), indem die Expressionsergebnisse der Virulenzgene anhand der *gyrB*-Expression normalisiert wurden. Mittelwerte und Standardabweichungen sind abgeleitet aus drei unabhängigen Experimenten für jede Wachstumsbedingung eines jeden Stammes.

### 3.3.5 Hämolyse-Test und Serumresistenz

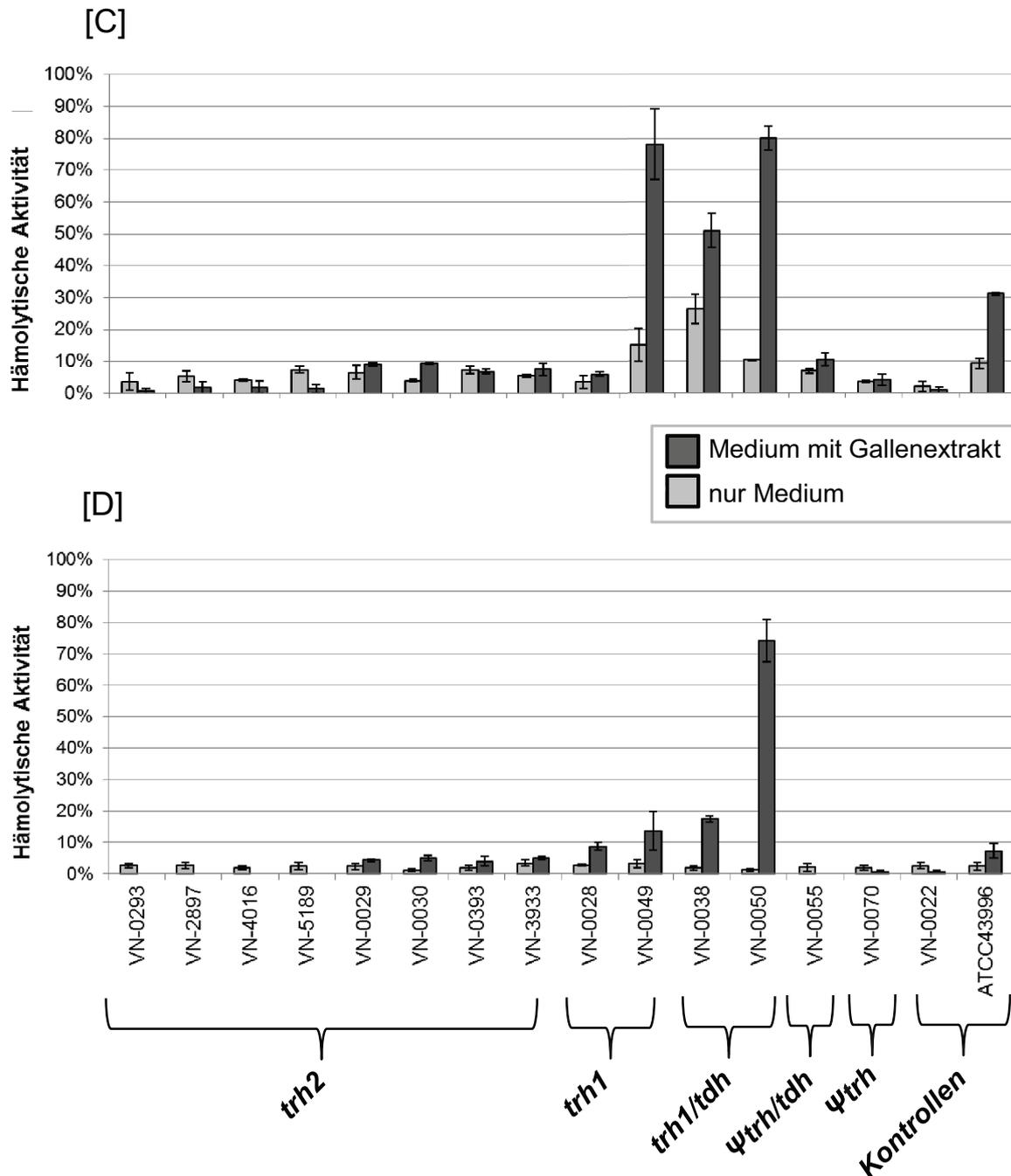
Um die Transkriptionsergebnisse der Gene *trh* und *tdh* zu verifizieren, wurde die hämolytische Aktivität der einzelnen Stämme gegenüber humanen und Schaferythrozyten getestet (Abbildung 4.4). Vor dem Hämolyse-Test wurden die Stämme mit und ohne Gallenextrakt wie in 2.3.6.2 beschrieben kultiviert. Die Bakterienkulturen und die Kulturüberstände wurden in einem Parallelansatz separat voneinander getestet. Für alle *trh2* positiven Stämme konnte keine hämolytische Aktivität gegenüber beiden Erythrozytentypen nachgewiesen werden. Die beiden Stämme, welche nur das *trh1*-Gen trugen (VN-0028 und VN-0049), verhielten sich unterschiedlich im Test. Für Stamm VN-0049 ließ sich bei Zugabe von Gallenextrakt eine starke hämolytische Aktivität gegenüber Schaferythrozyten und eine moderate hämolytische Aktivität gegenüber humanen Erythrozyten beobachten. Stamm VN-0028 zeigte dagegen keine oder eine sehr niedrige hämolytische Aktivität. Stämme mit der Genkombination *trh1* und *tdh* wiesen bei Anwesenheit von Gallenextrakt eine starke hämolytische Aktivität gegenüber beiden Erythrozytentypen auf. Eine relativ geringe hämolytische Aktivität zeigte der  $\psi$ *trh/tdh* positive Stamm VN-0055 und keine hämolytische Aktivität wurde beim  $\psi$ *trh* positiven Stamm VN-0070 beobachtet. Generell wurde eine stärkere hämolytische Reaktion bei der Co-Kultivierung von Bakterien und Erythrozyten festgestellt als im Parallelansatz mit Kulturüberständen und Erythrozyten.

Bei der Untersuchung der Resistenz gegenüber humanem Serum konnten alle getesteten Stämme als serumresistent eingestuft werden, da sie in der Lage waren, in einem Serumanteil von 60-80 % zu überleben und zu wachsen. Nur der pandemische Stamm RIMD2210633 erwies sich als serumsensitiv unter diesen Testbedingungen.

## Humane Erythrozyten



## Schaferythrozyten



**Abbildung 4.4: Hämolytische Aktivität der Bakterienkulturen und Kulturüberstände gegenüber humanen und Schaferythrozyten.** Bakterien wurden in LB-Medium mit und ohne 0,04 % Gallenextrakt kultiviert. Bakterienkulturen [A] und [C] sowie steril-filtrierte Kulturüberstände [B] und [D] wurden zu einer Blutsuspension von jedem Erythrozytentyp (human und Schaf) gegeben und für vier Stunden inkubiert. Die Zellyse der Erythrozyten wurde bei einer Absorption von 540 nm bestimmt. Als Kontrollen wurden die Stämme VN-0022 (*tdh* und *trh* negativ) und ATCC439996 (*tdh* positiv und *trh* negativ) verwendet. Die Experimente wurden zweimal durchgeführt.

### 3.3.6 Zellfreie Proteinsynthese von TRH-Varianten und ihre hämolytische Aktivität gegenüber Erythrozyten

Vier TRH-Varianten und TDH2 als Kontrolle wurden im prokaryotischen *in vitro* Transkriptions-Translations-System mit *E. coli*-Lysat synthetisiert. Alle PCR-Produkte wiesen die erwartete Größe auf und wurden mit einer ähnlichen Effizienz amplifiziert (siehe Abbildung B 3.1). Über den Einbau von <sup>14</sup>C-markiertem Leucin in die Hämolsine konnte die Syntheserate der Proteine bestimmt werden. Die Ausbeuten an löslichem Protein der TRH-Varianten waren recht unterschiedlich. Für die TRH-Varianten von VN-0029 und VN-0038 konnten Ausbeuten von ca. 12 µg/ml bestimmt werden, für TRH2-2 (VN-0293) 56 µg/ml, während für TDH2 mit 150 µg/ml an löslichem Protein eine deutlich höhere Ausbeute erzielt wurde. Die Proteinsynthese der TRH1-Variante von Stamm VN-0028 gelang in zwei unabhängigen Experimenten nicht. Aliquots des Translationsansatzes mit dem Gesamtprotein und Aliquots des Überstandes mit dem löslichen Proteinanteil wurden im SDS-PAGE und einer nachfolgenden Autoradiographie auf Größe und Homogenität hin analysiert (siehe Abbildung B 3.2).

Des Weiteren erfolgte eine Überprüfung der Funktionalität der zellfrei hergestellten Hämolsine. Hierzu wurde die hämolytische Aktivität der drei erfolgreich synthetisierten TRH-Varianten sowie das TDH2 mit Schafs-, Kaninchen- und humanen Erythrozyten getestet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.6 zusammengefasst. Die TRH-Variante TRH1 (VN-0038) zeigte eine hämolytische Aktivität gegenüber Schaferythrozyten, während gegenüber Kaninchen- und humanen Erythrozyten keine Reaktion beobachtet wurde. Die beiden untersuchten TRH2-Varianten (VN-0029 und VN-0293) zeigten keine hämolytische Aktivität gegenüber allen drei Erythrozytentypen. Bei der Kontrolle TDH2 wurde eine stärkere hämolytische Aktivität gegenüber Kaninchenerythrozyten (= 50 %) als gegenüber humanen Erythrozyten (= 10 %) beobachtet. Dieser Unterschied in der Spezifität von TDH wurde bereits in Honda *et al.* (1988) beschrieben. Eine hämolytische Reaktion von TDH2 gegenüber Schaferythrozyten konnte nicht detektiert werden.

**Tabelle 3.6: Hämolytische Aktivität der zellfrei synthetisierten TRH-Varianten und TDH2.** Ca. 300 ng an löslichem Protein wurden mit einer 4 %igen Erythrozytensuspension jedes Bluttyps (Schaf, human, Kaninchen) vermischt.

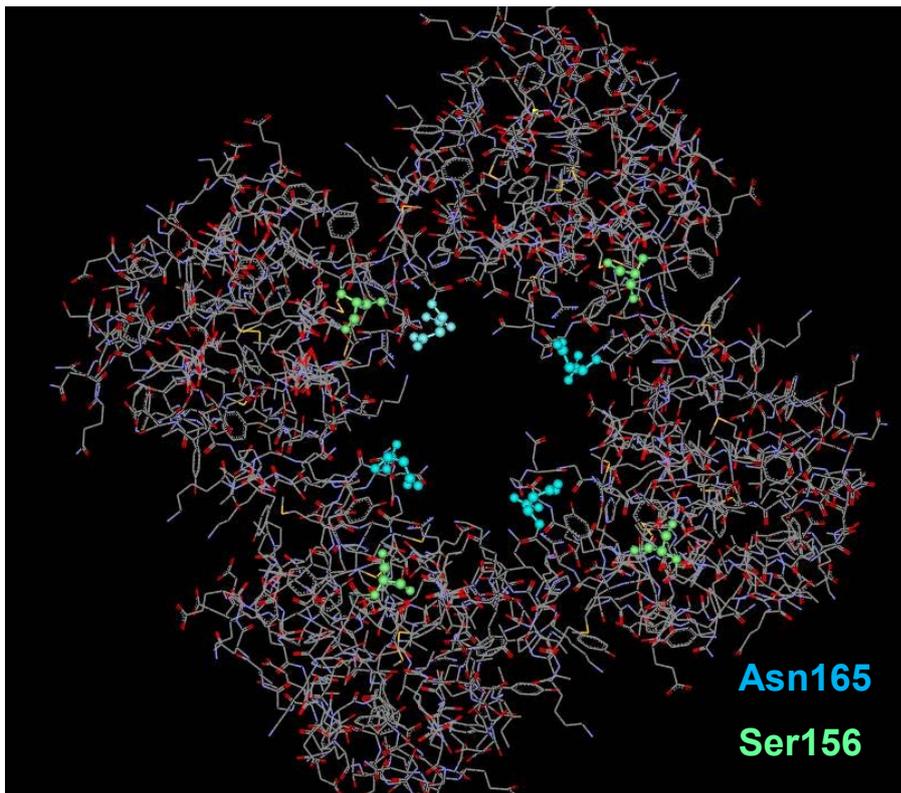
Hämolysine	Schaf	Human	Kaninchen
mTRH1 (VN-0038)	>80 %	<0.01 %	<0.01 %
mTRH2-3 (VN-0029)	<0.01 %	<0.01 %	<0.01 %
mTRH2-2 (VN-0293)	<0.01 %	<0.01 %	<0.01 %
mTDH2 (Kontrolle)	<0.01 %	= 10 %	= 50 %

m = reifes Protein (mature protein)

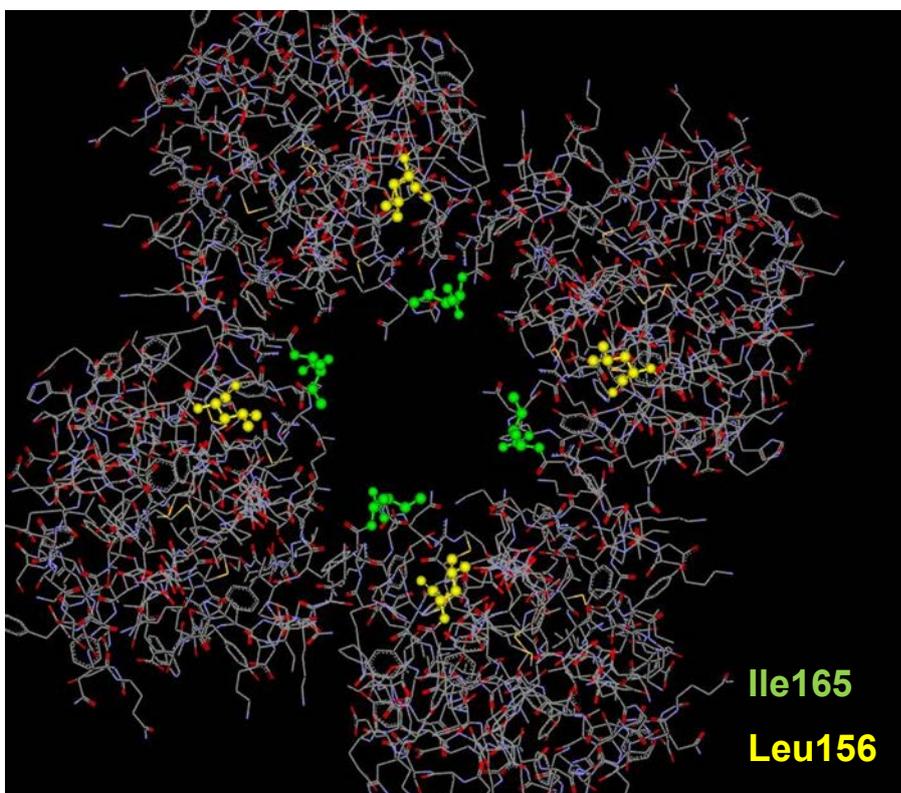
### 3.3.7 *In silico* Analyse der TRH-Varianten und TDH2

Zur Visualisierung einer möglichen Quartärstruktur (Tetramer) der TRH1- und TRH2-Proteine wurde ein Homologie-Modelling auf der Basis der bekannten Kristallstruktur des TDH2-Proteins durchgeführt. Nach einem Alignment der Aminosäuresequenzen der reifen TRH-Proteine mittels Accelrys Gene Software erfolgte die 3D-Modellierung mithilfe des SWISS Model Servers. Die Aminosäuresequenzen von mTRH1 und mTRH2 unterschieden sich in 23 bis 27 Aminosäuren (siehe Abbildung B 4). Die simulierte Quartärstruktur beider TRH-Varianten zeigte, dass sich zwei der Aminosäureaustausche an den Positionen 156 und 165 innerhalb der zentralen Pore des Tetramers befanden. Dabei wies TRH1 die Aminosäuren Serin (Ser156) und Asparagin (Asn165) auf (siehe Abbildung 4.5A), welche zu den neutralen bzw. hydrophilen Aminosäuren gehören. Auch TDH2 besitzt an diesen Positionen eine hydrophile Aminosäure (Glu156) und eine neutrale Aminosäure (Gln165)(Yanagihara *et al.* 2010). Dagegen besaßen alle TRH2-Varianten an der Position 156 ein Leucin (Leu) und an der Position 165 ein Isoleucin (Ile) (siehe Abbildung 4.5B), welche beide zur Gruppe der stark hydrophoben Aminosäuren zählen.

[A] TRH1



[B] TRH2



**Abbildung 4.5:** Simulierte Quartärstruktur der porenbildenden Hämolyisinvarianten TRH1 [A] und TRH2 [B] auf Basis der TDH2-Kristallstruktur mittels SWISS-Model Server.

## 4 Diskussion

### 4.1 Bewertung der phänotypischen Methoden

Zur Charakterisierung potentiell pathogener phänotypischer Eigenschaften von *V. parahaemolyticus* Isolaten wurden verschiedene qualitative Nachweisverfahren etabliert und angewendet. Untersucht wurden mögliche Pathogenität-unterstützende Eigenschaften, wie hämolytische Aktivität auf Wagatsuma-Agar, proteolytische Aktivität auf Magermilch-Agar, die Fähigkeit zum Schwärmen und einen Biofilm zu bilden sowie die Chitinase-Produktion (siehe Tabelle 4).

Hämolytische Aktivität wird meist durch die Sekretion von Hämolysinen verursacht. Hämolysine sind unter Vibrionen weit verbreitet und dienen dazu, Zellen aufzuschließen, um den Bedarf an essentiellen Nährstoffen und Spurenelementen wie Eisen zu decken (Zhang *et al.* 2005). Man unterscheidet zwischen verschiedenen Mechanismen der hämolytischen Aktivität. Phospholipasen hydrolysieren die in der Zellmembran enthaltenen Phospholipide, was zu einer Destabilisierung der Membran führt. Dieser enzymatische Wirkmechanismus wurde z.B. für *Pseudomonas aeruginosa* und *Photobacterium damsela* beschrieben. Die meisten proteinogenen Hämolysine sind jedoch Porenbildner, wie auch TDH und TRH, die einen Kanal in der Zellmembran ausbilden (Zhang *et al.* 2005). Es besteht ein starker Zusammenhang zwischen den *V. parahaemolyticus* Hämolysinen TDH und TRH und Durchfallerkrankungen bzw. der Ausprägung einer Gastroenteritis (Shimohata *et al.* 2010). Der Wagatsuma-Agar stimuliert durch seine Zusammensetzung insbesondere die Produktion des Hämolysins TDH und dient somit als klassischer Nachweis für *tdh* positive *V. parahaemolyticus* Stämme.

Extrazelluläre Proteasen spielen bei einer Vielzahl von mikrobiellen Erregern eine Rolle bei der Pathogenität (Miyoshi *et al.* 2000). Auch für Vibrionen konnte eine Beteiligung von Proteasen bei Infektionen nachgewiesen werden, indem sie z.B. die Hautbarriere schädigen oder andere Virulenzfaktoren prozessieren. Bisher wurden eine Serin-Protease und zwei Metalloproteasen bei *V. parahaemolyticus* identifiziert, jedoch konnte ein Zusammenhang zur Pathogenität bisher noch nicht eindeutig festgestellt werden (Shinoda *et al.* 2011B).

Chitinasen katalysieren die Spaltung von Chitin, ein weit verbreitetes Polysaccharid. In der Umwelt spielen mikrobielle Chitinasen oft eine Rolle bei der Gewinnung von Nährstoffen wie Stickstoff und Kohlenstoff (Beier *et al.* 2013), sie können jedoch auch die Infektion von

Wirtszellen unterstützen, wie es z.B. über *Legionella pneumophila*, *Listeria monocytogenes* und *Salmonella enteritica* berichtet wurde. Dabei kommt es zu einer Interaktion mit Wirtsglykanen, welche das Chitin-Monomer N-Acetylglucosamin (GlcNAc) enthalten (Frederiksen *et al.* 2013). *V. cholerae* besitzt ein Chitin-bindendes Protein, das mit GlcNAc interagiert, welches sowohl als Modifikation von Glykoproteinen und Lipiden im intestinalen Epithelium des Menschen vorhanden als auch im Chitinpanzer von Zooplankton enthalten ist. Diese Beobachtung lässt vermuten, dass die Mechanismen zur Besiedlung von Zooplankton und des menschlichen Darms ähnlich sind (Kirn *et al.* 2005).

Auch für *V. parahaemolyticus* Bakterien, welche sich wie die meisten Vibrionen an das Exoskelett von Zooplankton heften, konnte eine starke Adsorption an Chitin sowie die Produktion einer aktiven Chitinase nachgewiesen werden (Kaneko *et al.* 1973, Kaneko *et al.* 1975). Bei *V. parahaemolyticus* und anderen *Vibrio*-Spezies wirkt Chitin außerdem induzierend auf die natürliche Kompetenz, also die Fähigkeit Fremd-DNA aus der Umgebung aufzunehmen und über homologe Rekombination in das Genom zu integrieren. Über diese Form des horizontalen Gentransfers könnten neue pathogene Eigenschaften erworben werden (Blokesh 2014).

Beim Schwärmverhalten werden anstelle eines einzelnen polaren Flagellums, welches für die Fortbewegung im wässrigen Milieu notwendig ist, mehrere laterale Flagellen gebildet. Diese ermöglichen eine sehr schnelle bakterielle Fortbewegung auf viskosen Oberflächen (McCarter *et al.* 2004). Schwärmen ist außerdem bei der schnellen Kolonisierung von Wirtsgewebe entscheidend (Verstraeten *et al.* 2008).

Die Biofilmbildung ist eine häufig genutzte Überlebensstrategie von Bakterien, die Infektionen verursachen. In der Umwelt liefert die sessile Lebensweise im Biofilm Schutz vor Fressfeinden, Phagen und abiotischen Stressfaktoren, im Wirt besteht ein erhöhter Schutz gegenüber der Immunabwehr sowie antimikrobieller Substanzen (Costerton *et al.* 1999, Yildiz *et al.* 2008).

**Tabelle 4:** Ausgewählte phänotypische Merkmale von Bakterien, die als Pathogenität-assoziiert gelten.

Phänotypische Eigenschaft	Potentielle Virulenzfaktoren	Potentielle Relevanz für die Pathogenität im Menschen	Literatur
Hämolytische Aktivität	Hämolysine	Zellyse, Schädigung des intestinalen Epitheliums	Zhang <i>et al.</i> 2005
Proteolytische Aktivität	Serin-Proteasen, Metalloproteasen	Zellschädigung, Prozessierung von Virulenzfaktoren	Shinoda <i>et al.</i> 2011B
Chitinolytische Aktivität	Chitinasen	Interaktion mit GlcNAc-haltigen Glykoproteinen und Glykolipiden des Wirts → Kolonisierung von Wirtsgewebe	Frederiksen <i>et al.</i> 2013, Kirn <i>et al.</i> 2005
Schwärmverhalten	Flagellen	Schnelle Fortbewegung → Kolonisierung von Wirtsgewebe	Verstraeten <i>et al.</i> 2008
Biofilmbildung	Flagellen, Pili, Polysaccharide	Schutz vor der Immunabwehr des Wirts und vor antimikrobiellen Substanzen	Yildiz <i>et al.</i> 2008, Costerton <i>et al.</i> 1999

Die Ergebnisse zur Analyse der hämolytischen Aktivität implizieren, dass der Wagatsuma-Agar zum Nachweis von *tdh* positiven Isolaten gut funktioniert, jedoch für die Detektion von Stämmen, die sowohl *tdh* als auch *trh* positiv sind, nicht geeignet ist. Dies steht in Übereinstimmung mit Beobachtungen in der Literatur (Vieira *et al.* 2011). Falsch positive Reaktionen von nicht-toxischen Umweltisolaten wurden jedoch nicht beobachtet. Die Ergebnisse der phänotypischen Tests zum Nachweis von Proteasen, Chitinasen, Schwärmverhalten und Biofilmbildung zeigten eine große Variation unter den getesteten *V. parahaemolyticus* Stämmen und es konnten keine Zusammenhänge zum Ursprung der Stämme (Umwelt oder klinisch) oder zum Besitz bestimmter Virulenzgene hergestellt werden. Daher wurden diese Methoden zur Charakterisierung weiterer Stämme nicht mehr angewendet. Allein der Hämolyse-Nachweis auf Wagatsuma-Agar „passte“ in den meisten Fällen zum Genotyp. Allerdings werden Unterschiede in der hämolytischen Aktivität einzelner Stämme bei einer quantitativen Analyse genauer detektiert und sind besser miteinander vergleichbar. Somit wurde der quantitative Hämolysetest bei den weiteren Experimenten angewendet.

## 4.2 Entwicklung eines zellfreien Systems zur Untersuchung von Hämolytinen

### 4.2.1 Vergleich: prokaryotisches und eukaryotisches System

Die Hämolytine TDH1, TDH2, TRH1 und TRH2 wurden sowohl im prokaryotischen System basierend auf *E.coli*-Lysat als auch im eukaryotischen System auf der Basis von Insektenzelllysat hergestellt. Die Templates für die Synthese wurden zuvor über eine zweistufige Expressions-PCR amplifiziert und modifiziert. Im prokaryotischen System laufen Transkription und Translation gekoppelt in einer Reaktion ab, während im eukaryotischen System zunächst die mRNA in einer Transkriptionsreaktion produziert wird und anschließend in einer zweiten Reaktion die Translation abläuft. In beiden Systemen konnten die Hämolytine synthetisiert werden, jedoch waren die Proteinausbeuten im prokaryotischen System wesentlich höher. Dies ist in Übereinstimmung mit der Literatur, wo mögliche Proteinausbeuten von bis zu 1 mg/ml für das prokaryotische System beschrieben sind (End *et al.* 2014).

Eukaryotische Extrakte ermöglichen dafür eine effizientere Produktion komplexer Proteine und posttranslationaler Modifikationen. Des Weiteren besteht bei eukaryotischen Extrakten nicht die Gefahr, dass Endotoxine, die im *E. coli*-Extrakt vorkommen können, nachfolgende Untersuchungen des synthetisierten Proteins stören. Bei den Hämolyse-Versuchen ließen sich jedoch keine störenden Effekte des *E. coli*-Lysats beobachten.

Allgemein sollte man das System wählen, welches der nativen Umgebung des gewünschten Proteins weitestgehend entspricht (Kubick 2012). Somit wurde für die weiteren Experimente zur zellfreien Proteinsynthese der Hämolytine das prokaryotische System mit *E. coli*-Extrakt verwendet. Bei allen zellfreien Syntheseexperimenten zeigte sich ein erheblicher Unterschied in den Proteinausbeuten von TDH und TRH. Dabei lagen die Ausbeuten an löslichem Protein bei den TRH-Hämolytinen bei 12-36 µg/ml, während für TDH Ausbeuten von ca.150 µg/ml erzielt wurden. Auch wenn *in vivo* ebenfalls große Expressionsunterschiede beobachtet wurden, so sind diese zum Teil auf eine unterschiedliche Promoteraktivität zurückzuführen (Nakaguchi *et al.* 2004, Shirai *et al.* 1990, Nishibuchi *et al.* 1985). Da im zellfreien System der natürliche Promoter durch einen T7-Promoter ersetzt wird, müsste es einen anderen Grund für die Unterschiede geben. Eine mögliche Erklärung für die niedrige Expression von TRH könnten Sekundärstrukturen der

mRNA sein, welche sich störend auf die Initiation der Translation auswirken können (De Smit *et al.* 1990). Jedoch genügten die Ausbeuten an zellfrei synthetisierten TRH-Proteinen für die Durchführung der Funktionsstudien. Der immunologische Nachweis des zellfrei synthetisierten TDHs mithilfe des KAP-RPLA-Tests funktionierte zuverlässig. Aufgrund einer ähnlichen Antigenität von TDH und TRH, konnten auch zellfrei synthetisierte TRH-Varianten mithilfe des Tests nachgewiesen werden.

#### 4.2.2 Vergleich von zellfrei synthetisierten TDH-Konstrukten

Es wurden acht verschiedene TDH-Konstrukte mithilfe des prokaryotischen Systems auf der Basis von *E. coli*-Lysat zellfrei hergestellt. Vier der Konstrukte bestanden aus dem Vorläuferprotein (preTDH), während die anderen vier sich aus dem reifen Protein (mTDH) zusammensetzten. Von den preTDH- und mTDH-Konstrukten trug jeweils eines ein N-terminales Strep-Tag, ein C-terminales 6xHis-Tag, beide Tags (N-terminales Strep-Tag und C-terminales 6xHis-Tag) oder kein Tag. Die Bestimmung der Syntheserate der zellfrei hergestellten Proteine erfolgte über den Einbau von <sup>14</sup>C-Leucin.

Ziel der Untersuchung war ein Vergleich der Proteinausbeuten der Signalpeptid enthaltenden Vorläuferproteine mit den Ausbeuten der reifen Proteine und inwieweit die verwendeten Proteintags einen Einfluss auf die Synthese haben. In nachfolgenden Hämolyse-Tests erfolgte ein Vergleich der Proteinfunktionalität. Als Template für die Expressions-PCR wurde chromosomale DNA des pandemischen *V. parahaemolyticus* Stammes O3:K6 eingesetzt, welcher zwei *tdh*-Varianten (*tdh1* und *tdh2*) im Genom aufweist. Die Sequenzen für die Signalpeptide beider Varianten unterscheiden sich, jedoch ist die Anfangssequenz des Genabschnitts, welcher für das reife Protein kodiert, bei beiden Varianten identisch. Somit wird während der E-PCR ausschließlich die Sequenz amplifiziert, welche für das Vorläuferprotein preTDH2 kodiert, da die Primer preTDH1 aufgrund der Sequenzunterschiede nicht binden.

Bei der Amplifikation der Sequenzen, welche für das reife Protein kodieren, wurden dagegen zu gleichen Teilen die PCR-Produkte zur Synthese von mTDH1 und mTDH2 erhalten. Im Autoradiogramm zeigten die Konstrukte des TDH-Vorläuferproteins nur eine Proteinbande, während die Konstrukte des reifen Proteins (mature protein) zwei Proteinbanden aufwiesen. Diese Proteine (mTDH1 und mTDH2) unterscheiden sich in sieben Aminosäuren in ihrer Primärsequenz, was zu einer minimal unterschiedlichen Laufgeschwindigkeit im SDS-Gel führte. Das bestimmte Molekulargewicht der zellfrei synthetisierten Proteine lag im Bereich

von 20 bis 25 kDa, was den Angaben in der Literatur entspricht (Honda *et al.* 1988; Iida *et al.* 1990).

Insgesamt war die Syntheserate mit ca. 500 µg/ml bei allen acht Konstrukten sehr ähnlich, was im Bereich der in der Literatur beschriebenen Ausbeuten für prokaryotische Systeme im Batch-Verfahren liegt (Kim *et al.* 1996, Carlson *et al.* 2012). Jedoch zeigten sich erhebliche Unterschiede beim Anteil an löslichem Protein. Die Varianten des Vorläuferproteins zeigten keine bzw. eine sehr geringe Löslichkeit. Dagegen wiesen die TDH-Konstrukte des reifen Proteins einen löslichen Anteil von 40 – 60 % auf. Damit werden mithilfe des zellfreien Systems Proteinkonzentrationen erreicht, die 80fach höher sind als Konzentrationen an TDH-Protein, welche im Kulturüberstand von *V. parahaemolyticus* detektiert werden und bei 2,2 µg/ml liegen (Nishibuchi *et al.* 1991). Die Unlöslichkeit der Vorläuferproteine ist vermutlich auf lipophile Aminosäuren im Signalpeptid zurückzuführen. Das TDH-Signalpeptid wird von den *E. coli*-Signalpeptidasen nicht erkannt und somit wird seine Abspaltung von der Polypeptidkette verhindert.

Über einen auf anti-TDH-Antikörper basierten Agglutinationstest konnten alle TDH-Konstrukte spezifisch nachgewiesen werden. Um die Funktionalität der zellfrei synthetisierten TDH-Konstrukte zu überprüfen, wurde die hämolytische Aktivität getestet. Wie zu erwarten, riefen die unlöslichen Vorläuferkonstrukte keine bzw. nur eine sehr geringe Hämolyse hervor. Die hämolytische Aktivität der mTDH-Konstrukte zeigte ein ähnliches Ergebnis im qualitativen und semiquantitativen Hämolyse-Test: das doppelt getaggte Protein (N-terminales Strep-Tag und C-terminales 6xHis-Tag) zeigte die schwächste hämolytische Aktivität, gefolgt von Strep-mTDH und mTDH-His und dem nativen mTDH ohne Tag, welches die stärkste hämolytische Aktivität hervorrief.

Studien über das TDH-Hämolsin zeigen, dass die Tetramerbildung unabdingbar für die hämolytische Aktivität ist (Yanagihara *et al.* 2010, Ohnishi *et al.* 2011). Das bedeutet, dass die zellfrei synthetisierten TDH-Monomere in der Lage sind, zu einem intakten und funktionellen Tetramer in Lösung zu oligomerisieren. Weitere Studien deuten an, dass die Adhäsion des TDH-Tetramers an die Erythrozyten von zwei Mechanismen abhängig ist: „Binding“ und „Post-binding“ (Tang *et al.* 1994). „Post-binding“-Effekte werden als solche definiert, die nach der Bindung an die Erythrozyten und vor dem Lyseprozess stattfinden. Dazu gehören die Oligomerisierung des Toxins, die Permeabilisierung der Zellmembran sowie die Insertion des Toxins in die Zellmembran. Des Weiteren sind vermutlich TDH-induzierte Phosphorylierungen von bestimmten Membranproteinen eine Voraussetzung für die Hämolyse (Yoh *et al.* 1996). Während der N-Terminus am Bindungsprozess beteiligt ist, so ist die C-terminale Region für den „Post-binding“-Prozess verantwortlich (Tang *et al.* 1997). Die Protein-getaggten Enden könnten somit einen Einfluss auf die beiden Prozesse

haben und eine Erklärung für die schwächere hämolytische Aktivität der TDH-Konstrukte mit Proteintags liefern. Jeweils eine Disulfidbrücke wird von den Monomeren des TDHs gebildet (Tsunasawa *et al.* 1987, Nishibuchi *et al.* 1989A), jedoch scheint diese nicht notwendig für die hämolytische Aktivität des TDHs zu sein (Baba *et al.* 1992, Yanagihara *et al.* 2010). Prinzipiell ist die Ausbildung einer Disulfidbrücke im einfachen Batch-Verfahren des prokaryotischen Systems mit *E. coli*-Lysat möglich (Kim *et al.* 2004).

### 4.3 Charakterisierung von *trh* positiven *V. parahaemolyticus* Stämmen

#### 4.3.1 *Trh*-Sequenzen und MLST

Die Stammbaumanalyse der kodierenden *trh*-Sequenzen aller *trh* positiven *V. parahaemolyticus* Stämme zeigt ein Clustering in drei Allelgruppen: *trh1*, *trh2* und  $\psi trh$  (Pseudogen). Alle Stämme, welche aus deutschen Küstengewässern stammten, trugen das *trh2*-Gen und besaßen einen der vier Sequenztypen (STs): ST 73, ST 6, ST 761 und ST 79. Diese STs waren in der PubMLST-Datenbank bereits abgelegt und waren ausschließlich bei *V. parahaemolyticus* Isolaten aus Norwegen und Deutschland vorhanden. Nur bei ST 6 gab es einen Stamm, der außerhalb Nordeuropas (Chile) isoliert worden war. Dieser wurde daher nicht in die Analyse einbezogen.

In Abbildung 4.2 ist der MLST-Stammbaum auf Basis des „Minimum Evolutions“-Kriteriums mit den dazugehörigen *trh*-Varianten dargestellt. Die Stammauswahl enthält sämtliche aus Deutschland und Norwegen stammende Isolate. Fast alle analysierten Stämme waren *trh* positiv bis auf einen Stamm mit ST 761 und einen Stamm mit ST 121. Betrachtet man die phylogenetische MLST-Analyse der nordeuropäischen *V. parahaemolyticus* Stämme zusammen mit den auftretenden *trh*-Sequenzen unter den Gesichtspunkten der geographischen Verteilung und der langen Zeitspanne, in welcher die Stämme aus dieser Region isoliert wurden, so lässt dies vermuten, dass *trh2* positive Stämme in diesen Gewässern persistent sind und zu der autochthonen Mikroflora gehören. Die Tatsache, dass einige Stämme des gleichen STs sowohl *trh* positiv als auch *trh* negativ sind, deutet darauf hin, dass das Virulenzgen über horizontalen Gentransfer erworben bzw. verloren wurde, wie es bereits für *tdh*-Gene beschrieben wurde (Kamruzzaman *et al.* 2008).

Einige Stämme aus dieser Studie trugen ein *trh*-Pseudogen ( $\psi trh$ ). Fast alle diese Stämme waren *tdh* positiv und stammten nicht aus Deutschland. Das regelmäßige Auftreten von *trh*-

Pseudogenen wurde bereits im Rahmen eines Konferenzvortrags von Nishibuchi beschrieben (Nishibuchi 2014), wurde jedoch bis dato noch nicht publiziert. Vermutlich kodiert  $\psi trh$  nicht für ein funktionelles Protein.

In Europa stehen Infektionen mit *V. parahaemolyticus* meist im Zusammenhang mit *tdh* positiven Stämmen (Baker-Austin *et al.* 2010), während für Infektionen durch *trh* positive Stämme bisher nur drei klinische Fälle in Norwegen (Ellingsen *et al.* 2013) und zwei in Deutschland (diese Studie) beschrieben sind. Der Stamm VN-0028 trug die *trh1*-Genvariante und wurde aus einem Patienten in Deutschland isoliert, der sich aber vermutlich zuvor auf einer Reise durch Tansania infiziert hatte. Der Stamm VN-0029 besaß die *trh2*-Variante *trh2-3* und wurde aus einem 70-jährigen Patienten isoliert, der Fisch aus der Ostsee gegessen hatte und daraufhin an Durchfall erkrankte. Interessantweise wies ein klinisches Isolat aus Norwegen (Stamm 173, Abbildung 4.2) ebenfalls das *trh2-3*-Gen auf und besaß den gleichen Sequenztyp (ST 73) wie VN-0029. Klinische Fälle durch Infektionen mit *trh* positiven *V. parahaemolyticus* Stämmen treten in anderen Ländern, wie z.B. in Kanada mit einer Häufigkeit von 22 % (nur *trh*) und 59 % (*trh/tdh*) auf (Banerjee *et al.* 2014), in Nordamerika mit 8.3 % (nur *trh*) und 24.3 % (*trh/tdh*) (Jones *et al.* 2012) und in Thailand mit 8 % (nur *trh*) und 34 % (*trh/tdh*) (Thongjun *et al.* 2013). In den zitierten Publikationen wurde nicht zwischen *trh1* und *trh2* unterschieden.

#### 4.3.2 Genotypisierung potentieller Virulenzgene

Die genetische Kopplung des *trh*-Gens mit dem Urease-Gencluster wurde bereits in der Literatur beschrieben (Park *et al.* 2000, Ellingsen *et al.* 2013, Iida *et al.* 1997) und konnte auch für die in dieser Studie analysierten *trh* positiven *V. parahaemolyticus* Stämme bestätigt werden. Eine Ausnahme bildete nur der Stamm VN-0070, welcher das Pseudogen  $\psi trh$  trug, jedoch nicht das Urease-Gencluster und somit auch keine Urease-Aktivität zeigte. Zusätzlich besaß VN-0070 kein T3SS2 $\beta$ , welches in allen anderen *trh* und *trh/tdh* positiven Stämmen über PCR detektiert wurde. Die drei T3SS2 $\beta$ -Komponenten *vscC2*, *vscS2* und *vopB2* konnten in allen übrigen Stämmen nachgewiesen werden, während das *vopC*-Gen in fünf Stämmen fehlte, welche *tdh* und  $\psi trh$  besaßen (siehe Tabelle 3.5). Das *vopC*-Gen kodiert für ein Effektorprotein des T3SS2 $\beta$ . Man könnte spekulieren, dass die Virulenz durch ein unvollständiges T3SS2 $\beta$ -Gencluster in diesen fünf Stämmen möglicherweise abgeschwächt ist. Aufgrund der Beobachtung, dass das *vopC*-Gen nur in Stämmen mit intaktem *trh*-Gen detektierbar war, wurde es in einer Expressionsstudie genauer analysiert. Das T3SS2 $\alpha$  konnte in keinem *trh* positiven Stamm nachgewiesen werden, was mit bereits publizierten Daten übereinstimmt (Okada *et al.* 2009).

Die Untersuchung weiterer potentieller Virulenzgene ergab kein spezifisches Muster. Studien zeigen, dass die genomischen Inseln Vpal-1, auf welcher u.a. das MTase-Gen liegt, Vpal-3, Vpal-4 und Vpal-5 ausschließlich in pandemischen *V. parahaemolyticus* Stämmen zu finden sind, welche erst nach 1995 auftraten. Dies ist in Übereinstimmung mit den Ergebnissen dieser Arbeit, die zeigen, dass kein *trh* positiver Stamm die genomischen Inseln aufwies. Auch Vpal-6 konnte in keinem Stamm nachgewiesen werden. Das Gen *vp0643* von Vpal-2 wurde in fünf *trh* positiven Stämmen detektiert. Jedoch gilt diese genomische Insel nicht als Pathogenitätsmarker, da sie sowohl in pathogenen als auch nicht-pathogenen Isolaten vorhanden sein kann (Chao *et al.* 2010).

Das Typ 6 Sekretionssystem (T6SS) ist vermutlich bei der Adhäsion an Wirtszellen involviert und verschafft möglicherweise durch antibakterielle Aktivitäten gegenüber artfremden Bakterien einen Fitnessvorteil in der natürlichen Umgebung (Ceccarelli *et al.* 2013, Salomon *et al.* 2013). Chao *et al.* (2010) berichteten, dass die meisten pandemischen *V. parahaemolyticus* Stämme alle T6SS-Gene aufwiesen. Die in dieser Studie untersuchten Stämme trugen nur einen Teil der T6SS-Gene, wie es auch bei nicht-pathogenen Stämmen beobachtet wurde (Chao *et al.* 2010).

Die Eigenschaft einen Biofilm zu bilden, wird von vielen Bakterien als Überlebensstrategie sowie bei der Besiedlung des Wirts genutzt (Enos-Berlage *et al.* 2005, Huq *et al.* 2008) und spielt eine Rolle bei vielen chronischen bakteriellen Infektionen (Costerton *et al.* 1999). Alle Stämme besaßen die getesteten Biofilm-Gene. Die Analyse einiger Zielgene, welche im Genom des pandemischen Stamms RIMD2210633 vorhanden sind und somit als potentielle Virulenzgene gelten, zeigte kein eindeutiges Muster. Die Gentargets *cpsA*, *hutA* und *hutR* ließen sich in allen Stämmen nachweisen, während *Vp0394* (MTase) und *acfD* in keinem der untersuchten Stämme zu finden waren. Allein das MSHA Pilin Protein kodierende Gen *mshD* trat vermehrt in der Stammgruppe mit dem  $\Psi_{trh}$  auf (fünf von sechs Stämmen), während es in der restlichen Stammauswahl nur bei zwei Stämmen detektiert wurde. Zusammenfassend kann man sagen, dass die Genotypisierung von potentiellen Virulenzgenen bei den von uns analysierten Isolaten keine Unterschiede zwischen Stämmen mit klinischem, Umwelt- oder Lebensmittelursprung gezeigt hat.

### 4.3.3 Transkriptionsanalyse der Gene *tdh*, *trh* und *vopC*

Um zu untersuchen, ob Temperaturunterschiede sowie organische Stoffe, die im menschlichen Darm vorkommen, sich induzierend auf die Expression bestimmter Virulenzgene auswirken, wurde eine Transkriptionsanalyse unter verschiedenen Wachstumsbedingungen durchgeführt. Die gewählten Temperaturen lagen bei 20°C und 37°C, repräsentativ für die Umwelt bzw. die Temperatur im menschlichen Wirt. Bei 37°C wurde zusätzlich die Wirkung von Galle und Harnstoff getestet. Galle ist wichtig für die Fettverdauung und wird von der Leber in den Darm sezerniert (Carey *et al.* 1983). Harnstoff ist das Endprodukt des Stoffwechsels von Stickstoffverbindungen und wird ebenfalls von der Leber produziert. 20 – 25 % des gesamten produzierten Harnstoffs gelangt in den Darm, wo ein weiterer Abbau durch Kommensalen stattfindet (Burne *et al.* 2000). Harnstoff ist außerdem ein weit verbreiteter Dünger in der Landwirtschaft und bestimmt mittlerweile mehr als 50 % des globalen Stickstoffdüngerverbrauchs. Dabei verunreinigt ein nicht unerheblicher Anteil an Harnstoff die Küstengewässer (Glibert *et al.* 2006), wo er u.a. Auswirkungen auf *Vibrio*-Populationen haben könnte.

Die Urease von *V. parahaemolyticus* wird bei Anwesenheit von Harnstoff exprimiert und ist aktiv. Aufgrund der schützenden Wirkung der Urease bei der Magen-Darm-Passage, welche für einige Enteropathogene demonstriert wurde, und der unmittelbaren Nähe des Urease-Genclusters, des *trh*-Gens und des T3SS2 $\beta$ -Genclusters im Genom von *V. parahaemolyticus*, wurde die Hypothese aufgestellt, dass Harnstoff sich auf die Expression dieser Virulenzgene auswirken könnte.

Die Ergebnisse der Transkriptionsstudie lassen vermuten, dass die Expression der Hämolsine eher stammspezifisch und durch weitere unbekannte Faktoren reguliert wird, als dass sie einem allgemeinen Muster folgt. Die Transkription des *trh2*-Gens war in einigen Stämmen bei einer Temperatur von 37°C leicht erhöht, während Galle und Harnstoff keinen Einfluss auf die Expression hatten. Die Transkription des *trh1*-Gens konnte bei einigen Stämmen durch die Anwesenheit von Galle induziert werden. Dieser induzierende Effekt wurde bisher noch nicht für die TRH-Expression bei *V. parahaemolyticus* beschrieben, konnte jedoch bereits bei *trh*-tragenden *V. cholera* (non-O1/non-O139) Isolaten beobachtet werden (Miller *et al.* 2012). Eine Induktion der Expression durch Galle zeigte sich außerdem bei einigen Stämmen für das *tdh*-Gen, was bereits für pandemische *V. parahaemolyticus* Stämme in der Literatur beschrieben ist (Gotoh *et al.* 2010). Harnstoff besaß weder einen Einfluss auf die *tdh*- noch auf die *trh*-Genexpression.

Das *vopC*-Gen, ein Effektor des T3SS2 $\beta$ , wurde ebenfalls in der Transkriptionsstudie analysiert. *V. parahaemolyticus* ist in der Lage, bestimmte Zelllinien zu invadieren und diese Zellinvasion wird durch VopC vermittelt (Zhang *et al.* 2012). Tierexperimente haben jedoch gezeigt, dass die VopC-vermittelte Zellinvasion kein notwendiger Schritt für die Ausprägung von Pathogenität ist (Okada *et al.* 2013). VopC aktiviert durch Deamidierung Rho-GTPasen, welche u.a. für die Bildung von Stressfasern aus Aktinfilamenten verantwortlich sind (Okada *et al.* 2013). Rho-GTPasen sind wichtige Regulatoren der Signaltransduktion und spielen eine Rolle bei einer Vielzahl an zellulären Prozessen wie z.B. der Regulation des Zellzyklus und der Apoptose. Oft kommt es bei einer Infektion zu einer Modulation bzw. Manipulierung der GTPase-vermittelten Signaltransduktion durch bakterielle Virulenzfaktoren (Boquet *et al.* 2003). Somit ist es vorstellbar, dass VopC zusammen mit anderen Faktoren an einer Infektion durch *V. parahaemolyticus* beteiligt ist.

Interessanterweise zeigte sich in der Transkriptionsstudie eine starke Induktion der *vopC*-Genexpression durch Galle. Dies galt allerdings nur für Stämme, die beide Hämolyisin-Gene (*tdh* und *trh*) aufwiesen. Möglicherweise liegen die getesteten Virulenzgene bei diesen Stämmen in einem Operon und werden koordiniert gesteuert, während bei den restlichen Stämmen die Gene anders im Genom verteilt sind und unabhängig voneinander reguliert werden. Eine durch Galle induzierte Expression von *tdh* zusammen mit T3SS2 $\alpha$ -Genen wurde bereits von Gotoh *et al.* (2010) gezeigt – jedoch noch nicht für T3SS2 $\beta$ -Gene.

In *V. parahaemolyticus* Stämmen, welche die *trh2*-Variante *trh2-3* im Genom trugen, wurde die *vopC*-Transkription durch die Anwesenheit von Harnstoff induziert. Während in der Gruppe von Stämmen mit der *trh2-2*-Variante die Transkription von *vopC* bei 37°C leicht erhöht war, so dass hier vermutlich die Temperatur eine Rolle bei der Regulierung der Expression spielt. Bei Infektionsexperimenten mit *V. parahaemolyticus* im Tiermodell konnte gezeigt werden, dass T3SS2 $\beta$  an einer enterotoxischen Wirkung beteiligt ist (Okada *et al.* 2009). Die Hochregulierung der *vopC*-Genexpression könnte somit bei einer Infektion für die Ausprägung von Pathogenität im Menschen mitverantwortlich sein.

Die Beobachtung einer induzierenden Wirkung von Harnstoff auf die Expression eines Effektors des T3SS2 $\beta$  könnte nicht nur bei humanen Infektionen von Bedeutung sein, sondern auch in der Umwelt eine Rolle spielen. Es wurde jedoch nur für einen Stamm (VN-0030) der Einfluss von Harnstoff auf die Transkription von VopC bei 20°C untersucht, welche ähnlich erhöht war wie bei 37°C (Daten nicht gezeigt). Außerdem müsste in weiteren Studien untersucht werden, ob Harnstoff auch die Expression anderer T3SS2 $\beta$ -Komponenten beeinflusst. Infolge der Nutzung von Harnstoff als Dünger in der Landwirtschaft, kommt es u.a. durch den Transport über Flüsse und Bäche letztlich zur Verunreinigung von Küstengewässern. Des Weiteren gab es erste Pilotversuche zur Ozeandüngung mit

Harnstoff, um das Wachstum von Mikroalgen zu stimulieren, damit diese Kohlenstoffdioxid binden und nach ihrem Absterben zum Meeresgrund transportieren, wo CO<sub>2</sub> nicht mehr klimawirksam sein soll. Allerdings ist die Wirksamkeit dieser Methode fraglich und schädliche Folgen für das marine Ökosystem sind sehr wahrscheinlich (Anonymous 2012).

Harnstoffdüngung kommt auch in Aquakulturen zum Einsatz, um Algenblüten hervorzurufen, die als Nahrung für die Zuchtkrabben dienen (Landesmann 1994). Dabei gelangt ein nicht unerheblicher Anteil an Harnstoff in das umliegende Wasser (Burford *et al.* 1999). Zum einen könnte sich in der Umwelt angereicherter Harnstoff auf die Vibrionen-Population auswirken, da die Urease-Aktivität von *trh* positiven *V. parahaemolyticus* Stämmen diese dazu befähigt Harnstoff als Stickstoffquelle zu nutzen. Die Eigenschaft der Harnstoffspaltung ist einzigartig innerhalb der Gattung *Vibrio* und könnte einen Wachstumsvorteil gegenüber anderen *Vibrio*-Arten bzw. *trh*-negativen *V. parahaemolyticus* Stämmen bringen. Zum anderen könnte ein aktiviertes T3SS2 $\beta$ , auch wenn seine Funktion noch nicht bekannt ist, einen Einfluss auf potentielle Fressfeinde, wie z.B. Protisten, haben und somit einen Fitnessvorteil liefern wie es bereits für T3SS2 $\alpha$ -tragende *V. parahaemolyticus* Stämme beschrieben wurde (Matz *et al.* 2011).

Eine selektive Anreicherung von *V. parahaemolyticus* Stämmen in Krabbenzuchten wäre nicht wünschenswert, da sie nicht nur humanpathogen sind, sondern auch die „Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease“ (AHPND) gleichbedeutend mit dem „Early Mortality Syndrome“ (EMS) hervorrufen können, was bereits zu großen ökonomischen Verlusten in der industriellen Krabbenzucht in Asien und Mexiko geführt hat (Aguirre-Guzmán *et al.* 2010, Tran *et al.* 2013). Allerdings scheinen bei der Auslösung dieser Tierkrankheiten andere Pathogenitätsfaktoren als TDH und TRH eine Rolle zu spielen. Eine selektive Anreicherung von *trh* positiven *V. parahaemolyticus* Stämmen wäre somit eher für den Verbraucher der Importkrabben kritisch.

#### 4.3.4 Hämolytische Aktivität auf Erythrozyten

Um zu überprüfen, ob sich die beobachteten Unterschiede in der Hämolsin-Expression der einzelnen *V. parahaemolyticus* Stämme auf phänotypischer Ebene widerspiegeln, wurde die hämolytische Aktivität gegenüber humanen und Schaferythrozyten sowie der Einfluss von Gallenextrakt untersucht. Zusätzlich wurde in einem separaten Experiment die hämolytische Aktivität der zellfrei hergestellten Hämolsine gegenüber verschiedenen Säugererythrozyten (Schaf, Kaninchen und Mensch) getestet. Die zellfreie Proteinsynthese ermöglicht die Herstellung aktiver Hämolsine. Dabei werden nur die PCR-Produkte für die Synthese der Hämolsine benötigt, welche direkt im Anschluss für Funktionsstudien, wie Hämolyse-Tests, verwendet werden können (Bechlars *et al.* 2013).

Alle *trh2* positiven Stämme (Bakterienkulturen und Kulturüberstände) zeigten keine hämolytische Aktivität sowohl gegen humane als auch gegen Schaferythrozyten, obwohl in einigen Stämmen (VN-0393, VN-3933 und VN-4016) eine erhöhte *trh2*-Transkription bei 37°C festgestellt wurde. Die beiden zellfrei synthetisierten TRH2-Varianten, TRH2-2 und TRH2-3, wiesen ebenfalls keinerlei hämolytische Aktivität gegenüber Schaf-, Kaninchen- und humanen Erythrozyten auf. Diese Ergebnisse deuten an, dass die fehlende hämolytische Aktivität von *trh2* positiven Stämmen nicht auf eine zu niedrige *trh2*-Genexpression zurückzuführen ist, sondern wahrscheinlich eher an einem inaktiven TRH2-Protein liegt. Dies ist in Übereinstimmung mit der Arbeit von Kishishita *et al.* (1992), in welcher eine fehlende Proteinfunktionalität und/oder Bindungsaktivität als Ursache für eine niedrige bzw. keine hämolytische Aktivität postuliert wird.

Die zellfrei synthetisierte TRH1-Variante des Stamms VN-0038 war stark hämolytisch gegenüber Schaferythrozyten, zeigte jedoch keine Hämolyse gegenüber humanen und Kaninchenerythrozyten. Dies passt zu der Beobachtung, dass aufgereinigtes TRH1-Protein im Vergleich zu humanen und Kaninchenerythrozyten eine 40 bis 50 fach stärkere hämolytische Aktivität gegenüber Schaferythrozyten aufwies (Honda *et al.* 1988). Beim Hämolyse-Test mit Bakterienkulturen und Kulturüberständen des Stamms VN-0038 konnte eine Aktivität gegenüber humanen und Schaferythrozyten festgestellt werden. Allerdings ist dies wahrscheinlich eine Folge der TDH-Sekretion, da der Stamm *trh* und *tdh* im Genom besitzt.

Die *in silico*-Analyse der Aminosäuresequenzen könnte eine mögliche Erklärung für die fehlende hämolytische Aktivität der TRH2-Varianten liefern. TRH2-2 und TRH2-3 besitzen sehr hydrophobe Aminosäuren, Leu156 und Ile165, während die meisten TRH1-Varianten

(auch TRH1 von VN-0038), wie auch TDH2 hydrophile bzw. neutrale Aminosäuren an den Positionen 156 und 165 aufweisen. Wie TDH, so bildet auch TRH eine Tetramerstruktur in Lösung aus (Ohnishi *et al.* 2011). Beim Homologie-Modelling wurde die 3D-Struktur des TDH-Proteins als Template verwendet, um eine mögliche Quartärstruktur der TRH-Varianten zu simulieren. Dabei zeigte sich, dass sich die beiden Positionen (156 und 165) innerhalb der zentralen Pore der simulierten Tetramerstruktur befinden, welche als Ionenkanal dient. Es wäre möglich, dass der Austausch hydrophiler bzw. neutraler Aminosäuren durch stark hydrophobe Aminosäuren die Ausbildung und Funktion eines Ionenkanals beeinträchtigt. Interessanterweise besaßen alle *trh1* tragenden Stämme die TRH1-Variante (Ser156 und Asn165) mit Ausnahme des Stamms VN-0028. Dieser wies eine TRH1-Variante mit den gleichen hydrophoben Aminosäure-Austauschen (Leu156 und Ile165) wie die TRH2-Proteine auf und zeigte keine hämolytische Aktivität. Ob die hydrophoben Aminosäuren ein Grund für die fehlende hämolytische Aktivität der TRH2-Proteine sind, müsste in Funktionsstudien mit Proteinmutanten genauer untersucht werden.

Des Weiteren deutete die Analyse der TDH2-Tetramerstruktur durch Yanagihara *et al.* (2010) auf eine Interaktion zwischen der konservierten Aminosäure Glutaminsäure an Position 138 (Glu138, ist auch in allen TRH-Varianten konserviert) mit der Aminosäure L-Glutamin an Position 165 (Gln165) hin. Diese Interaktion ist an der Stabilisierung der Tetramerstruktur beteiligt. Käme diese Interaktion aufgrund von Aminosäureaustauschen nicht zustande, so könnte dies die Funktionalität der Hämolytase beeinflussen, da die Aufrechterhaltung der Tetramerstruktur mit einer zentralen Pore unabdingbar für die (biologische) Aktivität von TDH und TRH ist (Ohnishi *et al.* 2011, Yanagihara *et al.* 2010).

Obwohl eine hämolytische Aktivität für die TRH2-Hämolytase nicht nachweisbar war, können andere biologische Aktivitäten nicht ausgeschlossen werden. Für TRH1-Hämolytase konnten bereits verschiedene toxische Eigenschaften, wie Flüssigkeitsansammlungen im „Rabbit Ileal Loop Test“, Erhöhung der Gefäßpermeabilität in der Kaninchenhaut und Kardiotoxizität in Myokardzellen nachgewiesen werden (Nelapati *et al.* 2012, Honda *et al.* 1990).

Allgemein lässt sich bei den Hämolyse-Tests eine deutlich stärkere hämolytische Aktivität der Bakterienkulturen im Vergleich zu den Kulturüberständen beobachten. Eine mögliche Erklärung dafür wäre, dass Bakterienzellen eine Vielzahl an Virulenzfaktoren (z.B. T3SS2 und Effektoren oder zellgebundene hämolytisch wirkende Proteine) exprimieren, welche zur Lyse der Erythrozyten führen würde. Des Weiteren könnten die in den Kulturüberstand sezernierten Hämolytase eine geringe Haltbarkeit haben oder durch die proteolytische Aktivität von extrazellulären und zellassoziierten Proteasen zerstört werden (Mahoney *et al.* 2010) und somit die gemessene Hämolyse auch negativ verfälschen.

Bei gleichzeitiger Betrachtung der Ergebnisse der Transkriptionsstudie und des Hämolyse-Tests spiegelt sich die durch Galle induzierte Hämolysin-Expression in einer höheren hämolytischen Aktivität wider und gibt somit ein in sich schlüssiges Bild ab. Zusätzlich konnte eine erhöhte Menge an TDH im Kulturüberstand bei zunehmender Gallenextrakt-Konzentration über den immunologischen Nachweis mithilfe des KAP-RPLA-Tests bestätigt werden. Der Kulturüberstand des *trh* positiven Stammes zeigte eine leichte Agglutination bei einer Gallenextrakt-Konzentration von 0,04 % (siehe Abbildung 3.1). Diese Konzentration an Galle wurde in der Transkriptionsstudie sowie im Hämolyse-Test verwendet und entspricht ungefähr der Konzentration im menschlichen Darm (Gotoh *et al.* 2010).

Hinsichtlich der unterschiedlichen Spezifitäten von TDH und TRH gegenüber bestimmten Säugererythrozyten zeigte sich jedoch kein ganz einheitliches Muster. So wurde beispielsweise bei Stamm VN-0050 (*trh1/tdh*) festgestellt, dass Bakterienzellen und Kulturüberstände ähnlich hämolytisch gegenüber humanen und Schaferythrozyten waren, während in der Transkriptionsanalyse ausschließlich eine Expression des *tdh*-Gens detektiert wurde. TDH ist jedoch gegenüber Schaferythrozyten nicht hämolytisch, wie die Hämolyse-Versuche mit den zellfrei exprimierten Hämolysinen gezeigt haben (siehe Tabelle 3.6). Bei Stamm VN-0038 (*trh1/tdh*) zeigte sich ebenfalls eine hämolytische Aktivität gegenüber beiden Erythrozytentypen (Schaf und human), obwohl nur die Transkription des *trh1*-Gens stark erhöht und die des *tdh*-Gens sehr niedrig war. Zellfrei hergestelltes TRH1 zeigte jedoch keine hämolytische Aktivität gegenüber humanen Erythrozyten (siehe Tabelle 3.6). Bei den Hämolyse-Versuchen mit Bakterien und Kulturüberständen lässt sich spekulieren, ob die Expression anderer Virulenzfaktoren eine Lyse der Erythrozyten mitverursacht hat oder ob die Expression der Hämolysin-Gene bei Anwesenheit von Erythrozyten anders reguliert wird. Generell wurde für *V. parahaemolyticus* Stämme mit beiden Hämolysingenen (*tdh* und *trh*) postuliert, dass diese vorwiegend TRH produzieren, während die TDH-Expression unterdrückt wird und nur in seltenen Fällen eine simultane Expression stattfindet (Shalu *et al.* 2012, Xu *et al.* 1994A). Das kann in den zuvor genannten Beispielen nicht bestätigt werden, sondern spricht vielmehr für eine stammspezifische Regulierung der Hämolysin-Expression.

Des Weiteren wurde die *tdh*-Transkription in den getesteten Stämmen unterschiedlich stark durch Galle beeinflusst. Gotoh *et al.* (2010) konnten zeigen, dass die durch Galle induzierte *tdh*-Expression über den Transkriptionsregulator *vtrB* vermittelt wird, dessen Expression ebenfalls bei Anwesenheit von Galle stark erhöht ist. Möglicherweise besitzen jene Stämme, deren *tdh*-Expression nicht durch Galle beeinflusst wurde, eine veränderte *vtrB*-Bindungsstelle oder das *vtrB*-Gen war defekt bzw. nicht im Genom vorhanden und konnte nicht exprimiert werden. Dies wurde jedoch nicht genauer untersucht.

## 5 Schlussfolgerung und Ausblick

Im ersten Teil dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Methode der zellfreien Proteinsynthese für die Herstellung der *V. parahaemolyticus*-Hämolsine „thermostable direct hemolysin“ (TDH) und „TDH-related hemolysin“ (TRH) geeignet ist. Beide Toxine gelten als wichtige Pathogenitätsfaktoren. Sie stehen im starken Zusammenhang mit der Entwicklung einer Gastroenteritis (Shirai *et al.* 1990) und stellen einen maßgeblichen Unterschied zwischen klinischen toxintragenen Stämmen und Umweltstämmen dar. Für die Identifizierung von pathogenen *V. parahaemolyticus* Stämmen im Lebensmittelbereich, aber auch in der klinischen Diagnostik, werden schnelle und einfache Antikörper-basierte Nachweissysteme, wie z.B. ELISA oder „Lateral Flow Assay“ benötigt. Die Entwicklung dieser Nachweissysteme würde größere Mengen an Hämolsin erfordern, um es sowohl als Referenzmaterial als auch als Antigen bei der Herstellung von Antikörpern nutzen zu können. Als längerfristiges Ziel sollten somit TDH und TRH im größeren Maßstab mittels zellfreier Proteinsynthese synthetisiert werden. Bei der Entwicklung eines Nachweissystems wäre es von Vorteil, ein großes Spektrum an Hämolsinvarianten abzudecken, um möglichst alle pathogenen Stämme detektieren zu können.

Die zellfreie Proteinsynthese stellt dabei eine schnelle Methode zur Herstellung von Proteinen dar, da eine Expression direkt vom PCR-Produkt ermöglicht wird. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass TDH in signifikanten Mengen über das prokaryotische *E. coli*-System hergestellt werden kann, wobei die Syntheserate fast 100-fach über der unter optimalen Kultivierungsbedingungen mit *V. parahaemolyticus* erzielten Proteinausbeute lag (Nishibuchi *et al.* 1991). Die zellfreie Synthese des TRHs im *E. coli*-System fiel vergleichsweise geringer aus, war jedoch ebenfalls ca. 100-fach höher als unter klassischen Produktionsbedingungen (Shirai *et al.* 1990). Trotzdem müssten bei der zellfreien Synthese der TRH-Proteine die Bedingungen verbessert werden, um quantitativ nutzbare Hämolsinausbeuten zu erhalten.

Im zweiten Teil erfolgte eine Charakterisierung *trh*-tragender *V. parahaemolyticus* Stämme aus Deutschland und dem Ausland und eine Funktionsanalyse verschiedener TRH-Varianten im Detail. In Deutschland isolierte Stämme wiesen ausschließlich Allele des *trh2*-Gens auf. Obwohl mehrere *trh2*-tragende Stämme in Zusammenhang mit klinischen Fällen gebracht werden konnten (Ellingsen *et al.* 2013, Okuda *et al.* 1997) und auch ein klinisches *trh2* positives Isolat aus Deutschland (VN-0029) in der Studie näher analysiert wurde, konnten keine hämolytischen Eigenschaften – weder für die *trh2* positiven Stämme noch für die zellfrei hergestellten TRH2-Varianten - nachgewiesen werden. Als eine mögliche Erklärung

für die fehlende hämolytische Aktivität wurden zwei Austausche zu hydrophoben Aminosäuren im TRH2-Protein gefunden, welche sich negativ auf die Ausbildung des Ionenkanals innerhalb der postulierten Tetramerstruktur auswirken könnten (Simulation der Quartärstruktur).

Diese Ergebnisse stellen TRH2 als Virulenzfaktor in Frage. Trotzdem können andere biologische Aktivitäten dieser Proteine nicht ausgeschlossen werden, die bereits für TRH1-Varianten beschrieben wurden, wie z.B. Flüssigkeitsansammlungen im „Rabbit Ileal Loop Test“, Erhöhung der Gefäßpermeabilität der Kaninchenhaut und Kardiotoxizität in Myokardzellen (Nelapati *et al.* 2012, Honda *et al.* 1990). Weitere Funktionsstudien sowie Untersuchungen im Tiermodell sind daher notwendig, um die Rolle der TRH2-Proteine zu klären. Es scheinen jedoch noch andere Virulenzfaktoren an einer Infektion und Erkrankung durch *V. parahaemolyticus* beteiligt zu sein.

Diese Vermutung wird von Berichten gestützt, dass *tdh/trh* und T3SS2 negative *V. parahaemolyticus* Stämme eine akute Gastroenteritis auslösen konnten (Ottaviani *et al.* 2012). Jedoch sollte bei solchen seltenen Fällen die Gefahr der Fehldiagnose durch eine sogenannte Mischinfektion, also einer Infektion mit mehreren Erregern, nicht unterschätzt werden. Es wurde von Mischinfektionen mit mehreren *Vibrio*-Spezies (McMeeking *et al.* 1986), mit Vibrionen und anderen Enteropathogenen (Bockemühl *et al.* 1982) und viral-bakteriellen Infektionen (Marhall 2002) berichtet.

Eine interessante Beobachtung ist, dass alle intakten *trh*-Gene offensichtlich zusammen mit dem *vopC*-Gen, das für einen Effektor des T3SS2 $\beta$  kodiert, auftreten. Dagegen besitzen Stämme, welche das Pseudogen  $\psi$ *trh* tragen, kein oder ein verändertes *vopC*-Gen. Hierbei müsste die Frage erörtert werden, ob zusätzlich noch andere T3SS2 $\beta$ -Komponenten im Genom fehlen und ob das Sekretionssystem in diesen Stämmen überhaupt funktionell ist. Des Weiteren wäre es interessant zu untersuchen, ob der induktive Effekt von Harnstoff auf die *vopC*-Transkription auch bei anderen Genen des T3SS2 $\beta$  zu beobachten ist und ob diese Induktion die Virulenz eines Stammes verstärkt. Sehr häufig verursacht eine *V. parahaemolyticus* Infektion wässrigen Durchfall, jedoch tritt gelegentlich auch blutiger Durchfall auf (Daniels *et al.* 2000A). Blutungen im Magen-Darm-Trakt können zu höheren BUN-Werten (BUN = blood urea nitrogen) durch die erhöhte Absorption von Blutproteinen führen (Cappell *et al.* 2008, Stellato *et al.* 1980). Vielleicht könnten klinische Begleiterscheinungen, wie Urämie und Azotämie, welche sich durch höhere Harnstoffkonzentrationen im Blut auszeichnen, insbesondere den Infektionsverlauf einer Septikämie beeinflussen.

Aus den Ergebnissen zur Charakterisierung von *trh* positiven *V. parahaemolyticus* Stämmen geht hervor, dass die alleinige Detektion von *trh* und *tdh* zur Abschätzung des pathogenen Potentials eines Stammes nicht ausreichend ist. Die An- bzw. Abwesenheit der Hämolysin-Gene mittels PCR stellt jedoch momentan die wichtigste Untersuchung von *V. parahaemolyticus*-Isolaten aus Meeresfrüchten und Fisch dar und führt im positiven Fall dazu, dass so belastetes „Seafood“, wenn es roh verzehrt werden soll, vom Verkauf ausgeschlossen wird. Hier sollte vielmehr eine feinere Differenzierung, insbesondere der *trh*-Varianten, und die Untersuchung auf T3SS2 $\beta$ -Komponenten wie VopC vorgenommen werden, um eine verlässlichere Risikobewertung in der Lebensmittelanalyse sowie in der klinischen Diagnostik zu erlangen. Des Weiteren ist eine Identifizierung und Charakterisierung weiterer Virulenzfaktoren notwendig, um die noch weitgehend ungeklärte Pathogenität von *V. parahaemolyticus* besser zu verstehen.

## 6 Zusammenfassung

*Vibrio parahaemolyticus* ist weltweit der bedeutendste Erreger von Lebensmittelinfektionen durch Verzehr von rohen oder ungenügend erhitzten Meeresfrüchten und Fisch. Dabei können Symptome einer akuten Gastroenteritis, wie Erbrechen, Durchfall oder abdominale Krämpfe auftreten. Als wichtige Pathogenitätsfaktoren gelten die Hämolyse TDH (thermostable direct hemolysin) und TRH (TDH-related hemolysin) sowie das T3SS2 (Typ 3 Sekretionssystem 2). In deutschen Küstengewässern treten *tdh* positive Stämme nur sehr selten auf, während *trh* positive Isolate regelmäßig detektiert werden. In dieser Arbeit wurde eine Vielzahl von *V. parahaemolyticus* Stämmen verschiedenen geographischen Ursprungs auf die Gene von Virulenzfaktoren mittels PCR untersucht und über verschiedene phänotypische Tests, wie z.B. hämolytische Aktivität, Sekretion extrazellulärer Enzyme, Resistenz gegenüber humanem Serum und Biofilmbildung, welche als potentiell pathogene Eigenschaften gelten, charakterisiert. Zur genaueren Untersuchung und Charakterisierung der Hämolyse TDH und TRH wurde deren Synthese in einem zellfreien System etabliert. Um den Einfluss des Signalpeptids und verschiedener Protein-Tags auf die Funktionalität zu untersuchen, wurden acht TDH-Konstrukte mittels zellfreier Proteinsynthese hergestellt und anschließend die hämolytische Aktivität getestet. TDH-Konstrukte mit Signalpeptid, also Vorläuferproteine, wiesen fast keine Löslichkeit in wässriger Lösung auf und waren nicht hämolytisch, während TDH-Konstrukte ohne Signalpeptid, also reife Proteine, löslich waren und eine eindeutige hämolytische Aktivität zeigten. Die Protein-Tag-Kombinationen zeigten eine geringe bis starke Hemmung der Proteinfunktionalität.

Als zentraler Aspekt dieser Arbeit wurde eine Auswahl an einheimischen *trh* positiven *V. parahaemolyticus* Stämmen mit *trh* positiven Stämmen aus anderen Regionen der Welt bezüglich ihres pathogenen Potentials und des Verwandtschaftsgrads miteinander verglichen. Die kodierende Sequenz der *trh*-Gene zeigte eine Clusterung in drei Varianten: *trh1*, *trh2* und *ψtrh*. Letzteres ist vermutlich ein Pseudogen. Alle deutschen Stämme, welche aus Muscheln, Meerwasser und Patienten isoliert wurden, trugen die *trh2*-Genvariante. Die Multilokus-Sequenz-Analyse zeigte eine nahe Verwandtschaft zwischen deutschen und norwegischen Isolaten, welche somit wahrscheinlich Teil der autochthonen marinen Mikroflora in Nordeuropa sind. Bei Stämmen, welche das Pseudogen *ψtrh* im Genom trugen, konnte das *vopC*-Gen, welches für einen Effektor des T3SS2 kodiert, nicht nachgewiesen werden. Alle anderen *trh* positiven Stämme dagegen besaßen das *vopC*-Gen. Die Transkription der *trh*-Varianten sowie des *vopC*-Gens wurde unter verschiedenen Wachstumsbedingungen untersucht. Dabei wurde der Einfluss von Galle und Harnstoff

untersucht, welche u.a. in den menschlichen Gastrointestinaltrakt ausgeschieden werden. Die *trh1*-Transkription konnte mithilfe von Gallenextrakt induziert werden, während keine Induktion der *trh2*-Genexpression beobachtet wurde. Die *vopC*-Transkription konnte in *trh2* positiven Stämmen durch Harnstoff induziert werden. Die meisten *trh1*-tragenden Stämme waren gegenüber Schaferythrozyten hämolytisch, während alle *trh2* positiven Stämme keine hämolytische Aktivität zeigten. Auch das zellfrei hergestellte TRH1-Protein war stark hämolytisch, während die zellfrei synthetisierten TRH2-Proteine keine Aktivität zeigten. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen eine hohe Diversität unter *trh* positiven *V. parahaemolyticus* Stämmen und stellen die Funktionalität der TRH2-Proteine sowie die Rolle des  $\psi$ *trh*-Gens als Pathogenitätsfaktor in Frage. Für eine Bewertung des pathogenen Potentials von *V. parahaemolyticus* Stämmen wäre eine Differenzierung zwischen den *trh*-Varianten sowie die Detektion von Komponenten des T3SS2 wie VopC eine sinnvolle Maßnahme in der Diagnostik und könnte zu einer verbesserten Risikobewertung beitragen.

## 7 Summary

*Vibrio parahaemolyticus* is the major pathogen associated with the consumption of raw or undercooked seafood and causing acute gastroenteritis. The hemolysins TDH (thermostable direct hemolysin) and TRH (TDH-related hemolysin) as well as T3SS2 (type 3 secretion system 2) are considered to be major pathogenicity factors. While *tdh* positive strains are rarely detected in coastal waters of Germany, *trh* harbouring strains are found regularly. In this work *V. parahaemolyticus* strains of different geographic origin were analyzed for pathogenicity factors using PCR. Selected phenotypic traits which might contribute to pathogenicity, like hemolytic activity, secretion of extracellular enzymes, serum resistance and biofilm formation were tested in various assays. The cell-free synthesis of hemolysins TDH and TRH was established to analyze and compare the hemolysins. Eight TDH constructs were synthesized in a cell-free system to investigate the influence of signal peptide and protein tags on protein functionality. Precursor proteins with signal peptide and mature proteins were tested by hemolysis assays showing that precursor proteins were not soluble and therefore not active while mature proteins were soluble and revealed hemolytic activity. Inhibition of protein functionality by protein tags varied between tag types and tag combinations.

Major part of this work was the characterization of the pathogenic potential of *trh* harbouring *V. parahaemolyticus* strains from Germany which were compared to *trh* positive strains from other geographical regions. The complete *trh* sequences revealed a clustering into three different types: *trh1* and *trh2* genes and a pseudogene  $\Psi trh$ . All German isolates possessed alleles of the *trh2* gene. Multilocus sequence typing analysis indicated a close relationship of German and Norwegian isolates suggesting that these strains belong to the autochthonous microflora of Northern Europe seawaters. Strains carrying the pseudogene  $\Psi trh$  were negative for T3SS2 effector *vopC* while all other *trh* positive strains exhibited *vopC* gene. Transcription of *trh* and *vopC* genes was analyzed under different growth conditions to examine the influence of bile and urea as both substances are present in the human intestinal tract. *Trh2* gene expression was not altered by bile while *trh1* genes were inducible. *VopC* could be induced by urea in *trh2* bearing strains. Most *trh1* carrying strains were hemolytic against sheep erythrocytes while all *trh2* positive strains did not show any hemolytic activity. TRH variants were synthesized in a cell-free system and their hemolytic activity was analyzed. TRH1 was active against sheep erythrocytes while TRH2 variants were not active at all. This work reveals a high diversity among *trh* positive *V.*

*parahaemolyticus* strains. The function of TRH2 hemolysins and the role of the pseudogene  $\Psi_{trh}$  as a pathogenicity factor are questionable. To assess the pathogenic potential of *V. parahaemolyticus* strains a differentiation of *trh* variants and the detection of T3SS2 components like vopC would improve *V. parahaemolyticus* diagnostics and could lead to a refinement of the risk assessment in food analyses and clinical diagnostics.

## 8 Literaturverzeichnis

**Aguirre-Guzmán, G., J. G. Sánchez-Martínez, R. Pérez-Castañeda, A. Palacios-Monzón, T. Trujillo-Rodríguez and N. I. De La Cruz-Hernández** (2010). "Pathogenicity and Infection Route of *Vibrio parahaemolyticus* in American White Shrimp, *Litopenaeus vannamei*." J World Aquacult Soc **41**(3): 464-470.

**Anonymous** (2010): "Update: Cholera Outbreak – Haiti, 2010. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). MMWR Morb Mortal Wkly Rep. Vol. 59, No. 45

**Anonymous** (2011). "Risk assessment of *Vibrio parahaemolyticus* in seafood." World Health Organization, Food and Agriculture Organization of The United Nations. <http://www.fao.org/docrep/014/i2225e/i2225e2200.pdf>.

**Anonymous** (2012): "Ist die Ozeandüngung zur Bekämpfung des Klimawandels geeignet? Antworten aus Sicht des Umweltbundesamtes". Position Umweltbundesamt

**Austin, B.** (2010). "Vibrios as causal agents of zoonoses." Vet Microbiol **140**(3-4): 310-317.

**Baba, K., S. Yamasaki, M. Nishibuchi and Y. Takeda** (1992). "Examination by site-directed mutagenesis of the amino acid residues of the Thermostable Direct Hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus* required for its hemolytic activity." Microb Pathogenesis **12**(4): 279-287.

**Baker-Austin, C., L. Stockley, R. Rangdale and J. Martinez-Urtaza** (2010). "Environmental occurrence and clinical impact of *Vibrio vulnificus* and *Vibrio parahaemolyticus*: A European perspective." Environ Microbiol Rep **2**(1): 7-18.

**Baker-Austin, C., J. A. Trinanes, N. G. H. Taylor, R. Hartnell, A. Siitonen and J. Martinez-Urtaza** (2012). "Emerging *Vibrio* risk at high latitudes in response to ocean warming." Nature Clim Change **3**(1): 73-77.

**Banerjee, S. K., A. K. Kearney, C. A. Nadon, C. L. Peterson, K. Tyler, L. Bakouche, C. G. Clark, L. Hoang, M. W. Gilmour and J. M. Farber** (2014). "Phenotypic and genotypic characterization of Canadian clinical isolates of *Vibrio parahaemolyticus* - 2000 to 2009." J Clin Microbiol. **52**(4):1081-8

**Bartelt, E** (2014). Personal communication. Niedersächsisches Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (LAVES)

**Bauer, A., O. Ostensvik, M. Florvag, O. Ormen and L. M. Rorvik** (2006). "Occurrence of *Vibrio parahaemolyticus*, *V. cholerae*, and *V. vulnificus* in Norwegian Blue Mussels (*Mytilus edulis*) 2." Appl Environ Microbiol **72**(4): 3058-3061.

**Bauer, A. and L. M. Roervik** (2007). "A novel multiplex PCR for the identification of *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio cholerae* and *Vibrio vulnificus*." Letts Appl Microbiol **45**(4): 371-375.

**Bechlars, S., D. A. Wüstenhagen, K. Dräger, R. Dieckmann, E. Strauch and S. Kubick**, (2013). "Cell-free synthesis of functional thermostable direct hemolysins of *Vibrio parahaemolyticus*." Toxicon **76**: 132-142.

- Beier, S. and S. Bertilsson** (2013). "Bacterial chitin degradation—mechanisms and ecophysiological strategies." Front Microbiol **4**: 149.
- Bier, N., S. Bechlars, S. Diescher, F. Klein, G. Hauk, O. Duty, E. Strauch and R. Dieckmann** (2013). "Genotypic diversity and virulence characteristics of clinical and environmental *Vibrio vulnificus* isolates from the baltic sea region." Appl Environ Microbiol **79**(12): 3570-3581.
- Blake, P. A., R. E. Weaver and D. G. Hollis** (1980). "Diseases of humans (other than cholera) caused by vibrios." Annu Rev Microbiol **34**: 341-367.
- Blokesch, M.** (2014). "The Lifestyle of *Vibrio cholerae* Fosters Gene Transfers." Microbe **9**(2): 64-70
- Bockemühl, J., K. Fleischer and I. Bednarek** (1983). "A cholera-like illness in a traveller due to a mixed infection with enterotoxigenic *Escherichia coli*, *Vibrio parahaemolyticus* and *Pseudomonas aeruginosa*." Infection **11**(5): 272-274.
- Böer, S. I., E. A. Heinemeyer, K. Luden, R. Erler, G. Gerdt, F. Janssen and N. Brennholt** (2013). "Temporal and spatial distribution patterns of potentially pathogenic *Vibrio* spp. at recreational beaches of the German north sea." Microb Ecol **65**(4): 1052-1067.
- Boquet, P. and E. Lemichez** (2003). "Bacterial virulence factors targeting Rho GTPases: parasitism or symbiosis?" Trends Cell Biol **13**(5): 238-246.
- Boyd, E. F., A. L. Cohen, L. M. Naughton, D. W. Ussery, T. T. Binnewies, O. C. Stine and M. A. Parent** (2008). "Molecular analysis of the emergence of pandemic *Vibrio parahaemolyticus* ." BMC Microbiol **8**: 110.
- Brayton, P. R., R. B. Bode and R. R. Colwell** (1986). "*Vibrio cincinnatiensis* sp. nov., a new human pathogen." J Clin Microbiol **23**(1): 104-108.
- Broberg, C. A., T. J. Calder and K. Orth** (2011). "*Vibrio parahaemolyticus* cell biology and pathogenicity determinants." Microbes Infect **13**(12-13): 992-1001.
- Broedel, A. K., J. A. Raymond, J. G. Duman, F. F. Bier and S. Kubick** (2013). "Functional evaluation of candidate ice structuring proteins using cell-free expression systems." J Biotechnol **163**(3): 301-310.
- Burford M.A. and Glibert P.M.** (1999):" Short-term nitrogen uptake and regeneration in early and late growth-phase shrimp ponds." Aquaculture Res **30**: 215–227.
- Burne, R. A. and Y. Y. Chen** (2000). "Bacterial ureases in infectious diseases." Microbes Infect **2**(5): 533-542.
- Cabello, F. C., R. T. Espejo, M. C. Hernandez, M. L. Rioseco, J. Ulloa and J. A. Vergara** (2007). "*Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 epidemic diarrhea, Chile, 2005." Emerg Infect Dis **13**(4): 655-656.
- Caburlotto, G., M. Gennari, V. Ghidini, M. Tafi and M. M. Lleo** (2009). "Presence of T3SS2 and other virulence-related genes in *tdh*-negative *Vibrio parahaemolyticus* environmental strains isolated from marine samples in the area of the Venetian Lagoon, Italy." FEMS Microbiol Ecol **70**(3): 506-514.

- Caburlotto, G., M. M. Lleò, T. Hilton, A. Huq, R. R. Colwell and J. B. Kaper** (2010). "Effect on human cells of environmental *Vibrio parahaemolyticus* strains carrying type III secretion system 2." Infect Immun **78**(7): 3280-3287.
- Cai, S. H., Z. H. Wu, J. C. Jian and Y. S. Lu** (2007). "Cloning and expression of gene encoding the thermostable direct hemolysin from *Vibrio alginolyticus* strain HY9901, the causative agent of vibriosis of crimson snapper (*Lutjanus erythropterus*) 1." J Appl Microbiol **103**(2): 289-296.
- Cappell, M. S. and D. Friedel** (2008). "Initial management of acute upper gastrointestinal bleeding: from initial evaluation up to gastrointestinal endoscopy." Med Clin North Am **92**(3): 491-509, xi.
- Carey, M. C., D. M. Small and C. M. Bliss** (1983). "Lipid digestion and absorption." Annu Rev Physiol **45**: 651-677.
- Carlson, E. D., R. Gan, C. E. Hodgman and M. C. Jewett** (2012). "Cell-free protein synthesis: Applications come of age." Biotechnol Adv **30**(5): 1185-1194.
- Cawley, P. F. M.** (1972): "A Review of the Literature on *Vibrio parahaemolyticus*-Its Isolation and Identification." N.Z. f. med. Lab. Technol. **27**(2)
- Ceccarelli, D., N. A. Hasan, A. Huq and R. R. Colwell** (2013). "Distribution and dynamics of epidemic and pandemic *Vibrio parahaemolyticus* virulence factors." Front Cell Infect Microbiol **3**:97.
- Chao, G., X. Jiao, X. Zhou, F. Wang, Z. Yang, J. Huang, Z. Pan, L. Zhou and X. Qian** (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**(6): 649-658.
- Chen, Y., J. Dai, J. G. Morris and J. A. Johnson** (2010). "Genetic analysis of the capsule polysaccharide (K antigen) and exopolysaccharide genes in pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6." BMC Microbiol **10**:274
- Cherwonogrodzky, J. W. and A. G. Clark** (1981). "Effect of pH on the production of the Kanagawa hemolysin by *Vibrio parahaemolyticus*." Infect Immun **34**(1): 115-119.
- Chiou, C. S., S. Y. Hsu, S. I. Chiu, T. K. Wang and C. S. Chao** (2000). "*Vibrio parahaemolyticus* serovar O3:K6 as cause of unusually high incidence of food-borne disease outbreaks in Taiwan from 1996 to 1999." J Clin Microbiol **38**(12): 4621-4625.
- Chowdhury, N. R., S. Chakraborty, T. Ramamurthy, M. Nishibuchi, S. Yamasaki, Y. Takeda and G. B. Nair** (2000). "Molecular evidence of clonal *Vibrio parahaemolyticus* pandemic strains." Emerg Infect Dis **6**(6): 631-636.
- Costerton, J. W., P. S. Stewart and E. P. Greenberg** (1999). "Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections." Science **284**(5418): 1318-1322.
- Daniels, N. A., B. Ray, A. Easton, N. Marano, E. Kahn, A. L. McShan, 2nd, L. Del Rosario, T. Baldwin, M. A. Kingsley, N. D. Pühr, J. G. Wells and F. J. Angulo** (2000)A. "Emergence of a new *Vibrio parahaemolyticus* serotype in raw oysters: A prevention quandary." Jama **284**(12): 1541-1545.

- Daniels, N. A. and A. Shafaie** (2000). "A review of pathogenic *Vibrio* infections for clinicians." Infect Med **17**(10): 665-685.
- De Smit, M. H. and J. V. Duin** (1990). Control of Prokaryotic Translational Initiation by mRNA Secondary Structure. Prog Nucleic Acid Res Mol Biol **38**: 1-35.
- DePaola, A.** (1981). "*Vibrio cholerae* in Marine Foods and Environmental Waters: A Literature Review." J Food Sci **46**(1): 66-70.
- Dobrindt, U., B. Hochhut, U. Hentschel and J. Hacker** (2004). "Genomic islands in pathogenic and environmental microorganisms." Nat Rev Microbiol **2**(5): 414-424.
- Ellingsen, A. B., H. Jørgensen, S. Wagley, M. Monshaugen and L. M. Rørvik** (2008). "Genetic diversity among Norwegian *Vibrio parahaemolyticus*." J Appl Microbiol **105**(6): 2195-2202.
- Ellingsen, A. B., J. S. Olsen, P. E. Granum, L. M. Rørvik and N. González-Escalona** (2013). "Genetic characterization of trh positive *Vibrio* spp. isolated from Norway." Front Cell Infect Microbiol **3**:107.
- End, C., C. Walczuch and M. Buntru** (2014). "Zellfreie Proteinexpression für Forschung und Produktion." BIOSpektrum **20**(1): 70-72.
- Enos-Berlage, J. L., Z. T. Guvener, C. E. Keenan and L. L. McCarter** (2005). "Genetic determinants of biofilm development of opaque and translucent *Vibrio parahaemolyticus*." Mol Microbiol **55**(4): 1160-1182.
- Fabrizi, A., L. Falzano, C. Frank, G. Donelli, P. Matarrese, F. Raimondi, A. Fasano and C. Fiorentini** (1999). "*Vibrio parahaemolyticus* thermostable direct hemolysin modulates cytoskeletal organization and calcium homeostasis in intestinal cultured cells." Infect Immun **67**(3): 1139-1148.
- Farmer, J. J., III** (2006). The Family *Vibrionaceae*. The Prokaryotes. M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer and E. Stackebrandt, Springer New York: 495-507.
- Frederiksen, R. F., D. K. Paspaliari, T. Larsen, B. G. Storgaard, M. H. Larsen, H. Ingmer, M. M. Palcic and J. J. Leisner** (2013). "Bacterial chitinases and chitin-binding proteins as virulence factors." Microbiology **159**(Pt 5): 833-847.
- Fukui, T., K. Shiraki, D. Hamada, K. Hara, T. Miyata, S. Fujiwara, K. Mayanagi, K. Yanagihara, T. Iida, E. Fukusaki, T. Imanaka, T. Honda and I. Yanagihara** (2005). "Thermostable direct hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus* is a bacterial reversible amyloid toxin." Biochemistry **44**(29): 9825-9832.
- Glibert, P. M., J. Harrison, C. Heil and S. Seitzinger** (2006). "Escalating worldwide use of urea - a global change contributing to coastal eutrophication." Biogeochemistry **77**(3): 441-463.
- Gonzalez-Escalona, N., G. M. Blackstone and A. DePaola** (2006). "Characterization of a *Vibrio alginolyticus* strain, isolated from Alaskan oysters, carrying a hemolysin gene similar to the thermostable direct hemolysin-related hemolysin gene (*trh*) of *Vibrio parahaemolyticus*." Appl Environ Microbiol **72**(12): 7925-7929.

- Gonzalez-Escalona, N., J. Martinez-Urtaza, J. Romero, R. T. Espejo, L. A. Jaykus and A. DePaola** (2008). "Determination of molecular phylogenetics of *Vibrio parahaemolyticus* strains by multilocus sequence typing." J Bacteriol **190**(8): 2831-2840.
- Gotoh, K., T. Kodama, H. Hiyoshi, K. Izutsu, K. S. Park, R. Dryselius, Y. Akeda, T. Honda and T. Iida** (2010). "Bile acid-induced virulence gene expression of *Vibrio parahaemolyticus* reveals a novel therapeutic potential for bile acid sequestrants." PLoS ONE **5**(10): e13365
- Hacker, J., B. Hochhut, B. Middendorf, G. Schneider, C. Buchrieser, G. Gottschalk and U. Dobrindt** (2004). "Pathogenomics of mobile genetic elements of toxigenic bacteria." Int J Med Microbiol **293**(7-8): 453-461.
- Hacker, J. and J. B. Kaper** (2000). "Pathogenicity islands and the evolution of microbes." Annu Rev Microbiol **54**: 641-679.
- Hally, R. J., R. A. Rubin, H. S. Fraimow and M. L. Hoffman-Terry** (1995). "Fatal *Vibrio parahemolyticus* septicemia in a patient with cirrhosis. A case report and review of the literature." Dig Dis Sci **40**(6): 1257-1260.
- Ham, H. and K. Orth** (2012). "The role of type III secretion system 2 in *Vibrio parahaemolyticus* pathogenicity." J Microbiol **50**(5): 719-725.
- Hamada, D., T. Higurashi, K. Mayanagi, T. Miyata, T. Fukui, T. Iida, T. Honda and I. Yanagihara** (2007). "Tetrameric Structure of Thermostable Direct Hemolysin from *Vibrio parahaemolyticus* Revealed by Ultracentrifugation, Small-angle X-ray Scattering and Electron Microscopy." J Mol Biol **365**(1): 187-195.
- Han, H., H. C. Wong, B. Kan, Z. Guo, X. Zeng, S. Yin, X. Liu, R. Yang and D. Zhou** (2008). "Genome plasticity of *Vibrio parahaemolyticus*: Microevolution of the 'pandemic group'." BMC Genomics **9**:570
- Hervio-Heath, D., R. R. Colwell, A. Derrien, A. Robert-Pillot, J. M. Fournier and M. Pommepuy** (2002). "Occurrence of pathogenic vibrios in coastal areas of France." J Appl Microbiol **92**(6): 1123-1135.
- Hiyoshi, H., T. Kodama, T. Iida and T. Honda** (2010). "Contribution of *Vibrio parahaemolyticus* virulence factors to cytotoxicity, enterotoxicity, and lethality in mice." Infect Immun **78**(4): 1772-1780.
- Hiyoshi, H., T. Kodama, K. Saito, K. Gotoh, S. Matsuda, Y. Akeda, T. Honda and T. Iida** (2011). "VopV, an F-actin-binding type III secretion effector, is required for *Vibrio parahaemolyticus*-induced enterotoxicity." Cell Host Microbe **10**(4): 401-409.
- Holding, A. J. and J. G Collee** (1971). "Routine biochemical tests." Methods in Microbiology **6A**:1-5. Edited by J. R. Norris & D. W. Ribbons. London: Academic Press.
- Honda, T., Y. X. Ni, A. Hata, M. S. Yoh, T. Miwatani, T. Okamoto, K. Goshima, H. Takakura, S. Tsunasawa and F. Sakiyama** (1990). "Properties of a hemolysin related to the thermostable direct hemolysin produced by Kanagawa phenomenon negative, clinical isolate of *Vibrio parahemolyticus*." Can J Microbiol **36**(6): 395-399.

- Honda, T., Y. X. Ni and T. Miwatani** (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**(4): 961-965.
- Huq, A., C. A. Whitehouse, C. J. Grim, M. Alam and R. R. Colwell** (2008). "Biofilms in water, its role and impact in human disease transmission." Curr Opin Biotechnol **19**(3): 244-247.
- Iida, T., O. Suthienkul, K. S. Park, G. Q. Tang, R. K. Yamamoto, M. Ishibashi, K. Yamamoto and T. Honda** (1997). "Evidence for genetic linkage between the *ure* and *trh* genes in *Vibrio parahaemolyticus*." J Med Microbiol **46**(8): 639-645.
- Iida, T. and K. Yamamoto** (1990). "Cloning and expression of two genes encoding highly homologous hemolysis from a Kanagawa-phenomenon-positive *Vibrio parahaemolyticus* T4750 strain." Gene **93**(1): 9-15.
- Izutsu, K., K. Kurokawa, K. Tashiro, S. Kuhara, T. Hayashi, T. Honda and T. Iida** (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**(3): 1016-1023.
- Jaques, S. and L. L. McCarter** (2006). "Three new regulators of swarming in *Vibrio parahaemolyticus*." J Bacteriol **188**(7): 2625-2635.
- Jermutus, L., L. A. Ryabova and A. Pluckthun** (1998). "Recent advances in producing and selecting functional proteins by using cell-free translation." Curr Opin Biotechnol **9**(5): 534-548.
- Johnson, C. N.** (2013). "Fitness factors in vibrios: a mini-review." Microb Ecol **65**(4): 826-851.
- Jones, J. L., C. H. M. Lüdeke, J. C. Bowers, N. Garrett, M. Fischer, M. B. Parsons, C. A. Bopp and A. DePaola** (2012). "Biochemical, serological, and virulence characterization of clinical and oyster *Vibrio parahaemolyticus* isolates." J Clin Microbiol **50**(7): 2343-2352.
- Joyce, E. A., K. Chan, N. R. Salama and S. Falkow** (2002). "Redefining bacterial populations: a post-genomic reformation." Nat Rev Genet **3**(6): 462-473.
- Julie, D., L. Solen, V. Antoine, C. Jaufrey, D. Annick and H. H. Dominique** (2010). "Ecology of pathogenic and non-pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* on the French Atlantic coast. Effects of temperature, salinity, turbidity and chlorophyll a." Environ Microbiol **12**(4): 929-937.
- Kamruzzaman, M., P. Bhoopong, V. Vuddhakul and M. Nishibuchi** (2008). "Detection of a functional insertion sequence responsible for deletion of the thermostable direct hemolysin gene (*tdh*) in *Vibrio parahaemolyticus*." Gene **421**(1-2): 67-73.
- Kaneko, T. and R. R. Colwell** (1973). "Ecology of *Vibrio parahaemolyticus* in Chesapeake Bay." J Bacteriol **113**(1): 24-32.
- Kaneko, T. and R. R. Colwell** (1975). "Adsorption of *Vibrio parahaemolyticus* onto chitin and copepods." Appl Microbiol **29**(2): 269-274.

- Katzen, F., G. Chang and W. Kudlicki** (2005). "The past, present and future of cell-free protein synthesis." Trends Biotechnol **23**(3): 150-156.
- Kim, D. M., T. Kigawa, C. Y. Choi and S. Yokoyama** (1996). "A highly efficient cell-free, protein synthesis system from *Escherichia coli*." Eur J Biochem **239**(3): 881-886.
- Kim, D. M. and J. R. Swartz** (2004). "Efficient Production of a Bioactive, Multiple Disulfide-Bonded Protein Using Modified Extracts of *Escherichia coli*." Biotechnol Bioeng **85**(2): 122-129.
- Kirn, T. J., B. A. Jude and R. K. Taylor** (2005). "A colonization factor links *Vibrio cholerae* environmental survival and human infection." Nature **438**(7069): 863-866.
- Kishishita, M., N. Matsuoka, K. Kumagai, S. Yamasaki, Y. Takeda and M. Nishibuchi** (1992). "Sequence variation in the thermostable direct hemolysin-related hemolysin (*trh*) gene of *Vibrio parahaemolyticus*." Appl Environ Microbiol **58**(8): 2449-2457.
- Kodama, T., M. Rokuda, K. S. Park, V. V. Cantarelli, S. Matsuda, T. Iida and T. Honda** (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**(11): 2598-2609.
- Köhler, C., C. Mayer, P. Gröbner and W. Piendl** (1996). "Use of T7 RNA Polymerase in an Optimized *Escherichia coli* Coupled *in vitro* Transcription-Translation System." European Journal of Biochemistry **236**(1): 234-239.
- Kubick, S.** (2012): "Proteinsynthese-Toxine aufspüren". labor&more, Heft 3.12, S. 66-70
- Landesman, L.** (1994): "Negative impacts of coastal tropical aquaculture developments". World Aquacult **25**: 12-17.
- Lhafi, S. K. and M. Kühne** (2007). "Occurrence of *Vibrio* spp. in blue mussels (*Mytilus edulis*) from the German Wadden Sea." Int J Food Microbiol **116**(2): 297-300.
- Livak, K. J. and T. D. Schmittgen** (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method." Methods **25**(4): 402-408.
- Mahoney, J. C., M. J. Gerding, S. H. Jones and C. A. Whistler** (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**(22): 7459-7465.
- Marshall JA.** (2002): "Mixed Infections of Intestinal Viruses and Bacteria in Humans". In: Brogden KA, Guthmiller JM, editors. Polymicrobial Diseases. Washington (DC): ASM Press. Chapter 15. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK2483/>
- Martinez-Urtaza, J., B. Huapaya, R. G. Gavilan, V. Blanco-Abad, J. Ansedo-Bermejo, C. Cadarso-Suarez, A. Figueiras and J. Trinanes** (2008). "Emergence of Asiatic *Vibrio* diseases in South America in phase with El Niño." Epidemiology **19**(6): 829-837.
- Martinez-Urtaza, J., A. Lozano-Leon, A. DePaola, M. Ishibashi, K. Shimada, M. Nishibuchi and E. Liebana** (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**(10): 4672-4678.

- Martinez-Urtaza, J., L. Simental, D. Velasco, A. DePaola, M. Ishibashi, Y. Nakaguchi, M. Nishibuchi, D. Carrera-Flores, C. Rey-Alvarez and A. Pousa** (2005). "Pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6, Europe." Emerg Infect Dis **11**(8): 1319-1320.
- Mason, P. R.** (2009). "Zimbabwe experiences the worst epidemic of cholera in Africa." J Infect Dev Ctries **3**(2): 148-151.
- Matz, C., B. Nouri, L. McCarter and J. Martinez-Urtaza** (2011). "Acquired type III secretion system determines environmental fitness of epidemic *Vibrio parahaemolyticus* in the interaction with bacterivorous protists." PLoS ONE **6**(5): e20275
- McCarter, L. L.** (2004). "Dual flagellar systems enable motility under different circumstances." J Mol Microbiol Biotechnol **7**(1-2): 18-29.
- McMeeking, A. A., W. J. Codd and B. A. Hanna** (1986). "Report of a wound infection caused by *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus*." Diagn Microbiol Infect Dis **5**(3): 221-223.
- Mead, P. S., L. Slutsker, V. Dietz, L. F. McCaig, J. S. Bresee, C. Shapiro, P. M. Griffin and R. V. Tauxe** (1999). "Food-related illness and death in the United States." Emerg Infect Dis **5**(5): 607-625.
- Messelhäusser, U., J. Colditz, D. Thärigen, W. Kleih, C. Höller and U. Busch** (2010). "Detection and differentiation of *Vibrio* spp. in seafood and fish samples with cultural and molecular methods." Int J Food Microbiol **142**(3): 360-364.
- Miller, K. A., E. Hamilton and M. Dziejman** (2012). "The *Vibrio cholerae trh* gene is coordinately regulated *in vitro* with type III secretion system genes by VtrA/VtrB but does not contribute to caco2-bbe cell cytotoxicity." Infect Immun **80**(12): 4444-4455.
- Miyamoto, Y., T. Kato, Y. Obara, S. Akiyama, K. Takizawa and S. Yamai** (1969). "*In vitro* hemolytic characteristic of *Vibrio parahaemolyticus*: its close correlation with human pathogenicity." J Bacteriol **100**(2): 1147-1149.
- Miyoshi, S. and S. Shinoda** (2000). "Microbial metalloproteases and pathogenesis." Microbes Infect **2**(1): 91-98.
- Moll, A., F. Cabello and K. N. Timmis** (1979). "Rapid assay for the determination of bacterial resistance to the lethal activity of serum." FEMS Microbiol Lett **6**(5): 273-276.
- Morris, J. G., Jr.** (2003). "Cholera and other types of vibriosis: a story of human pandemics and oysters on the half shell." Clin Infect Dis **37**(2): 272-280.
- Nagayama, K., K. Yamamoto, T. Mitawani and T. Honda** (1995). "Characterisation of a haemolysin related to Vp-TDH produced by a Kanagawa phenomenon-negative clinical isolate of *Vibrio parahaemolyticus*." J Med Microbiol **42**(2): 83-90.
- Nair, G. B., T. Ramamurthy, S. K. Bhattacharya, B. Dutta, Y. Takeda and D. A. Sack** (2007). "Global dissemination of *Vibrio parahaemolyticus* serotype O3:K6 and its serovariants." Clin Microbiol Rev **20**(1): 39-48.
- Nakaguchi, Y. and M. Nishibuchi** (2005). "The promoter region rather than its downstream inverted repeat sequence is responsible for low-level transcription of the thermostable direct hemolysin-related hemolysin (*trh*) gene of *Vibrio parahaemolyticus*." J Bacteriol **187**(5): 1849-1855.

- Nelapati, S., K. Nelapati and B. K. Chinnam** (2012). "*Vibrio parahaemolyticus*- An emerging foodborne pathogen-A Review." Vet World **5**(1): 48-63.
- Nevin, D. E. and J. M. Pratt** (1991). "A coupled *in vitro* transcription-translation system for the exclusive synthesis of polypeptides expressed from the T7 promoter." FEBS Lett **291**(2): 259-263.
- Newton, A., M. Kendall, D. J. Vugia, O. L. Henao and B. E. Mahon** (2012). "Increasing rates of vibriosis in the United States, 1996-2010: review of surveillance data from 2 systems." Clin Infect Dis **54 Suppl 5**: S391-395.
- Newton, A. E., N. Garrett, S. G. Stroika, J. L. Halpin, M. Turnsek and R. K. Mody** (2014). "Increase in *Vibrio parahaemolyticus* infections associated with consumption of Atlantic Coast shellfish--2013." MMWR Morb Mortal Wkly Rep **63**(15): 335-336.
- Nishibuchi, M.** (2014). Recent developments in seafood safety with respect to *Vibrio parahaemolyticus* VIBRIO 2014. Edinburgh, UK: 21, 22.
- Nishibuchi, M., A. Fasano, R. G. Russell and J. B. Kaper** (1992). "Enterotoxigenicity of *Vibrio parahaemolyticus* with and without genes encoding thermostable direct hemolysin." Infect Immun **60**(9): 3539-3545.
- Nishibuchi, M. and J. B. Kaper** (1985). "Nucleotide sequence of the thermostable direct hemolysin gene of *Vibrio parahaemolyticus*." J Bacteriol **162**(2): 558-564.
- Nishibuchi, M. and J. B. Kaper** (1990). "Duplication and variation of the thermostable direct haemolysin (*tdh*) gene in *Vibrio parahaemolyticus*." Mol Microbiol **4**(1): 87-99.
- Nishibuchi, M. and J. B. Kaper** (1995). "Thermostable direct hemolysin gene of *Vibrio parahaemolyticus*: a virulence gene acquired by a marine bacterium." Infect Immun **63**(6): 2093-2099.
- Nishibuchi, M., K. Kumagai and J. B. Kaper** (1991). "Contribution of the *tdh1* gene of Kanagawa phenomenon-positive *Vibrio parahaemolyticus* to production of extracellular thermostable direct hemolysin." Microb Pathogenesis **11**(6): 453-460.
- Nishibuchi, M., M. Shirai, S. Yamasaki, A. Terai, K. Baba, K. Kumagai and Y. Takeda** (1989)A. "Dynamics of the thermostable direct hemolysin gene (*tdh* gene) of *Vibrio* species." Jpn J Med Sci Biol **42**(5-6): 195-196.
- Nishibuchi, M., T. Taniguchi, T. Misawa, V. Khaeomaneelam, T. Honda and T. Miwatani** (1989)B. "Cloning and nucleotide sequence of the gene (*trh*) encoding the hemolysin related to the thermostable direct hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus*." Infect Immun **57**(9): 2691-2697.
- Noriea III, N. F., C. N. Johnson, K. J. Griffitt and D. J. Grimes** (2010). "Distribution of type III secretion systems in *Vibrio parahaemolyticus* from the northern Gulf of Mexico." J Appl Microbiol **109**(3): 953-962.
- Ochman H, AS Gerber, DL Hartl** (1988). "Genetic applications of an inverse polymerase chain reaction." Genetics **120**:621-623

- Ohnishi, K., K. Nakahira, S. Unzai, K. Mayanagi, H. Hashimoto, K. Shiraki, T. Honda and I. Yanagihara (2011). "Relationship between heat-induced fibrillogenicity and hemolytic activity of thermostable direct hemolysin and a related hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus*." FEMS Microbiol Lett **318**(1): 10-17.
- Okada, N., T. Iida, K. S. Park, N. Goto, T. Yasunaga, H. Hiyoshi, S. Matsuda, T. Kodama and T. Honda (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**(2): 904-913.
- Okada, N., S. Matsuda, J. Matsuyama, K. S. Park, C. De Los Reyes, K. Kogure, T. Honda and T. Iida (2010). "Presence of genes for type III secretion system 2 in *Vibrio mimicus* strains." BMC Microbiol **10**:302.
- Okada, R., X. Zhou, H. Hiyoshi, S. Matsuda, X. Chen, Y. Akeda, T. Kashimoto, B. M. Davis, T. Iida, M. K. Waldor and T. Kodama (2013). "The *Vibrio parahaemolyticus* effector VopC mediates Cdc42-dependent invasion of cultured cells but is not required for pathogenicity in an animal model of infection." Cell Microbiol **16**(6):938-47.
- Osawa, R. and S. Yamai (1996). "Production of thermostable direct hemolysin by *Vibrio parahaemolyticus* enhanced by conjugated bile acids." Appl Environ Microbiol **62**(8): 3023-3025.
- Ottaviani, D., F. Leoni, E. Rocchegiani, S. Santarelli, C. Canonico, L. Masini, V. Ditrani and A. Carraturo (2008). "First clinical report of pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 infection in Italy." J Clin Microbiol **46**(6): 2144-2145.
- Ottaviani, D., F. Leoni, R. Serra, L. Serracca, L. Decastelli, E. Rocchegiani, L. Masini, C. Canonico, G. Talevi and A. Carraturo (2012). "Nontoxicogenic *Vibrio parahaemolyticus* strains causing acute gastroenteritis." J Clin Microbiol **50**(12): 4141-4143.
- Pan, T. M., C. S. Chiou, S. Y. Hsu, H. C. Huang, T. K. Wang, S. I. Chiu, H. L. Yea and C. L. Lee (1996). "Food-borne disease outbreaks in Taiwan, 1994." J Formos Med Assoc **95**(5): 417-420.
- Paranjpye, R., O. S. Hamel, A. Stojanovski and M. Liermann (2012). "Genetic diversity of clinical and environmental *vibrio parahaemolyticus* strains from the Pacific northwest." Appl Environ Microbiol **78**(24): 8631-8638.
- Park, K.-S., T. Ono, M. Rokuda, M.-H. Jang, T. Iida and T. Honda (2004)A. "Cytotoxicity and Enterotoxicity of the Thermostable Direct Hemolysin-Deletion Mutants of *Vibrio parahaemolyticus*." Microbiol Immunol **48**(4): 313-318.
- Park, K. S., T. Iida, Y. Yamaichi, T. Oyagi, K. Yamamoto and T. Honda (2000). "Genetic characterization of DNA region containing the *trh* and *ure* genes of *Vibrio parahaemolyticus*." Infect Immun **68**(10): 5742-5748.
- Park, K. S., T. Ono, M. Rokuda, M. H. Jang, K. Okada, T. Iida and T. Honda (2004)B. "Functional characterization of two type III secretion systems of *Vibrio parahaemolyticus*." Infect Immun **72**(11): 6659-6665.
- Powell, A., C. Baker-Austin, S. Wagley, A. Bayley and R. Hartnell (2013). "Isolation of Pandemic *Vibrio parahaemolyticus* from UK Water and Shellfish Produce." Microb Ecol **65**(4):924-7.

- Quilici, M. L., A. Robert-Pillot, J. Picart and J. M. Fournier** (2005). "Pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 spread, France." Emerg Infect Dis **11**(7): 1148-1149.
- Raimondi, F., J. P. Y. Kao, C. Fiorentini, A. Fabbri, G. Donelli, N. Gasparini, A. Rubino and A. Fasano** (2000). "Enterotoxicity and cytotoxicity of *Vibrio parahaemolyticus* thermostable direct hemolysin in *in vitro* systems." Infect Immun **68**(6): 3180-3185.
- Reidl, J. and K. E. Klose** (2002). "*Vibrio cholerae* and cholera: out of the water and into the host." FEMS Microbiol Rev **26**(2): 125-139.
- Ritchie, J. M., H. Rui, X. Zhou, T. Iida, T. Kodoma, S. Ito, B. M. Davis, R. T. Bronson and M. K. Waldor** (2012). "Inflammation and disintegration of intestinal villi in an experimental model for *Vibrio parahaemolyticus*-induced diarrhea." PLoS Pathogens **8**(3): e1002593.
- Robert-Pillot, A., A. Guenole, J. Lesne, R. Delesmont, J. M. Fournier and M. L. Quilici** (2004). "Occurrence of the *tdh* and *trh* genes in *Vibrio parahaemolyticus* isolates from waters and raw shellfish collected in two French coastal areas and from seafood imported into France." Int J Food Microbiol **91**(3): 319-325.
- Rodriguez-Kabana, R., G. Godoy, G. Morgan-Jones, and R. A. Shelby** (1983). "The determination of soil chitinase activity: conditions for assay and ecological studies." Plant Soil **75**:95–106.
- Roque, A., C. Lopez-Joven, B. Lacuesta, L. Elandaloussi, S. Wagley, M. D. Furones, I. Ruiz-Zarzuela, I. De Blas, R. Rangdale and B. Gomez-Gil** (2009). "Detection and identification of *tdh*- and *trh*-positive *Vibrio parahaemolyticus* strains from four species of cultured bivalve molluscs on the Spanish Mediterranean coast." Appl Environ Microbiol **75**(23): 7574-7577.
- Sachse, R., R. Quast, A. Sonnabend, M. Stech and S. Kubick** (2014). "Membranproteinsynthese: Zellfrei geht's schneller!" BIOspektrum **20**(5): 570-573.
- Salomon, D., H. Gonzalez, B. L. Updegraff and K. Orth** (2013). "*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**(4): e61086.
- Schirmeister, F., R. Dieckmann, S. Bechlars, N. Bier, S. M. Faruque and E. Strauch** (2014). "Genetic and phenotypic analysis of *Vibrio cholerae* non-O1, non-O139 isolated from German and Austrian patients." Eur J Clin Microbiol Infect Dis **33**(5): 767-778.
- Shalu, O. A., R. V. Pisanov and E. V. Monakhova** (2012). "Efficiency of *Vibrio parahaemolyticus* *tdh* gene expression depends upon two point mutations in its promoter region." Russ J Genet **48**(12): 1177-1183.
- Shimohata, T. and A. Takahashi** (2010). "Diarrhea induced by infection of *Vibrio parahaemolyticus*." J Med Investig **57**(3-4): 179-182.
- Shinoda, S.** (2011)A. "Sixty years from the discovery of *Vibrio parahaemolyticus* and some recollections." Biocontrol Sci **16**(4): 129-137.
- Shinoda, S. and S. I. Miyoshi** (2011)B. "Proteases produced by vibrios." Biocontrol Sci **16**(1): 1-11.

- Shirai, H., H. Ito, T. Hirayama, Y. Nakamoto, N. Nakabayashi, K. Kumagai, Y. Takeda and M. Nishibuchi** (1990). "Molecular epidemiologic evidence for association of thermostable direct hemolysin (TDH) and TDH-related hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus* with gastroenteritis." Infect Immun **58**(11): 3568-3573.
- Spirin, A. S., V. I. Baranov, L. A. Ryabova, S. Y. Ovodov and Y. B. Alakhov** (1988). "A continuous cell-free translation system capable of producing polypeptides in high yield." Science **242**(4882): 1162-1164.
- Stech, M., D. A. Wüstenhagen, S. Kubick,** (2013): „Zellfreie Proteinsynthese – Konzentration auf das Wesentliche“. Laborjournal online. <http://www.laborjournal.de/rubric/methoden/methoden/v141.lasso>
- Stech, M., R. Quast, B. Sachse, R. Schulze, C. Wüstenhagen, D. A. and Kubick, S.** (2014). "A continuous-exchange cell-free protein synthesis system based on extracts from cultured insect cells." PLoS One **9**(5): e96635.
- Stellato, T., R. S. Rhodes and W. S. McDougal** (1980). "Azotemia in upper gastrointestinal hemorrhage. A review." Am J Gastroenterol **73**(6): 486-489.
- Stingl, K., K. Altendorf and E. P. Bakker** (2002). "Acid survival of *Helicobacter pylori*: how does urease activity trigger cytoplasmic pH homeostasis?" Trends Microbiol **10**(2): 70-74.
- Suffredini, E., C. Lopez-Joven, L. Maddalena, L. Croci and A. Roque** (2011). "Pulsed-field gel electrophoresis and pcr characterization of environmental *Vibrio parahaemolyticus* strains of different origins." Appl Environ Microbiol **77**(17): 6301-6304.
- Tada, J., T. Ohashi, N. Nishimura, Y. Shirasaki, H. Ozaki, S. Fukushima, J. Takano, M. Nishibuchi and Y. Takeda** (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**(6): 477-487.
- Takahashi, A., C. Yamamoto, T. Kodama, K. Yamashita, N. Harada, M. Nakano, T. Honda and Y. Nakaya** (2006). "Pore formation of thermostable direct hemolysin secreted from *Vibrio parahaemolyticus* in lipid bilayers." Int J Toxicol **25**(5): 409-418.
- Takikawa, I.** (1958): Studies on pathogenic halophilic bacteria. Yokohama Med. Bull. **2**:313-322.
- Tamura, K., G. Stecher, D. Peterson, A. Filipinski and S. Kumar** (2013). "MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0." Mol Biol Evol. **30**(12): 2725-2729.
- Tang, G., T. Iida, K. Yamamoto and T. Honda** (1997). "Analysis of functional domains of *Vibrio parahaemolyticus* thermostable direct hemolysin using monoclonal antibodies." FEMS Microbiol Lett **150**(2): 289-296.
- Tang, G. Q., T. Iida, K. Yamamoto and T. Honda** (1994). "A mutant toxin of *Vibrio parahaemolyticus* thermostable direct hemolysin which has lost hemolytic activity but retains ability to bind to erythrocytes." Infect Immun **62**(8): 3299-3304.
- Tantillo, G. M., M. Fontanarosa, A. Di Pinto and M. Musti** (2004). "Updated perspectives on emerging vibrios associated with human infections." Lett Appl Microbiol **39**(2): 117-126.

- Tena, D. Arias, M. Alvarez, B. T. Mauleon, C. Jimenez, M. P. and Bisquert, J.** (2010). "Fulminant necrotizing fasciitis due to *Vibrio parahaemolyticus*." J Med Microbiol **59**(2): 235-238.
- Thompson, F. L., T. Iida and J. Swings** (2004). "Biodiversity of vibrios." Microbiol Mol Biol Rev **68**(3): 403-431.
- Thompson, J. R., S. Pacocha, C. Pharino, V. Klepac-Ceraj, D. E. Hunt, J. Benoit, R. Sarma-Rupavtarm, D. L. Distel and M. F. Polz** (2005). "Genotypic diversity within a natural coastal bacterioplankton population." Science **307**(5713): 1311-1313.
- Thompson, F.L. Swings, J.** (2006) Taxonomy of the Vibrios. In *The Biology of Vibrios* ed. Thompson, F.L., Austin, B. and Swings, J., 29–43. Washington, DC: ASM Press.
- Thongjun, J., P. Mittraparp-Arthorn, M. Yingkajorn, J. Kongreung, M. Nishibuchi and V. Vuddhakul** (2013). "The Trend of *Vibrio parahaemolyticus* Infections in Southern Thailand from 2006 to 2010." Trop Med Health **41**(4): 151-156.
- Tran, L. Nunan, L. Redman, R.M. Mohney, L.L. Pantoja, C.R. Fitzsimmons, K. and Lightner, D.V.** (2013). "Determination of the infectious nature of the agent of acute hepatopancreatic necrosis syndrome affecting penaeid shrimp." Dis Aquat Organ **105**(1): 45-55.
- Troisfontaines, P. and G. R. Cornelis** (2005). "Type III secretion: More systems than you think." Physiology **20**(5): 326-339.
- Tsunasawa, S., A. Sugihara, T. Masaki, F. Sakiyama, Y. Takeda, T. Miwatani and K. Narita** (1987). "Amino acid sequence of thermostable direct hemolysin produced by *Vibrio parahaemolyticus*." J Biochem **101**(1): 111-121.
- Velazquez-Roman, J., N. Leon-Sicairos, J. H.-D. de and A. Canizalez-Roman** (2013). "Pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 on the American continent." Front Cell Infect Microbiol **3**: 110.
- Verstraeten, N., K. Braeken, B. Debkumari, M. Fauvart, J. Fransaer, J. Vermant and J. Michiels** (2008). "Living on a surface: swarming and biofilm formation." Trends Microbiol **16**(10): 496-506.
- Vieira, R. H. S. F., R. A. Costa, F. G. R. Menezes, G. C. Silva, G. N. D. Theophilo, D. P. Rodrigues and R. Maggioni** (2011). "Kanagawa-Negative, tdh- and trh-Positive *Vibrio parahaemolyticus* Isolated from Fresh Oysters Marketed in Fortaleza, Brazil." Curr Microbiol **63**(2):126-30.
- Wang, H. Z., M. M. L. Wong, D. O'Toole, M. M. H. Mak, R. S. S. Wu and R. Y. C. Kong** (2006). "Identification of a DNA methyltransferase gene carried on a pathogenicity island-like element (VPAl) in *Vibrio parahaemolyticus* and its prevalence among clinical and environmental isolates." Appl Environ Microbiol **72**(6): 4455-4460.
- Xiao, X., Y. Yan, Y. Zhang, L. Wang, X. Liu, L. Yang, Y. Tan, Z. Guo, R. Yang and D. Zhou** (2011) "A novel genotyping scheme for *Vibrio parahaemolyticus* with combined use of large variably-presented gene clusters (LVPCs) and variable-number tandem repeats (VNTRs)." Int J Food Microbiol **149**(2):143-51.

- Xie, Z. Y., C. Q. Hu, C. Chen, L. P. Zhang and C. H. Ren** (2005). "Investigation of seven *Vibrio* virulence genes among *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio parahaemolyticus* strains from the coastal mariculture systems in Guangdong, China." Lett Appl Microbiol **41**(2): 202-207.
- Xu, M., T. Iida, K. Yamamoto, Y. Takarada, T. Miwatani and T. Honda** (1994)A. "Demonstration and characterization of simultaneous production of a thermostable direct hemolysin (TDH/I) and a TDH-related hemolysin (TRHx) by a clinically isolated *Vibrio parahaemolyticus* strain, TH3766." Infect Immun. **62**(1): 166-171.
- Xu, M., K. Yamamoto, T. Honda and X. Ming** (1994)B. "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**(15): 4757-4760.
- Yanagihara, I., K. Nakahira, T. Yamane, S. Kaieda, K. Mayanagi, D. Hamada, T. Fukui, K. Ohnishi, S. Kajiyama, T. Shimizu, M. Sato, T. Ikegami, M. Ikeguchi, T. Honda and H. Hashimoto** (2010). "Structure and functional characterization of *Vibrio parahaemolyticus* thermostable direct hemolysin." J Biol Chem **285**(21): 16267-16274.
- Yeung, P. S. and K. J. Boor** (2004). "Epidemiology, pathogenesis, and prevention of foodborne *Vibrio parahaemolyticus* infections." Foodborne Pathog Dis **1**(2): 74-88.
- Yildiz, F. H. and K. L. Visick** (2009). "*Vibrio* biofilms: so much the same yet so different." Trends Microbiol **17**(3): 109-118.
- Yoh, M.** (1991). "Characterization of thermostable direct hemolysins encoded by four representative *tdh* genes of *Vibrio parahaemolyticus*." Microb Pathogenesis **10**(2): 165-172.
- Yoh, M., G. Q. Tang, T. Iida, N. Morinaga, M. Noda and T. Honda** (1996). "Phosphorylation of a 25 kDa protein is induced by thermostable direct hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus*." Int J Biochem Cell Biol **28**(12): 1365-1369.
- Zhang, L., A. M. Krachler, C. A. Broberg, Y. Li, H. Mirzaei, C. J. Gilpin and K. Orth** (2012). "Type III Effector VopC Mediates Invasion for *Vibrio* Species." Cell Rep **1**(5): 453-460.
- Zhang, L. and K. Orth** (2013). "Virulence determinants for *Vibrio parahaemolyticus* infection." Curr Opin Microbiol **16**(1): 70-77.
- Zhang, X. H. and B. Austin** (2005). "Haemolysins in *Vibrio* species." J Appl Microbiol **98**(5): 1011-1019.
- Zhao, Y., X. Tang and W. Zhan** (2011). "Cloning, Expressing, and Hemolysis of *tdh*, *trh* and *tlh* Genes of *Vibrio parahaemolyticus*." J Ocean Univ China **10**(3): 275-279.
- Zhou, X., B. E. Gewurz, J. M. Ritchie, K. Takasaki, H. Greenfeld, E. Kieff, B. M. Davis and M. K. Waldor** (2013). "A *Vibrio parahaemolyticus* T3SS effector mediates pathogenesis by independently enabling intestinal colonization and inhibiting TAK1 activation." Cell Rep **3**(5): 1690-1702.

## 9 Publikationsverzeichnis

**Bier N, Bechlars S, Diescher S, Klein F, Hauk G, Duty O, Strauch E, Dieckmann R.** (2013) „Genotypic diversity and virulence characteristics of clinical and environmental *Vibrio vulnificus* isolates from the Baltic Sea region“. Appl Environ Microbiol **79**(12):3570-81.

**Bechlars S, Wüstenhagen DA, Dräger K, Dieckmann R, Strauch E, Kubick S.** (2013) „Cell-free synthesis of functional thermostable direct hemolysins of *Vibrio parahaemolyticus*“. Toxicon **76**:132-42.

**Schirmeister F, Dieckmann R, Bechlars S, Bier N, Faruque SM, Strauch E.** (2014):„Genetic and phenotypic analysis of *Vibrio cholerae* non-O1, non-O139 isolated from German and Austrian patients“. Eur J Clin Microbiol Infect Dis **33**(5):767-78.

**Stephan Huehn, Christin Eichhorn, Sara Urmersbach, Janina Breidenbach, Silke Bechlars, Nadja Bier, Thomas Alter, Edda Bartelt, Christina Frank, Boris Oberheitmann, Florian Gunzer, Nicole Brennholt, Simone Böer, Bernd Appel, Ralf Dieckmann, Eckhard Strauch.**(2014):„Pathogenic vibrios in environmental, seafood and clinical sources in Germany“. Int J Med Microbiol **304**(7):843-850.

**Bechlars S, Jäckel C, Diescher S, Wüstenhagen DA, Kubick S, Dieckmann R, Strauch E.** (2015) „Characterization of *trh2* harbouring *Vibrio parahaemolyticus* strains isolated in Germany“. (PLOS ONE **10**(3):e0118559. doi: 10.1371/journal.pone.0118559)

## **10 Lebenslauf**

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

## 11 Anhang

### A Sequenzen

#### *trh1* (VN-0024, VN-0038 und VN-0396)

```

1      ATGAAACTAA AACTCTACTT TGCCTTCAGT TTGCTATTGG CTTCGATATT TTCAGTATCT
61     AAATCATTTCG CGATTGACCT GCCATCCATA CCTTTTCCTT CTCCAGGTTC GGATGAGCTA
121    CTATTTGTCG TTAGAAATAC AACAATAAAA ACTGAATCAC CAGTTAACGC AATCGTTGAT
181    GACTACTGGA CAAACCGAAA CATAAAACGA AAACCATATA AAAGCGTTCA CGGTCAATCT
241    ATTTTCACGA CTTCAGGCTC AAAATGGTTA AGCGCCTATA TGACGGTAAA TATTAATGGA
301    AATAACTACA CAATGGCTGC TCTTTCTGGC TATAAAGATG GCCTTTCAAC GGTCTTCACA
361    AAATCAGAAA AAACAAGCCT AAATCAGAAC TATTCTTCTG TTAGTGATTT CGTTGGTGAG
421    AATGAAGAAT CATTGCCAAG TGTAACGTAT TTGGATGAAA CGCCAGAATA TTTCGTCAAT
481    GTCGAAGCAT ATGAGAGCGG AAATGGGCAT ATGTTTGTTA TGTGTATTTT CAATAAATCA
541    TCATTTGATG AATGTATGTC ACAAATTTAA

```

#### *trh1* (VN-0028)

```

1      ATGAAACTAA AACTCTATTT TGCTTTTCAGT TTGCTATTGG CTTCGATATT TTCAGTATCT
61     AAATCATTTCG CGATTGACCT ACCATCCGTA CCTTTTCCTT CTCCAGGTTC GGATGAGCTA
121    CTATTTGTCG TTAGAAATAC AACAATAAAA ACTGAATCAC CAGTTAACGC AATCGTTGAT
181    GACTACTGGA CAAACCGAAA CATAAAACGA AAACCATATA AAAGCGTTCA CGGTCAATCT
241    ATTTTCACGA CTTCAGGCTC AAAATGGTTA AGCGCCTATA TGACGGTAAA TATTAATGGG
301    AATAACTACA CAATGGCTGC TCTTTCTGGC TATAAAGATG GCCTTTCAAC GGTCTTCACA
361    AAATCAGAAA AAACAAGCCT AAATCAGAAC TACTCTTCTG TTAGTGATTT CGTTGGTGAA
421    AATGAAAAAT CATTGCCAAG TGTAACGTAT TTGGATGAAA CATCAGAATA TTTCGTCAAT
481    GTCGAAGCAT ATGAGAGCGG AAATGGGCAT ATGTTTGTTA TGTGTATTTT CAATAAATTA
541    TCATTTGGCG AATGTAAATC ACAAATTTAA

```

**trh1 (VN-0045 und VN-0050)**

```

1      ATGAAACTAA AACTCTACTT TGCCTTCAGT TTGCTATTGG CTTCGATATT TTCAGTATCT
61     AAATCATTTCG CGATTGACCT GCCATCCATA CCTTTTCCTT CTCCAGGTTC GGATGAGCTA
121    CTATTTGTTCG TTAGAAATAC AACAATAAAA ACTGAATCAC CAGTTAACGC AATCGTTGAT
181    GACTACTGGA CAAACCGAAA CATAAAACGA AAACCATATA AAAGCGTTCA CGGTCAATCT
241    ATTTTCACGA CTTCAGGCTC AAAATGGTTA AGCGCCTATA TGACGGTAAA TATTAATGGA
301    AATAACTACA CAATGGCTGC TCTTTCTGGC TATAAAGATG GCCTTTCAAC GGTCTTCACA
361    AAATCAGAAA AAACAAGCCT AAATCAGAAC TATTCTTCTG TTAGTGATTT CGTTGGTGAG
421    AATGAAGAAT CATTGCCAAG TGTAACGTAT TTGGATGAAA CGCCAGAATA TTTTCGTCAT
481    GTCGAAGCAT ATGAGAGCGG AAATGGGCAT ATGTTTGTTA TGTGCATTTT CAATAAATCA
541    TCATTTGATG AATGTATGTC ACAAATTTAA

```

**trh1 (VN-0049)**

```

1      ATGAAACTAA AACTCTACTT TGCTTTTCAGT TTGCTATTGG CTTCGATATT TTCAGTATCT
61     AAATCATTTCG CGATTGACCT ACCATCCATA CCTTTTCCTT CTCCAGGTTC GGATGAGCTA
121    CTATTTGTTCG TTAGAAATAC AACAATAAAA ACTGAATCAC CAGTTAACGC AATCGTTAAT
181    GACTACTGGA CAAACCGAAA CATAAAACGA AAACCATATA AAAGCGTTCA CGGTCAATCT
241    ATTTTCACGA CTTCAGGCTC AAAATGGTTA AGCGCCTATA TAACGGTAAA TATTAATGGA
301    AATAACTACA CAATGGCTGC TCTTTCTGGC TATAAAGATG GCCTTTCAAC GGTCTTCACA
361    AAATCAGAAA AAACAAGCCT AAATCAGAAC TATTCTTCTG TTAGTGATTT CGTTGGTGAA
421    AATGAAGAAT CATTGCCAAG TGTAACGTAT TTGGATGAAA CGCCAGAATA TTTTCGTCAT
481    GTCGAAGCAT ATGAGAGCGG AAATGGGCAT ATGTTTGTTA TGTGTATTTT CAATAAATCA
541    TCATTTGATG AATGTATGTC ACAAATTTAA

```

**trh2-2 (VN-0293, VN-2897, VN-4016 und VN-5189)**

```

1      ATGAAACTAA GACTCTACTT TGCATTTCAGT TTGCTATTGG TTTCAATATT TTCAATATCT
61     AAATCATTTCG CGATTGATCT GCCATCAATA CCTTTTCCTT CTCCTGGTTC CGATGAACTA
121    TTATTTGTTG TTAGAAATAC AACAATCAAA ACTGAATCCC CAGTTAAGGC AATTGTGGAG
181    GACTATTGGA CAAACCGAAC CATAAAAAGA AAACCAAACA AAGATGTATA CGGTCAATCG
241    GTTTTCACAA CTGCGGGTTC AAAGTGGTTA AGCGCCTATA TGACAGTCAA CATCAATGGT
301    CACAACATA CAATGGCTGC TCTTTCTGGT TATAAACATG GTACTTCTAC GGTCTTCACA
361    AAATCAGAGA AAACAAGCCT AAACCAAGAC TTTTATTCGG TAAAATCTTT TGTTGATGAT
421    AGCGAAGAAT CAATACCAAG TATAAATTAT TTAGATGAAA CACCAGAATA CTTTGTACT
481    GTCGAGGCAT ATGAGAGCGG CAATGGACAT ATGTTTGTTA TGTGCATCTC CAACAAATTA
541    TCATTTGGCG AATGTAAATC ACAAATTTAA

```

**trh2-2** (VN-0295 und VN-0296)

```

1      ATGAAACTAA GACTCTACTT TGCATTCAGT TTGCTATTGG TTTCAATATT TTCAATATCT
61     AAATCATTTCG CGATTGATCT GCCATCAATA CCTTTTCCTT CTCCTGGTTC CGATGAACTA
121    TTATTTGTTG TTAGAAATAC AACAAATCAAA ACTGAATCCC CAGTTAAGGC AATTGTGGAG
181    GACTATTGGA CAAACCGAAC CATAAAAAGA AAACCAAACA AAGATGTATA CGGTCAATCG
241    GTTTTACAAA CTGCGGGTTC AAAGTGGTTA AGCGCCTATA TGACAGTCAA CATCAATGGT
301    CACAACATA CAATGGCTGC TCTTTCTGGT TATAAACATG GTACTTCTAC GGTCTTCACA
361    AAATCAGAGA AAACAAGCCT AAACCAAGAC TTTTATTCGG TAAAATCTTT TGTTGATGAT
421    AGCGAAGAAT CAATACCAAG TATAAATTAT TTAGATGAAA CACCAGAATA CTTTGTTACT
481    GTCGAGGCAT ATGAGAGCGG CAATGGACAT ATGTTTGTTA TGTGCATCTC CAACAAATTA
541    TCATTTGACG AATGTAAATC ACAAATTTAA

```

**trh2-3** (VN-0029, VN-0030, VN-0061, VN-0393, VN-0394, VN-0395, VN-3859, VN-3933 und VN-10300)

```

1      ATGAAACTAA GACTCTACTT TGCATTCAGT TTGCTATTGG TTTCAATATT TTCAATATCT
61     AAATCATTTCG CGATTGATCT GCCATCAATA CCTTTTCCTT CTCCTGGTTC CGATGAACTA
121    TTATTTGTTG TTAGAAATAC AACAAATCAAA ACTGAATCCC CAGTTAAGGC AATTGTGGAG
181    GACTATTGGA CAAACCGAAA CATAAAAAGA AAACCATACA AAGATGTATA CGGTCAATCG
241    GTTTTACAAA CAGCAGGTTC AAAGTGGTTA AGCGCCTATA TGACAGTAAA CATCAATGGT
301    CATAACTATA CGATGGCAGC TCTTTCTGGT TATAAAGATG GTATTTCTAC GGTCTTCACA
361    AAATCAGAGA AAACAAGCCT AAACCAAGAC TTTTATTCGG TAAAATCTTT TGTTGATGAT
421    AGCGAAGAAT CAATACCAAG TATAAATTAT TTAGATGAAA CACCAGAATA CTTTGTTACT
481    GTCGAGGCAT ATGAGAGCGG CAATGGACAT ATGTTTGTTA TGTGCATCTC CAACAAATTA
541    TCATTTGGCG AATGTAAATC ACAAATTTAA

```

**trh2-6** (VN-0053 und VN-0084)

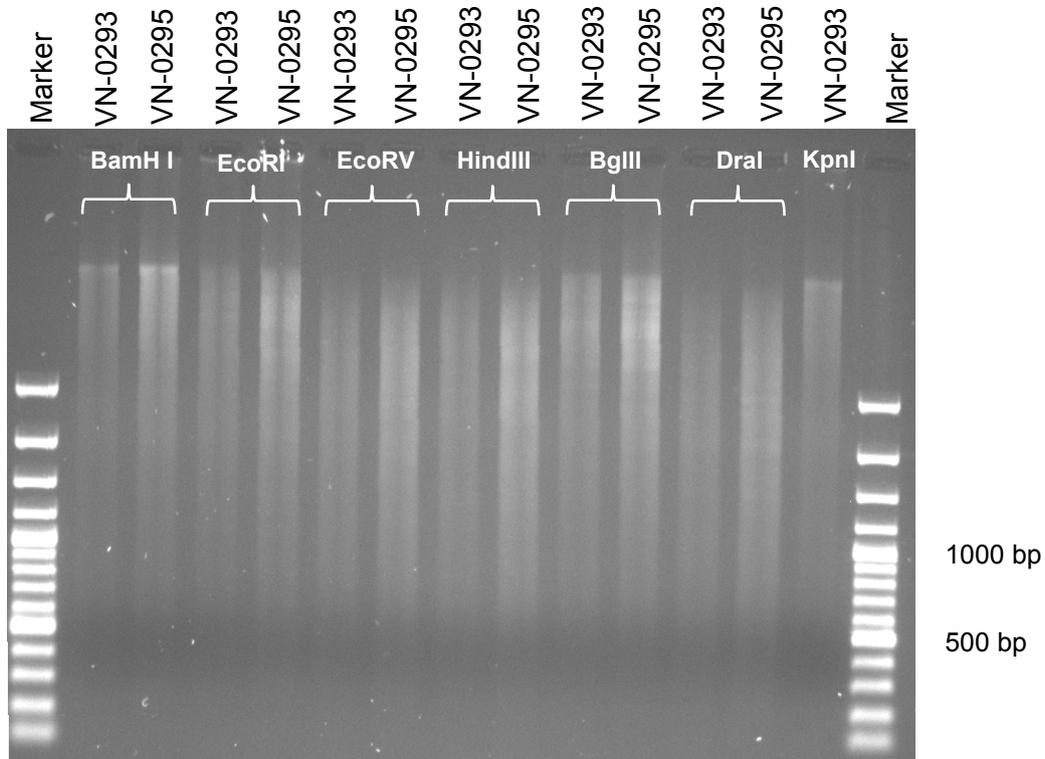
```

1      ATGAAACTAA GACTCTACTT TGCATTCAGT TTGCTATTGG TTTCAATATT TTCAATATCT
61     AAATCATTTCG CGATTGATCT GCCATCAATA CCTTTTCCTT CTCCTGGTTC CGATGAGCTA
121    TTATTTGTTG TTAGAAATAC AACAAATCAAA ACTGAATCCC CAGTTAAGGC AATTGTGGAG
181    GACTATTGGA CAAACCGAAC CATAAAAAGA AAACCATACA AAGATGTATA CGGTCAATCG
241    GTTTTACAAA CTGCGGGTTC AAAGTGGTTA AGCGCCTATA TGACAGTCAA CATCAATGGT
301    CACAACATA CGATGGCTGC TCTTTCTGGT TATAAACATG GTACTTCTAC GGTCTTCACA
361    AAATCAGAGA AAACAAGCCT AAACCAAGAC TTTTATTCGG TAAAATCTTT TGTTGATGAT
421    AGCGAAGAAT CAATACCAAG TATAAATTAT TTAGATGAAA CACCAGAATA CTTTGTTACT
481    GTCGAGGCAT ATGAGAGCGG CAATGGACAT ATGTTTGTTA TGTGCATCTC CAACAAATTA
541    TCATTTGGCG AATGTAAATC ACAAATTTAA

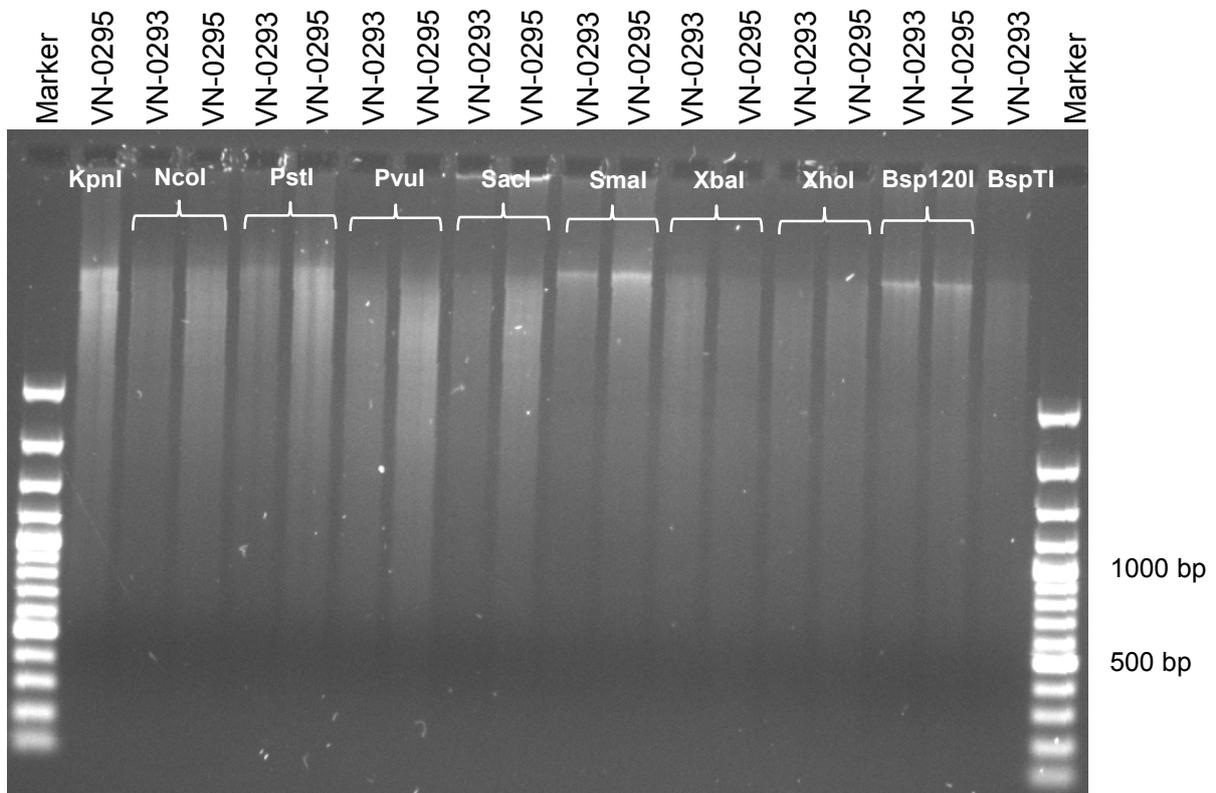
```

**B Abbildungen**

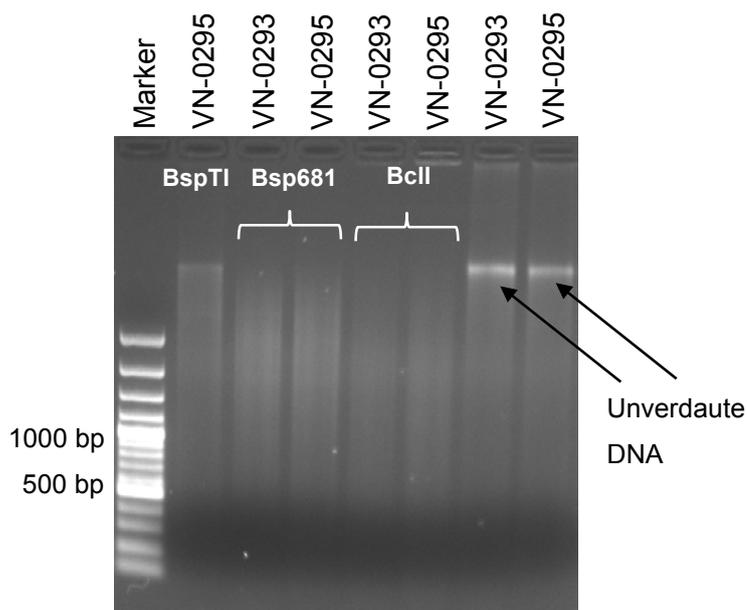
[A]



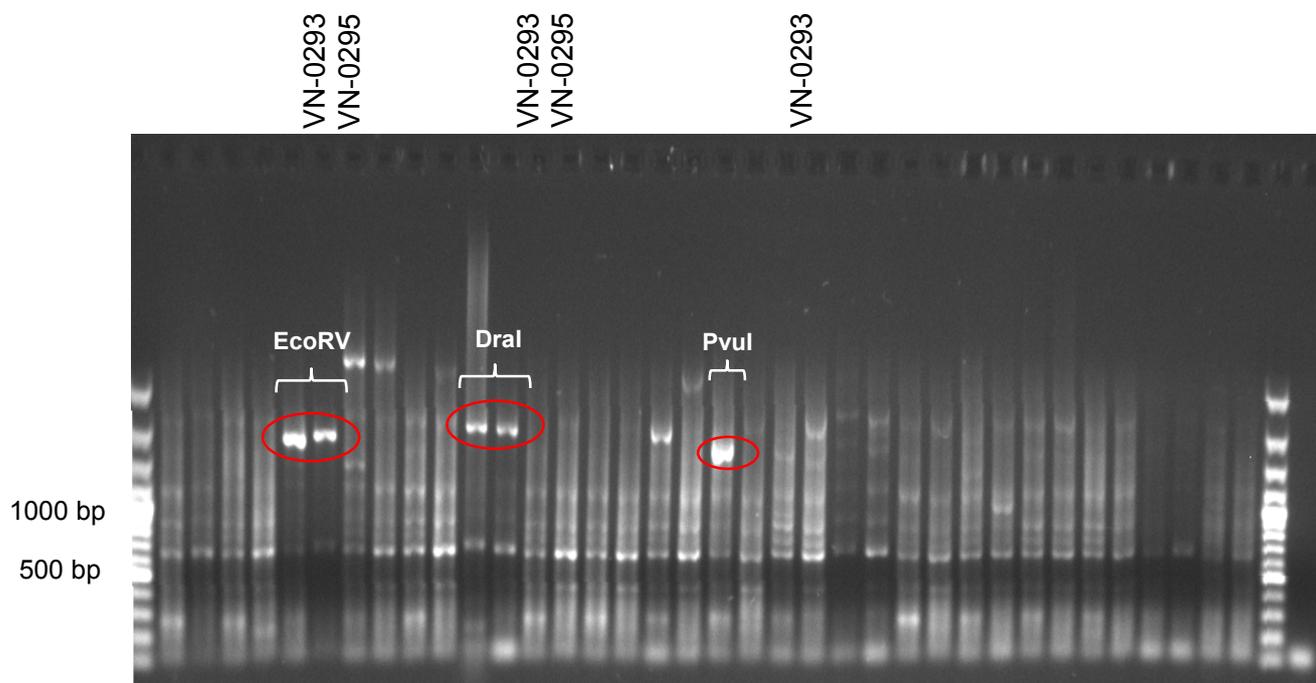
[B]



[C]



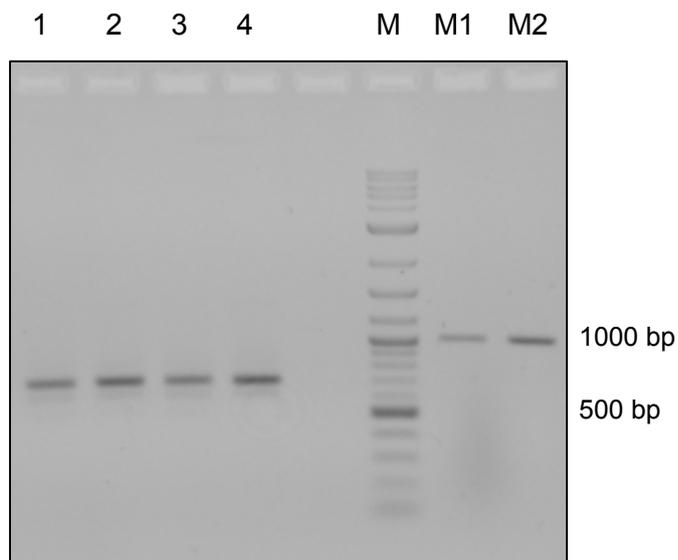
**Abbildung B 1.1 (A,B und C): Restriktionsverdau genomischer DNA.** Mithilfe verschiedener Restriktionsenzyme verdaute genomische DNA der *V. parahaemolyticus* Stämme VN-0293 und VN-0295. 25  $\mu$ l-Aliquots der Verdau-Ansätze wurden auf ein 0,8 %iges Agarose-Gel aufgetragen und die DNA-Fragmente ihrer Länge nach aufgetrennt.



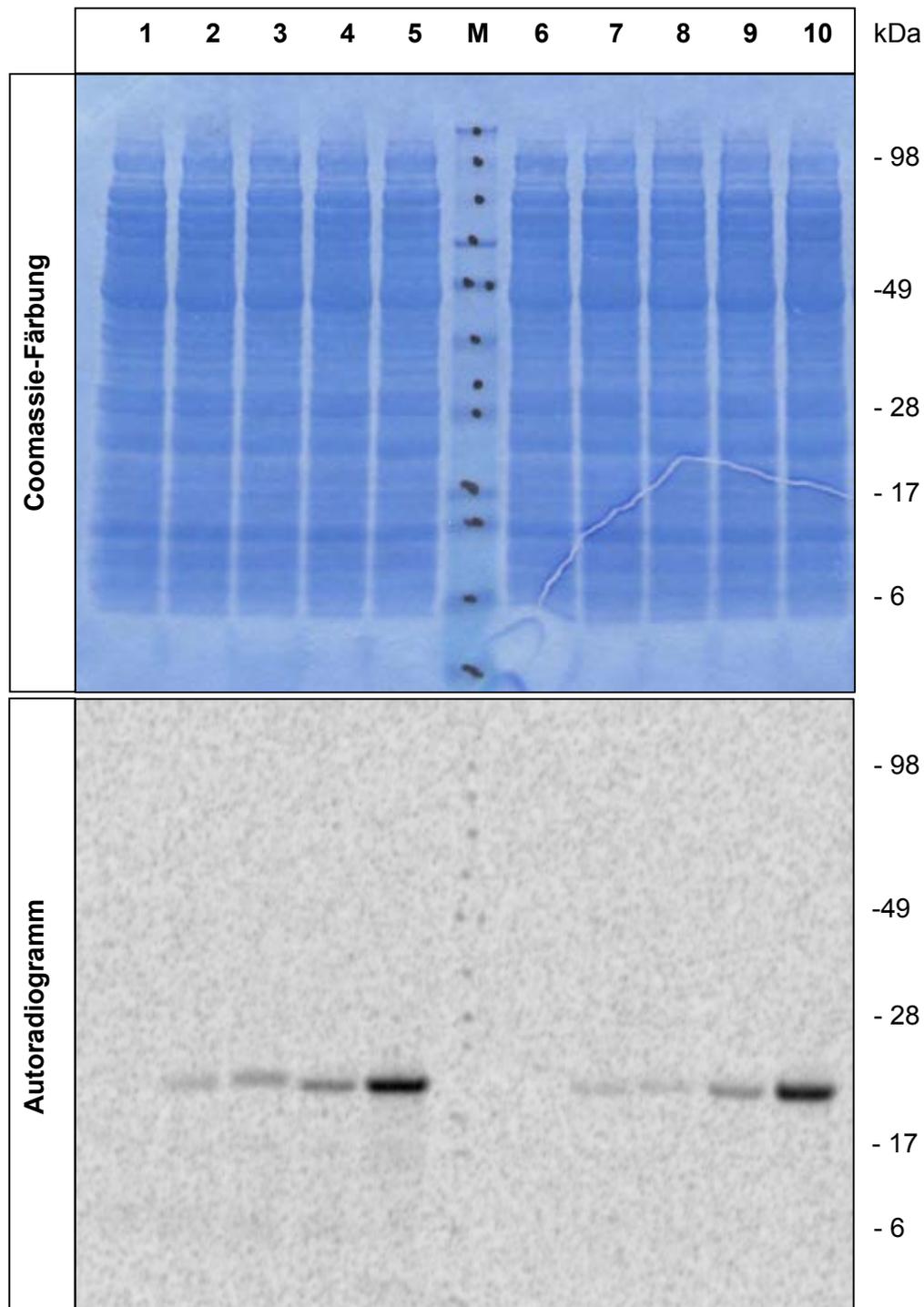
**Abbildung B 1.2: Aufgetragene PCR-Produkte der inversen PCR.** Die in Abbildung B 1.1 gezeigten aufgetrennten DNA-Fragmente wurden mithilfe einer Religations-Reaktion in eine Ringform gebracht, indem die Fragmentenden miteinander ligiert wurden. Anschließend erfolgte eine inverse PCR mit *trh*-spezifischen Primern (Trh\_fw\_revgen1 und Trh\_rev\_revgen1) und eine Auftrennung der PCR-Produkte in einem 0,8 %igen Agarose-Gel. Über die Sequenzierung der rot markierten PCR-Produkte konnte die DNA-Sequenz der benachbarten *trh*-Genregion für die Konstruktion des Primers IS-ele-Rev1 ermittelt werden.

<i>tdh1</i>	1	ATGAA <b>ACACCA</b> ATATTTTGCAAAAAAATCATTTTTATTTATATCCATGTTGGCTGCATTC	60
		M K <b>H Q</b> Y F A K K S F L F I S M L A A F	
		M K Y R Y F A K K S F L F I S M L A A F	
<i>tdh2</i>	1	<u>ATGAAGTACCGATATTTTGC</u> AAAAAATCATTTTTATTTATATCCATGTTGGCTGCATTC	60
		Forward Primer für die Amplifikation der gesamten CDS	
<i>tdh1</i>	61	AAACATCTGCT <b>TTTGAGCTTCCATCTGTCCC</b> TTTCCTGCCCCCGGTTCTGATGAGATA	120
		K T <b>S A</b> F E L P S V P F P A P G S D E I	
		K T F A F E L P S V P F P A P G S D E I	
<i>tdh2</i>	61	AAACATTTGCC <b>TTTGAGCTTCCATCTGTCCC</b> TTTCCTGCCCCCGGTTCTGATGAGATA	120
		Forward Primer für die Amplifikation der CDS ohne Signalsequenz	
<i>tdh1</i>	121	TTGTTTGTGTTTCGAGATACAACCTTTAATACCC <b>CAAGCTCC</b> GGTCAATGTA <b>AAAGGTCTCT</b>	180
		L F V V R D T T F N T <b>Q</b> A P V N V <b>K</b> V S	
		L F V V R D T T F N T N A P V N V E V S	
<i>tdh2</i>	121	TTGTTTGTGTTTCGAGATACAACCTTTAATACCAATGCACCGGTCAATGTAGAGGTCTCT	180
<i>tdh1</i>	181	GACTTTTGGACAAACCGTAATGTA <sup>3</sup> AAAAAGAAAACCGTAC <b>GAAGATGTTTATGGTCAATCA</b>	240
		D F W T N R N V K R K P Y <b>E</b> D V Y G Q S	
		D F W T N R N V K R K P Y K D V Y G Q S	
<i>tdh2</i>	181	GACTTTTGGACAAACCGTAATGTA <sup>3</sup> AAAAAGAAAACCGTACAAAGATGTTTATGGTCAATCA	240
<i>tdh1</i>	241	GTATTCACAACGTCAGGTACTAAATGG <b>TTGACATCCTACATGACTGTGAACATTAATGAT</b>	300
		V F T T S G T K W L T S Y M T V N I N D	
		V F T T S G T K W L T S Y M T V N I N D	
<i>tdh2</i>	241	GTATTCACAACGTCAGGTACTAAATGGCTGACATCCTACATGACTGTGAACATTAATGAT	300
<i>tdh1</i>	301	AAAGACTATACAATGGCAGCGGTGTCTGGCTATAAG <b>AGCGGTCATTCTGCTGTGTTTCGTA</b>	360
		K D Y T M A A V S G Y K <b>S</b> G H S A V F V	
		K D Y T M A A V S G Y K H G H S A V F V	
<i>tdh2</i>	301	AAAGACTATACAATGGCAGCGGTGTCTGGCTATAAGCAGGTCATTCTGCTGTGTTTCGTA	360
<i>tdh1</i>	361	AAATCAG <b>GTCAAGTACA</b> ACTTCAACATTCCTAT <b>A</b> ATTCTGTAGCTAACTTTGTTGGTGAA	420
		K S <b>G</b> Q V Q L Q H S Y <b>N</b> S V A N F V G E	
		K S D Q V Q L Q H S Y D S V A N F V G E	
<i>tdh2</i>	361	AAATCAGATCAAGTACAGCTTCAACATTCCTATGATTCTGTAGCTAACTTTGTTGGTGAA	420
<i>tdh1</i>	421	GATGAAG <b>GTTC</b> TATTC <b>CAAGTAA</b> ATGTATTTGGATGAAACTCCAGAATATTTTGGTTAAT	480
		D E <b>G</b> S I P S K M Y L D E T P E Y F V N	
		D E D S I P S K M Y L D E T P E Y F V N	
<i>tdh2</i>	421	GATGAAGATTCTATTC <b>CAAGTAA</b> ATGTATTTGGATGAAACTCCAGAATATTTTGGTTAAT	480
<i>tdh1</i>	481	GTAGAAGCATATGAGAGTGGTAGTGGTAATATATTGGTAATGTGTATATCCAACAAAGAA	540
		V E A Y E S G S G N I L V M C I S N K E	
		V E A Y E S G S G N I L V M C I S N K E	
<i>tdh2</i>	481	GTAGAAGCATATGAGAGTGGTAGTGGTAATATATTGGTAATGTGTATATCCAACAAAGAA	540
<i>tdh1</i>	541	TCGTTTT <b>TTGAATGTAACATCAACAA</b> TAA	570
		S F F E C K H Q Q *	
		S F F E C K H Q Q *	
<i>tdh2</i>	541	TCGTTTT <b>TTGAATGTAACATCAACAA</b> TAA	570
		Reverse Primer	

**Abbildung B 2: Nukleotidsequenz und Aminosäuresequenz des *tdh1*-Gens und des *tdh2*-Gens.** Das Signalpeptid der Hämolytase ist grau unterlegt. Die Sequenzunterschiede sind blau markiert. Die Primersequenzen sind unterstrichen und in fett gedruckt.



**Abbildung B 3.1: E-PCR2-Produkte, welche für die zellfreie Expression der TRH-Varianten eingesetzt wurden.** Ein Aliquot (1  $\mu$ l) der E-PCR2-Produkte wurde in einem 1 %igem Agarosegel analysiert. 1: mTRH2 (VN-0029), 2: mTRH1 (VN-0038), 3: mTRH2 (VN-0293), 4: mTDH2 (Kontrolle), M: Marker, M1: Massenstandard (50 ng) und M2: Massenstandard (100 ng)



**Abbildung B 3.2: Synthese der <sup>14</sup>C markierten Proteine (TRH-Varianten und TDH2).** 5  $\mu$ l Aliquots der radioaktiv markierten zellfreien Translationsreaktionen (Suspension (1-5) und Überstand (6-10)) wurden in einem 10 % Bis-Tris NuPAGE Novex Gel (oben) analysiert; <sup>14</sup>C-markierte Proteine wurden nach der Elektrophorese über ein Phosphorimager -System (Typhoon TRIO+ Imager, GE Healthcare) sichtbar gemacht (unten).  
 1: NTC (Suspension), 2: mTRH2 (VN-0029, Suspension), 3: mTRH1 (VN-0038, Suspension), 4: mTRH2 (VN-0293, Suspension), 5: mTDH2 (Kontrolle, Suspension), M: Marker, 6: NTC (Überstand), 7: mTRH2 (VN-0029, Überstand), 8: mTRH1 (VN-0038, Überstand), 9: mTRH2 (VN-0293, Überstand) und 10: mTDH2 (Kontrolle, Überstand).



**Abbildung B 4: Protein-Alignment der mTRH-Varianten und mTDH2 (165 aa Länge).**

Fast alle bei TDH konservierten Aminosäuren (blau markiert), welche an Kation- $\pi$ -Wechselwirkungen und der Aufrechterhaltung der Tetramer-Struktur beteiligt sind (R46, E138 und Y140), sind auch in allen TRH-Varianten konserviert. Zwei möglicherweise relevante Aminosäurenaustausche (rot markiert) wurden identifiziert: an der Position 165 besitzen mTDH2 und mTRH1 (inkl. VN-0038) jeweils eine hydrophile Aminosäure (Glutamin (Q) bzw. Asparagin (N)), während mTRH1 (VN-0028) und beide TRH2-Varianten ein Isoleucin (I) aufweisen, welches zu den hydrophoben Aminosäure gehört. An der Position 156 tragen mTDH2 und mTRH1 (inkl. VN-0038) eine hydrophile (Glutaminsäure, E) bzw. eine neutrale Aminosäure (Serin, S), während mTRH1 (VN-0028) und beide TRH2-Varianten erneut eine stark hydrophobe Aminosäure aufweisen (Leucin, L). Mithilfe des SWISS Model Servers (<http://swissmodel.expasy.org/interactive>) wurde die Quartärstruktur der TRH-Varianten auf Basis der Kristallstruktur des TDH2-Proteins simuliert. Sowohl TDH als auch TRH bilden ein Tetramer in wässriger Lösung (Yanagihara *et al.* 2010, Ohnishi *et al.* 2011). Die Positionen 165 und 156 der Aminosäurenaustausche befinden innerhalb der Pore der postulierten TRH-Tetramerstruktur.

## C Tabellen

**Tabelle C 1:** Pro Stamm verwendete Primerkombination zur Amplifikation und nachfolgender Sequenzierung des gesamten *trh*-Gens.

Stamm	Forward Primer	Reverse Primer
VN-0024	VPtrhx1_F	VPtrhx1_R
VN-0028	VPtrhx1_F	VPtrhx1_R
VN-0029	VPtrhx1_F	VPtrhx1_R
VN-0030	VPtrhx1_F	VPtrhx1_R
VN-0038	VPtrhx1_F	VPtrhx1_R
VN-0045	VPtrhx1_F	VPtrhx1_R
VN-0046	VPtrhx1_F	VPtrhx1_R
VN-0049	VPtrhx1_F	VPtrhx1_R
VN-0050	VPtrhx4_F	VPtrhx4_R
VN-0053	VPtrhx1_F	VPtrhx1_R
VN-0055	VPtrhx1_F	VPtrhx1_R
VN-0057	VPtrhx1_F	VPtrhx1_R
VN-0058	VPtrhx1_F	VPtrhx1_R
VN-0061	VPtrhx1_F	VPtrhx1_R
VN-0070	VPtrhx1_F	VPtrhx1_R
VN-0077	VPtrhx1_F	VPtrhx1_R
VN-0084	VPtrhx4_F	VPtrhx4_R
VN-0293	VPtrhx1_F	IS-ele-Rev1
VN-0295	VPtrhx4_F	IS-ele-Rev1
VN-0296	VPtrhx4_F	IS-ele-Rev1
VN-0393	VPtrhx1_F	VPtrhx4_R
VN-0394	VPtrhx1_F	VPtrhx1_R
VN-0395	VPtrhx1_F	VPtrhx1_R
VN-0396	VPtrhx1_F	VPtrhx1_R
VN-2897	VPtrhx4_F	IS-ele-Rev1
VN-3859	VPtrhx4_F	IS-ele-Rev1
VN-3933	VPtrhx4_F	IS-ele-Rev1
VN-4016	VPtrhx4_F	IS-ele-Rev1
VN-5189	VPtrhx1_F	IS-ele-Rev1

**Tabelle C 2: Sequenztypen (ST) mit ihren Allelprofilen, welche in der MLST-Analyse ermittelt wurden.**

Stamm	ST	<i>dnaE</i>	<i>gyrB</i>	<i>recA</i>	<i>dtdS</i>	<i>pntA</i>	<i>pyrC</i>	<i>tnaA</i>
VN-0396	<b>1</b>	5	52	27	13	17	25	10
RIMD2210633	<b>3</b>	3	4	19	4	29	4	22
VN-0394*	<b>6</b>	4	13	11	38	18	9	23
VN-0057	<b>26</b>	17	19	13	36	31	32	26
VN-0058								
VN-0046	<b>34</b>	20	25	15	13	7	11	5
VN-0055	<b>35</b>	20	7	15	13	7	11	5
VN-0045	<b>36</b>	21	15	1	23	23	21	16
VN-0024	<b>50</b>	29	5	22	12	20	22	25
VN-0038	<b>64</b>	40	39	3	18	4	36	29
VN-0061								
VN-0029*	<b>73</b>	3	44	42	44	38	44	24
VN-0030*								
VN-0393*								
VN-0395*								
VN-3933*								
VN-3859								
VN-0293*	<b>79</b>	35	43	38	21	31	35	37
VN-2897*								
VN-5189*								
VN-0050	<b>83</b>	5	52	27	13	17	25	40
VN-0049	<b>91</b>	35	4	16	50	29	5	42
VN-10300	<b>761</b>	47	52	19	287	24	43	37
VN-0028	<b>966</b>	12	312	25	342	26	37	132
VN-0053	<b>967</b>	93	375	71	29	4	45	17
VN-0084	<b>985</b>	28	106	82	251	18	38	2
VN-4016	<b>987</b>	196	380	19	29	193	176	61

\* Stämme wurden aus deutschen Gewässern isoliert

**Tabelle C 3.1: Wertetabelle der Transkriptionsanalyse (20 °C).** Die *V. parahaemolyticus* Stämme wurden in LB-Medium bei 20 °C für zwei Stunden kultiviert. Aus drei unabhängigen Experimenten wurden die C<sub>T</sub>-Werte zu einem Mittelwert zusammengeführt.

RQ = relative Quantifizierung der Transkription

Stamm	Gentarget	RQ ( $2^{-\Delta\Delta C_T}$ )	RQ Min	RQ Max
VN-0293	trh2	1,000	0,866	1,155
	vopC	1,000	0,866	1,155
VN-2897	trh2	1,000	0,911	1,098
	vopC	1,000	0,913	1,096
VN-4016	trh2	1,000	0,772	1,296
	vopC	1,000	0,745	1,342
VN-5189	trh2	1,000	0,909	1,100
	vopC	1,000	0,928	1,078
VN-0029	trh2	1,000	0,777	1,287
	vopC	1,000	0,761	1,314
VN-0030	trh2	1,000	0,902	1,109
	vopC	1,000	0,805	1,243
VN-0393	trh2	1,000	0,753	1,329
	vopC	1,000	0,858	1,166
VN-3933	trh2	1,000	0,729	1,371
	vopC	1,000	0,730	1,370
VN-0028	trh1	1,000	0,880	1,136
	vopC	1,000	0,885	1,130
VN-0049	trh1	1,000	0,918	1,090
	vopC	1,000	0,838	1,193
VN-0038	trh1	1,000	0,861	1,162
	tdh	1,000	0,553	1,809
	vopC	1,000	0,812	1,232
	trh1	-	-	-
VN-0050	tdh	1,000	0,933	1,072
	vopC	1,000	0,912	1,096
VN-0055	ψtrh	1,000	0,849	1,178
	tdh	1,000	0,866	1,155
VN-0070	ψtrh	-	-	-

**Tabelle C 3.2: Wertetabelle der Transkriptionsanalyse (37 °C).** Die *V. parahaemolyticus* Stämme wurden in LB-Medium bei 37 °C für zwei Stunden kultiviert. Aus drei unabhängigen Experimenten wurden die C<sub>T</sub>-Werte zu einem Mittelwert zusammengeführt.

RQ = relative Quantifizierung der Transkription

Stamm	Gentarget	RQ ( $2^{-\Delta\Delta C_T}$ )	RQ Min	RQ Max
VN-0293	trh2	1,357	0,982	1,874
	vopC	2,909	2,129	3,973
VN-2897	trh2	0,956	0,758	1,204
	vopC	2,058	1,575	2,689
VN-4016	trh2	4,561	2,977	6,986
	vopC	8,164	5,852	11,389
VN-5189	trh2	1,467	1,065	2,019
	vopC	2,896	2,091	4,012
VN-0029	trh2	0,764	0,687	0,850
	vopC	0,829	0,747	0,921
VN-0030	trh2	1,089	0,820	1,445
	vopC	1,146	0,944	1,391
VN-0393	trh2	6,029	4,055	8,963
	vopC	2,129	1,491	3,040
VN-3933	trh2	4,963	4,752	5,183
	vopC	4,668	3,896	5,592
VN-0028	trh1	1,390	0,903	2,140
	vopC	1,556	1,025	2,362
VN-0049	trh1	0,576	0,441	0,753
	vopC	0,618	0,477	0,799
VN-0038	trh1	3,966	3,429	4,588
	tdh	1,324	1,163	1,508
	vopC	1,715	1,472	1,999
	trh1	-	-	-
VN-0050	tdh	1,652	1,427	1,914
	vopC	4,458	4,119	4,826
VN-0055	ψtrh	3,742	2,944	4,756
	tdh	4,726	3,740	5,973
VN-0070	ψtrh	-	-	-

**Tabelle C 3.3: Wertetabelle der Transkriptionsanalyse (37 °C und Gallenextrakt).** Die *V. parahaemolyticus* Stämme wurden in LB-Medium mit 0,04 % Gallenextrakt bei 37 °C für zwei Stunden kultiviert. Aus drei unabhängigen Experimenten wurden die C<sub>T</sub>-Werte zu einem Mittelwert zusammengeführt.

RQ = relative Quantifizierung der Transkription

Stamm	Gentarget	RQ ( $2^{-\Delta\Delta C_T}$ )	RQ Min	RQ Max
VN-0293	trh2	1,282	0,996	1,649
	vopC	3,925	3,252	4,737
VN-2897	trh2	0,966	0,887	1,052
	vopC	2,080	1,695	2,553
VN-4016	trh2	2,527	1,642	3,889
	vopC	6,334	4,962	8,086
VN-5189	trh2	1,246	0,995	1,561
	vopC	3,859	2,779	5,360
VN-0029	trh2	0,802	0,616	1,045
	vopC	0,950	0,779	1,159
VN-0030	trh2	1,236	1,021	1,496
	vopC	1,486	1,250	1,766
VN-0393	trh2	2,202	1,723	2,814
	vopC	1,506	1,322	1,715
VN-3933	trh2	2,640	2,265	3,076
	vopC	2,995	2,501	3,587
VN-0028	trh1	1,807	1,579	2,067
	vopC	1,690	1,476	1,935
VN-0049	trh1	6,971	5,235	9,284
	vopC	0,938	0,721	1,221
VN-0038	trh1	30,425	26,090	35,480
	tdh	1,727	1,583	1,885
	vopC	7,419	6,893	7,984
	trh1	-	-	-
VN-0050	tdh	93,309	84,252	103,339
	vopC	99,448	93,875	105,353
VN-0055	ψtrh	3,228	2,728	3,819
	tdh	2,157	1,804	2,579
VN-0070	ψtrh	-	-	-

**Tabelle C 3.4: Wertetabelle der Transkriptionsanalyse (37 °C und Harnstoff).** Die *V. parahaemolyticus* Stämme wurden in LB-Medium mit 0,1 % Harnstoff bei 37 °C für zwei Stunden kultiviert. Aus drei unabhängigen Experimenten wurden die C<sub>T</sub>-Werte zu einem Mittelwert zusammengeführt.

RQ = relative Quantifizierung der Transkription

Stamm	Gentarget	RQ ( $2^{-\Delta\Delta C_T}$ )	RQ Min	RQ Max
VN-0293	trh2	0,968	0,723	1,296
	vopC	3,218	2,333	4,438
VN-2897	trh2	0,894	0,802	0,998
	vopC	2,080	1,695	2,553
VN-4016	trh2	2,198	1,640	2,947
	vopC	5,845	4,281	7,981
VN-5189	trh2	1,210	1,080	1,356
	vopC	3,330	2,527	4,389
VN-0029	trh2	0,736	0,540	1,004
	vopC	5,755	4,608	7,189
VN-0030	trh2	0,774	0,708	0,845
	vopC	3,263	2,939	3,623
VN-0393	trh2	2,068	1,523	2,808
	vopC	11,596	8,540	15,746
VN-3933	trh2	2,441	1,957	3,046
	vopC	13,161	11,403	15,190
VN-0028	trh1	1,214	1,041	1,417
	vopC	1,683	1,431	1,978
VN-0049	trh1	0,562	0,478	0,663
	vopC	0,481	0,423	0,547
VN-0038	trh1	3,738	2,999	4,659
	tdh	1,614	1,527	1,706
	vopC	2,536	1,937	3,320
	trh1	1,000	0,000	0,000
VN-0050	tdh	1,578	1,417	1,758
	vopC	5,681	5,207	6,197
VN-0055	ψtrh	4,025	3,392	4,775
VN-0070	tdh	2,380	2,277	2,488
	ψtrh	1,000	0,000	0,000

**Tabelle C 4.1: Wertetabelle des Hämolyse-Tests mit Bakterienkulturen und Kulturüberständen gegenüber humanen Erythrozyten.** Die Bakterien wurden in LB-Medium mit und ohne 0,04 % Gallenextrakt kultiviert. Bakterienkulturen [A] und steril-filtrierte Kulturüberstände [B] wurden mit einer humanen Erythrozytensuspension für vier Stunden inkubiert. Das bei der Zellyse der Erythrozyten freigesetzte Hämoglobin wurde photometrisch bei einer Absorption von 540 nm bestimmt. Aus zwei unabhängigen Experimenten wurden die Hämolyse-Werte zu einem Mittelwert zusammengeführt. STABWN = Standardabweichung

[A]

Stamm	Hämolytische Aktivität (Bakterienkultur)			
	Nur Medium	Medium mit Galle	STABWN (nur Medium)	STABWN (Medium mit Galle)
VN-0022	1,58%	0,08%	0,34%	0,08%
VN-0028	2,31%	2,46%	0,62%	1,00%
VN-0029	5,99%	5,95%	0,75%	0,57%
VN-0030	2,51%	3,02%	0,32%	1,62%
VN-0070	2,06%	0,45%	0,74%	0,45%
VN-0393	2,16%	0,52%	0,15%	0,21%
VN-0038	34,38%	70,17%	9,04%	4,91%
VN-0049	2,40%	23,45%	0,08%	6,14%
VN-0293	2,29%	3,14%	0,23%	0,35%
VN-5189	2,52%	4,65%	0,09%	1,61%
VN-2897	2,87%	8,07%	0,08%	1,42%
VN-3933	2,15%	2,54%	0,18%	0,73%
VN-4016	1,64%	2,36%	0,00%	0,06%
VN-0055	21,38%	23,41%	3,44%	2,12%
VN-0050	7,42%	81,92%	2,41%	2,71%
ATCC43996	20,27%	81,21%	3,76%	3,92%

[B]

Stamm	Hämolytische Aktivität (Kulturüberstände)			
	Nur Medium	Medium mit Galle	STABWN (nur Medium)	STABWN (Medium mit Galle)
VN-0022	1,15%	0,01%	0,16%	0,01%
VN-0028	0,94%	0,01%	0,33%	0,01%
VN-0029	1,37%	0,03%	0,42%	0,03%
VN-0030	1,10%	0,09%	0,12%	0,09%
VN-0070	0,34%	0,01%	0,26%	0,01%
VN-0393	1,79%	0,27%	0,89%	0,27%
VN-0038	1,64%	21,15%	0,16%	1,07%
VN-0049	1,36%	0,46%	0,21%	0,46%
VN-0293	0,70%	0,00%	0,05%	0,00%
VN-5189	0,67%	0,00%	0,06%	0,00%
VN-2897	0,60%	0,00%	0,29%	0,00%
VN-3933	0,71%	0,00%	0,45%	0,00%
VN-4016	1,57%	0,07%	0,60%	0,07%
VN-0055	1,56%	0,64%	0,36%	0,64%
VN-0050	1,26%	47,29%	0,14%	17,05%
ATCC43996	1,89%	80,96%	0,32%	1,03%

**Tabelle C 4.2: Wertetabelle des Hämolyse-Tests mit Bakterienkulturen und Kulturüberständen gegenüber Schaferythrozyten.** Die Bakterien wurden in LB-Medium mit und ohne 0,04 % Gallenextrakt kultiviert. Bakterienkulturen [A] und steril-filtrierte Kulturüberstände [B] wurden mit einer Suspension aus Schaferythrozyten für vier Stunden inkubiert. Das bei der Zellyse der Erythrozyten freigesetzte Hämoglobin wurde photometrisch bei einer Absorption von 540 nm bestimmt. Aus zwei unabhängigen Experimenten wurden die Hämolyse-Werte zu einem Mittelwert zusammengeführt. STABWN = Standardabweichung

[A]

Stamm	Hämolytische Aktivität (Bakterienkulturen)			
	Nur Medium	Medium mit Galle	STABWN (nur Medium)	STABWN (Medium mit Galle)
VN-0022	2,09%	0,95%	1,56%	0,97%
VN-0028	3,59%	6,04%	2,08%	0,65%
VN-0029	6,54%	8,96%	2,19%	0,59%
VN-0030	3,99%	9,34%	0,50%	0,40%
VN-0070	3,56%	4,26%	0,32%	1,77%
VN-0393	7,29%	6,83%	1,16%	0,73%
VN-0038	26,40%	50,93%	4,61%	5,30%
VN-0049	15,11%	72,64%	5,13%	13,38%
VN-0293	3,74%	0,81%	2,62%	0,81%
VN-5189	7,42%	1,49%	1,01%	1,37%
VN-2897	5,29%	1,85%	1,83%	1,85%
VN-3933	5,52%	7,52%	0,44%	1,77%
VN-4016	4,16%	1,99%	0,19%	1,82%
VN-0055	7,01%	10,51%	0,76%	2,02%
VN-0050	10,41%	80,11%	0,25%	3,77%
ATCC43996	9,25%	31,18%	1,55%	0,40%

[B]

Stamm	Hämolytische Aktivität (Kulturüberstände)			
	Nur Medium	Medium mit Galle	STABWN (nur Medium)	STABWN (Medium mit Galle)
VN-0022	2,58%	0,40%	0,89%	0,60%
VN-0028	2,77%	8,67%	0,27%	1,24%
VN-0029	2,38%	4,32%	1,02%	0,41%
VN-0030	1,15%	4,87%	0,41%	0,85%
VN-0070	1,92%	0,59%	0,87%	0,37%
VN-0393	1,83%	3,97%	0,83%	1,49%
VN-0038	1,75%	17,48%	0,75%	1,01%
VN-0049	3,16%	13,64%	1,18%	6,17%
VN-0293	2,61%	0,00%	0,78%	0,00%
VN-5189	2,40%	0,00%	1,22%	0,00%
VN-2897	2,59%	0,00%	0,96%	0,00%
VN-3933	3,40%	4,91%	1,04%	0,56%
VN-4016	1,89%	0,00%	0,56%	0,00%
VN-0055	2,03%	0,00%	1,20%	0,00%
VN-0050	1,18%	74,16%	0,55%	6,71%
ATCC43996	2,32%	7,29%	1,24%	2,38%