

Lehrstuhl für Mikrobiologie
der Technischen Universität München

**Entwicklung von *in situ* Nachweisverfahren für die
humanpathogenen Lebensmittelkontaminanten *Listeria*, *Salmonella*
und *Campylobacter*, sowie phylogenetische Analysen der Gattung
Listeria und Feindifferenzierung von *L. monocytogenes***

Michael Wilhelm Schmid

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie
der Technischen Universität München
zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender:

Univ. Prof. Dr. W. Höll

Prüfer der Dissertation:

1. Univ. Prof. Dr. K.-H. Schleifer
2. apl. Prof. Dr. A. Hartmann
Ludwig-Maximilians-Univ., München

Die Dissertation wurde am 04.09.2000 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 16.10.2000 angenommen.

**für meine Eltern
und meine Freunde**

Publikationsliste

- Wagner, M., Schmid, M., Juretschko, S., Trebesius, K.-H., Bubert, A., Goebel, W., and K.-H. Schleifer (1998).** *In situ* detection of a virulence factor mRNA and 16S-rRNA in *Listeria monocytogenes*. *FEMS Microbiol. Lett.* **160**:159-168.
- Ng, E., Schmid, M., Wagner, M., and W. Goebel.** Pathogenic capability has been lost at least twice during the evolution of the genus *Listeria*. Eingereicht bei *J. Bacteriol.*
- Adamczyk, J., Schmid, M., Geisenberger, O., Ludwig, W., Schleifer, K.-H., Eberl, L. and M. Wagner.** Comparison of two methods for the detection of *Salmonella enterica* in complex environments. In Vorbereitung.
- Hentschel, U., Schmid, M., Fieseler, L., Gernert, C., and J. Hacker.** Isolation and taxonomic identification of *bacteria* with antimicrobial activities from the mediterranean sponge *Aplysina aerophoba*. In Vorbereitung.
- Schmid, M., Walcher, M., Bubert, A., Goebel, W., Schleifer, K.-H., and M. Wagner.** Phylogenetic analysis of *iap* gene sequences separates three evolutionary lineage's of *L. monocytogenes* with different pathogenic potential. In Vorbereitung.

A: EINLEITUNG	1
B: MATERIAL UND METHODEN	9
B.1.: MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	9
B.1.1.: Lösungen, Standardpuffer und Lösungsmittel	9
B.1.2.: Verwendete Mikroorganismen und Plasmide	11
B.1.3.: Nährmedien, Anzucht, Isolierung, Stammhaltung, Antibiotika und Zellernte	13
B.1.3.1.: Nährmedien zur Anzucht der verwendeten Referenzstämme	13
B.1.3.2.: Anzucht der Organismen	18
B.1.3.3.: Isolierung von Listerien aus Umweltproben	19
B.1.3.4.: Isolierung von Salmonellen aus Umweltproben	19
B.1.3.5.: Stammhaltung und Zellernte	20
B.1.3.6.: Antibiotika	21
B.1.3.8.: Bestimmung der optischen Dichte von Bakterienkulturen	22
B.1.4.: Zellfixierungen	22
B.1.4.1.: Zellfixierung mit Paraformaldehydlösung	22
B.1.4.2.: Zellfixierung mit Ethanol	22
B.1.5.: Isolierung von Nukleinsäuren	23
B.1.5.1.: Isolierung von chromosomaler DNS aus <i>Listeria</i> Zellen	23
B.1.5.2.: Isolierung chromosomaler DNS mit dem QIAgen „DNeasy Tissue Kit“	23
B.1.5.3.: Isolierung von Plasmid DNS mit dem „QIAprep“ Plasmid Isolierungs Kit	24
B.1.6.: Quantitative und qualitative Untersuchung der Nukleinsäurelösungen	24
B.1.6.1.: Photometrische Konzentrationsbestimmung der Nukleinsäurelösungen	24
B.1.6.2.: Qualitative Analyse der Nukleinsäurelösungen	24
B.1.7.: Isolierung und Reinigung von DNS-Fragmenten aus Agarosegelen	25
B.1.8.: Enzymatische Behandlung von DNS-Molekülen	25
B.1.8.1.: Hydrolyse von DNS mit Restriktionsenzymen	25
B.1.8.2.: Verknüpfen von DNS Molekülen mit T4-DNS-Ligase	26
B.1.8.3.: Enzymatische Verlängerung von Oligonukleotiden mit Terminaler Transferase	26
B.1.9.: Transformation von Mikroorganismen	27
B.1.9.1.: Transformation von <i>Escherichia coli</i>	27
B.1.9.2.: Transformation von <i>Listeria monocytogenes</i>	27
B.1.10.: <i>In vitro</i> Amplifizierung von DNS mittels der Polymerase-Kettenreaktion	28
B.1.10.1.: Verwendete PCR Systeme	28
B.1.10.2.: Verwendete Primer für die PCR	28

B.1.10.2.1.: 16S-rDNS spezifische Primer	29
B.1.10.2.2.: 23S-rDNS spezifische Primer	29
B.1.10.2.3.: 5S-rDNS spezifische Primer	29
B.1.10.2.4.: <i>Iap</i> -Gen spezifische Primer	30
B.1.10.2.5.: <i>PlcA</i> -Gen spezifische Primer	30
B.1.10.2.6.: Primer für „RAPD-PCR“	31
B.1.10.3.: PCR Techniken	31
B.1.10.3.1.: „Hot Start“-PCR	31
B.1.10.3.2.: „Kompetitive“-PCR	31
B.1.10.3.3.: „Nested“-PCR	32
B.1.10.3.4.: „Multiplex“-PCR	32
B.1.10.3.5.: „Randomly-Amplified-Polymorphic-DNA“-PCR (RAPD-PCR)	32
B.1.10.4.: Standardansatz und Reaktionsprogramm für die Durchführung der PCR	33
B.1.10.4.1.: PCR in Glaskapillaren	33
B.1.10.4.2.: PCR in Reaktionsgefäßen oder in Mikrotiterplatten	34
B.1.10.5.: Verwendete Additive für die PCR	35
B.1.10.6.: Aufreinigung von PCR Produkten	35
B.1.11.: DNS Sequenzierung	35
B.1.11.1.: Verwendete Primer für die Sequenzierung	36
B.1.11.2.: Vorbereitung des Polyacrylamidgel und der Sequenziereinheit	36
B.1.11.3.: Sequenzierreaktion	37
B.1.11.4.: Auswertung der Sequenzdaten	39
B.1.12.: Rekonstruktion von Stammbäumen	39
B.1.13.: Oligonukleotidsonden	39
B.1.13.1.: Konstruktion von rRNS gerichteten Sonden	39
B.1.13.2.: Markierung mit Fluoreszenzfarbstoffen	40
B.1.13.3.: Photometrische Vermessung der markierten Oligonukleotide	40
B.1.13.4.: Verwendete rRNS gerichtete Oligonukleotidsonden	41
B.1.14.: Pulsed-Field-Gel-Electrophorese-Fragment-Längen-Polymorphismen	41
B.1.14.1.: Präparation von <i>Listeria</i> „cell gel plugs“ für PFGE	42
B.1.14.2.: Präparation des Gels und Gellauf	42
B.1.15.: Herstellung und Markierung von Polyribonukleotidsonden durch <i>in vitro</i> Transkription	43
B.1.15.1.: Prinzip der <i>in vitro</i> Transkription	43
B.1.15.2.: Durchführung der <i>in vitro</i> Transkription	44
B.1.16.: Hybridisierungen	45

B.1.16.1.: Ermittlung von Hybridisierungs- und Waschbedingungen	45
B.1.16.2.: Hybridisierung ganzer Zellen auf Objektträgern	46
B.1.16.3.: Vorbehandlung der Zellen	47
B.1.16.4.: Hybridisierung mit Fluoreszenzfarbstoff-markierten Oligonukleotid-sonden	47
B.1.16.5.: Hybridisierung mit mehrfach DIG-markierten Polyribonukleotidsonden	49
B.1.17.: Mikroskopische Techniken	50
B.1.17.1.: Detektion fluoreszenzmarkierter Zellen durch Epifluoreszenzmikroskopie	50
B.1.17.2.: Konfokale Laserscanning-Mikroskopie	51
B.2.: ZELLBIOLOGISCHE METHODEN	52
B.2.1.: Verwendete Zelllinien	52
B.2.2.: Verwendete Lösungen, Medien und Kulturgefäße	52
B.2.3.: Hitzeinaktivierung von fötalem Kälberserum (FCS)	53
B.2.4.: Auftauen von eingefrorenen Zellkulturen	53
B.2.5.: Trypsinisieren und Passagieren von Zellkulturen (Freshney <i>et. al.</i> , 1987)	54
B.2.6.: Herstellung von „Infektionsaliquots“	54
B.2.7.: Infektion von Zelllinien mit nativen <i>L. monocytogenes</i> Stämmen	54
B.2.8.: Infektion von Zellen mit GFP-markierten <i>L. monocytogenes</i> Zellen	55
B.2.9.: Adhäsionstests	56
B.2.10.: Infektion von Zellkulturen mit GFP-markierten <i>L. monocytogenes</i> Stämmen und mikroskopische Auswertung	56
C.: ERGEBNISSE	59
C.1.: ANREICHERUNG UND ISOLIERUNG VON LISTERIEN UND SALMONELLEN AUS UMWELTPROBEN	59
C.1.1.: Isolierung von Listerien aus Umweltproben	59
C.1.2.: Isolierung von Salmonellen aus Bioabfallvergärungsanlagen	60
C.2.: <i>IN SITU</i> DETEKTION VON LISTERIEN, SALMONELLEN UND <i>CAMPYLOBACTER</i>	64
C.2.1.: <i>In situ</i> Detektion von Listerien	64
C.2.1.1.: Verwendete Sonden und deren Spezifität zur Detektion von Listerien	64
C.2.1.2.: <i>In situ</i> Detektion von Listerien mit Polyribonukleotidsonden.	66
C.2.1.3.: <i>In situ</i> Detektion von Listerien in Rohmilch nach Selektivanreicherung	67
C.2.2.: <i>In situ</i> Detektion von Salmonellen	69
C.2.2.1.: Verwendete Sonden und deren Spezifität zur Detektion von Salmonellen	69
C.2.2.2.: <i>In situ</i> Detektion von Salmonellen in Bioabfallvergärungsanlagen	71
C.2.2.3.: Bestimmung des Detektionslimits des Salmonellennachweises durch FISH	71

C.2.3.: <i>In situ</i> Detektion von <i>Campylobacter</i>	74
C.2.3.1.: Verwendete Sonden und deren Spezifität zur Detektion von <i>Campylobacter</i>	74
C.2.3.2.: <i>In situ</i> Detektion von <i>Campylobacter</i> in roher Hühnerleber	76
C.3.: UNTERSUCHUNGEN ZUR EVOLUTION DES „VIRULENZGENCLUSTERS“ VON ALLEN BEKANNTEN <i>LISTERIA</i> ARTEN DURCH VERGLEICHENDE SEQUENZANALYSE	78
C.3.1.: Anordnung der Gene im „Virulenzgencluster“	79
C.3.2.: Verwendete Datensätze	80
C.3.3.: Phylogenetische Analyse der Sequenzdaten	81
C.3.4.: „Kombinierte“ Datensätze	82
C.3.5.: „Konsensusbaum“ zur Evolution des „Virulenzgenclusters“ bei Listerien	84
C.4.: DIFFERENZIERUNG VON LISTERIEN UND FEINDIFFERENZIERUNG VON <i>L. MONOCYTOGENES</i>	85
C.4.1.: Feindifferenzierung von <i>L. monocytogenes</i> durch vergleichende Sequenzanalyse von Virulenzgenen	85
C.4.1.1.: Sequenzanalyse der <i>iap</i> -Gene aller bekannten <i>Listeria</i> Arten und unterschiedlicher <i>L. monocytogenes</i> Stämme	86
C.4.1.2.: Feindifferenzierung von <i>L. monocytogenes</i> durch vergleichende Sequenzanalyse des <i>plcA</i> -Gens	90
C.4.2.: Feindifferenzierung von <i>L. monocytogenes</i> durch molekularbiologische Methoden	92
C.4.2.1.: Entwicklung eines PCR-gestützten Verfahrens zur Detektion der einzelnen evolutionären Linien von <i>L. monocytogenes</i>	92
C.4.2.1.1.: Überprüfung des entwickelten PCR-Systems anhand <i>L. monocytogenes</i> Stämme der 13 bekannten Serovarianten	93
C.4.2.1.2.: Anwendung des entwickelten PCR-Systems auf <i>L. monocytogenes</i> -Isolate verschiedenen Ursprungs	94
C.4.2.1.3.: Bestimmung des Detektionslimits des entwickelten PCR-Nachweisverfahrens für die Entwicklungslinien von <i>Listeria monocytogenes</i>	103
C.4.2.1.4.: Verbesserung der Detektionseffizienz durch „Nested-PCR“	105
C.4.2.1.5.: Kompetitive PCR zur Erhöhung der Spezifität	106
C.4.2.1.6.: PCR für die evolutionären Linien von <i>L. monocytogenes</i> aus DNS-Mischungen verschiedener <i>L. monocytogenes</i> -Stämmen	107
C.4.2.1.7.: Differenzierung von <i>L. innocua</i> und <i>L. monocytogenes</i> durch „Multiplex“-PCR	108
C.4.2.2.: Schnelltypisierung von Listerien durch „Einspursequenzierung“	109

C.4.2.2.1.: Schnelltypisierung von <i>L. innocua</i> und <i>L. monocytogenes</i> durch Einspursequenzierung _____	110
C.4.2.2.2.: Schnelltypisierung von <i>L. monocytogenes</i> durch Einspursequenzierung _____	112
C.4.2.3.: Stammdifferenzierung von <i>L. monocytogenes</i> durch „ <i>pulsed-field</i> “-Gelelektrophorese (PFGE) _____	113
C.4.2.4.: Differenzierung von <i>L. monocytogenes</i> durch RAPD-PCR _____	116
C.5.: INFEKTIONSSTUDIEN MIT <i>L. MONOCYTOGENES</i> _____	118
C.5.1.: Infektion mit nativen <i>L. monocytogenes</i> -Stämmen _____	118
C.5.2.: Markierung von <i>L. monocytogenes</i> -Stämmen mit dem grün-fluoreszierenden Protein _____	119
C.5.3.: Infektion mit GFP-markierten <i>L. monocytogenes</i> -Stämmen _____	120
C.5.4.: Adhärenztests mit GFP-markierten <i>L. monocytogenes</i> Stämmen _____	121
C.5.5.: Infektion von Zelllinien mit GFP-markierten <i>L. monocytogenes</i> Stämmen und anschließender mikroskopischer Auswertung _____	122
D: DISKUSSION _____	125
D.1.: DETEKTION VON SALMONELLEN, LISTERIEN UND <i>CAMPYLOBACTER</i> MIT RRNS- GERICHTETEN GENSONDEN _____	125
D.1.1.: <i>In situ</i> -Detektion von Salmonellen _____	125
D.1.1.1.: Spezifität der Sonde Salm-63 _____	125
D.1.1.2.: <i>In situ</i> Detektion von Salmonellen in Bioabfallvergärungsanlagen _____	126
D.1.1.3.: Vergleich der FISH-Technik mit anderen Detektionsverfahren für Salmonellen. __	128
D.1.2.: <i>In situ</i> Detektion von Listerien _____	130
D.1.2.1.: Spezifität der Sonden Lis-1255 und Lis-637 _____	130
D.1.2.2.: Detektion von Listerien <i>in situ</i> in Umweltproben _____	131
D.1.2.2.: Vergleich der FISH-Technik mit anderen Detektionsverfahren zum Nachweis für Listerien _____	133
D.1.3.: <i>In situ</i> Detektion von <i>Campylobacter</i> _____	134
D.1.2.1.: Spezifität der Sonden Camp-635 und Cajeco-1427 _____	134
D.1.2.2.: <i>In situ</i> Detektion von <i>Campylobacter</i> in Hühnerleber _____	135
D.1.2.2.: Vergleich FISH-Technik mit anderen Detektionsverfahren zum Nachweis für <i>Campylobacter</i> _____	136
D.2.: DIE EVOLUTION DES „<i>VIRULENZGENCLUSTERS</i>“ VON LISTERIEN _____	136
D.3.: VERGLEICHENDE PHYLOGENETISCHE ANALYSEN VON SEQUENZDATEN DER GENE <i>PLCA</i> UND <i>IAP</i> _____	139

D.4.: SUBTYPISIERUNG VON <i>L. MONOCYTOGENES</i> DURCH PFGE-RLFP-ANALYSE	144
D.5.: ENTWICKLUNG PCR-GESTÜTZTER VERFAHREN ZUR DISKRIMINIERUNG VON <i>L. INNOCUA</i> UND <i>L. MONOCYTOGENES</i> UND ZUR FEINTYPISIERUNG VON <i>L. MONOCYTOGENES</i>	146
D.6.: INFektionsSTUDIEN MIT <i>L. MONOCYTOGENES</i>	147
E: ZUSAMMENFASSUNG	149
F: LITERATURVERZEICHNIS	151
G: ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	167
G: ANHANG	169
G.1.: DISTANZMATRIZES DER VERWENDETEN GENE AUS DEM VIRULENZGENCLUSTER DER <i>LISTERIA</i> ARTEN	169
G.1.1.: Ähnlichkeitsmatrix der Nukleinsäuresequenzdaten des <i>ldh</i> Gens	169
G.1.2.: Identitätsmatrix der Aminosäuresequenzdaten des <i>ldh</i> Gens	169
G.1.3.: Ähnlichkeitsmatrix der Nukleinsäuresequenzdaten des <i>prs</i> Gens	170
G.1.4.: Identitätsmatrix der Aminosäuresequenzdaten des <i>prs</i> Gens	170
G.1.5.: Ähnlichkeitsmatrix der Nukleinsäuresequenzdaten des <i>vclb</i> Gens	171
G.1.6.: Identitätsmatrix der Aminosäuresequenzdaten des <i>vclb</i> Gens	171
G.1.7.: Ähnlichkeitsmatrix der Nukleinsäuresequenzdaten des <i>orfa</i> Gens	172
G.1.8.: Identitätsmatrix der Aminosäuresequenzdaten des <i>orfa</i> Gens	172
G.2.: ZUORDNUNG DER <i>L. MONOCYTOGENES</i> STÄMME IN DIE ENTWICKLUNGSLINIEN IN ABHÄNGIGKEIT DER VERWENDETEN BERECHNUNGSVERFAHREN UND SEQUENZFILTER	173
E: DANKSAGUNG	175

A: Einleitung

Der Verzehr von Lebensmitteln kann beim Menschen über zweihundert, teils lebensbedrohliche Krankheiten, wie Vergiftungen und Infektionen hervorrufen (Bryan, 1982). Schätzungen gehen davon aus, daß allein in den USA jährlich einundachtzig Millionen Menschen nach dem Verzehr von Nahrungsmitteln, die mit humanpathogenen Mikroorganismen kontaminiert sind, erkranken. Die Symptome dieser Infektionen reichen dabei von mild verlaufenden Gastroenteritiden bis zu lebensbedrohlichen Infektionen des Nervensystems, der Leber oder der Nieren. Von diesen Infektionen enden ca. neuntausend tödlich (Archer und Kvenberg, 1985; Bennet *et al.*, 1987; Todd, 1989; Ames, 1994). Diese Krankheiten können von Viren, Parasiten und vor allem von Bakterien hervorgerufen werden. In den letzten 20 Jahren wurden immer mehr Organismen isoliert und beschrieben, die durch kontaminierte Lebensmittel auf den Menschen übertragen werden und Infektionskrankheiten hervorrufen. Während das Typhus-Fieber am Anfang des 20. Jahrhunderts weit verbreitet war, ist es heutzutage in den Industriestaaten weitgehend ausgerottet. Diese Infektionskrankheit, ausgelöst durch *Salmonella typhi*, konnte vor allem durch verbesserte hygienische Maßnahmen eingedämmt werden. In Regionen wie Südostasien werden dagegen auch heute noch rund eintausend Typhus-Fälle pro einhunderttausend Einwohnern pro Jahr gemeldet (Robert-Koch Institut, 1999). Auf ähnliche Weise konnten weit verbreitete Infektionskrankheiten wie Cholera oder Tuberkulose durch Einführung von verbesserten Hygienemaßnahmen zurückgedrängt werden. Anstelle dieser traditionellen Erreger von Infektionskrankheiten treten in neuerer Zeit andere Organismen wie z.B. Stämme von *Salmonella enterica* auf. Infektionen mit diesen Stämmen nehmen seit dem zweiten Weltkrieg vermehrt zu (Rodriguez, 1990). Weiterhin zählen z.B. der enterohämorrhagische *Escherichia coli* Stamm O157:H7, der 1982 bei einem Ausbruch an blutiger Diarrhöe, ausgelöst durch Verzehr von Produkten einer Schnellimbibäckerei, entdeckt wurde (Riley *et al.*, 1983), *Yersinia enterocolitica*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter fetus*, *Cryptosporidium cayetanensis*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio vulnificus*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium botulinum*, *Shigella flexneri* etc. zu den heute aktuellen Erregern von Infektionskrankheiten, die durch Nahrungsmittel übertragen werden. Neben den gesundheitlichen Schäden treten auch immense wirtschaftliche Kosten durch Infektionen mit kontaminierten Lebensmitteln auf. So wird der Schaden durch Ausfall der Lebensmittelproduktion und durch die medizinische Versorgung allein in den USA auf fünf bis siebzehn Milliarden Dollar pro Jahr geschätzt.

Von einigen pathogenen Organismen wurde erst in den letzten Jahrzehnten bekannt, daß ihre Hauptverbreitungsrouten kontaminierte Lebensmittel sind. So ist das Bakterium *Listeria monocytogenes* schon lange bekannt als Erreger von Meningitis und anderen invasiven Infektionen bei immunsupprimierten Wirten (Seeliger, 1961). Aber erst 1983 wurde von Schleich und Mitarbeitern der Nachweis erbracht, daß *L. monocytogenes* hauptsächlich durch kontaminierte Lebensmittel verbreitet wird. Eine ähnliche Situation findet man bei *Campylobacter*. Vertreter der Gattung *Campylobacter* wurden zunächst als seltene, opportunistische Keime bei Infektionen des Blutkreislaufs beschrieben. Inzwischen weist man jedoch, daß *Campylobacter* Infektionen eine weit verbreitete Ursache für Enteritiden und Durchfallerkrankungen sind (Dekeyser, 1972).

Durch den Verzehr von Lebensmitteln erkranken in Deutschland pro Jahr ca. zweihunderttausend Menschen an einer Enteritis, einer Magen-Darm Infektion, die meist durch Bakterien verursacht wird, aber auch von Viren und Protozoen ausgelöst werden kann. Hauptauslöser dieser Enteritiden sind unterschiedliche Stämme von *Salmonella enterica*. Anders als das von *Salmonella typhi* ausgelöste Typhus-Fieber, das vor allem durch verseuchtes Trinkwasser verbreitet wird, werden *Salmonella enterica*-Enteritiden hauptsächlich durch den Verzehr von kontaminierten Lebensmitteln, die einen tierischen Ursprung haben, übertragen (Groisman und Ochman, 1997; Meyer, 1999). Hierzu zählen Geflügelfleisch, rohe Eier und Rohfleisch-haltige Produkte. (Poppe *et al.*, 1998; Peplow *et al.*, 1999; Meyer, 1999; Soumet *et al.*, 1976; Durant *et al.*, 1999). Zudem führt die teilweise exzessive Gabe von Antibiotika bei der Massentierhaltung von Geflügel zur Ausbildung von Resistenzen bei den Stämmen von *Salmonella enterica* (Wain *et al.*, 1999).

Die Gattung *Salmonella* wurde im Jahr 1900 zu Ehren des amerikanischen Bakteriologen Daniel E. Salmon (1850-1914) benannt. Die einzelnen Isolate dieser Gattung wurden ursprünglich nach ihrem vermuteten Wirt oder dem Ort ihrer Erstisolierung bezeichnet. Später wurden Salmonellen näher differenziert und nach Einführung der Serodiagnose katalogisiert (Kauffmann-White-Schema). Diese Typisierung wird bis heute fortgesetzt und umfaßt mittlerweile über zweitausend Serotypen (Le Minor, 1992). Durch die fortlaufende Entwicklung bei biochemischen-, molekularbiologischen, sowie taxonomischen Untersuchungen wurden alle Salmonellen, aufgrund ihrer DNS-DNS Ähnlichkeit von über 70%, der Art *Salmonella enterica* zugeordnet (Le Minor und Popoff, 1987). Diese wird ihrerseits in die sieben Unterarten

Salmonella enterica Unterart I *enterica*
Salmonella enterica Unterart II *salamae*
Salmonella enterica Unterart IIIa *arizonae*
Salmonella enterica Unterart IIIb *diarizonae*
Salmonella enterica Unterart IV *houtenae*
Salmonella enterica Unterart V *bongori*
und *Salmonella enterica* Unterart VI *indica*

unterteilt (Anonymous 1985 und 1987).

Nach einer Infektion mit einem Stamm von *Salmonella enterica* (meist durch Serovarianten der Unterart I) treten beim Menschen nach einer mittleren Inkubationszeit von 20-24 h Erbrechen und wäßriger Durchfall auf. Die Schwere der Symptome hängt dabei stark vom Erregertyp, der physischen Konstitution und des Alters der Infizierten ab. In der Regel sind diese Enteritiden selbstlimitierend und dauern etwa ein bis zwei Tage an. Sie können aber in seltenen Fällen von schweren Komplikationen wie Sepsis, Meningitis oder einer Osteomyelitis begleitet werden und sogar zum Tode führen.

Bakterielle Enteritiden werden nicht nur durch Stämme von *Salmonella enterica* hervorgerufen, sondern zunehmend wird auch die Bedeutung von Vertretern der Gattung *Campylobacter* bekannt. In den USA haben Enteritiden, die durch *Campylobacter* Arten ausgelöst werden, die von *Salmonella enterica* ausgelöst bereits übertroffen (Tauxe, 1992; Blaser und Reller, 1981; Blaser, 1980; Foster, 1986). *Campylobacter*-Arten sind harmlose Bewohner des Intestinaltrakts verschiedener Wildtiere sowie domestizierter Haustiere und rufen dort keine Infektionskrankheiten hervor. So belegen Studien, daß ca. 30 bis 100 % an Geflügel, 40 bis 60 % an Rindern und 60 bis 80 % der domestizierten Schweine mit *Campylobacter* durchseucht sind (Stern *et al.*, 1985). Rohmilch wird als Haupt-, „Vehikel“ zur Verbreitung von *Campylobacter* angesehen. Daneben belegen epidemiologische Studien, daß Geflügel oftmals die Quelle für eine *Campylobacter*-Infektion sein kann. Auch Trinkwasser kann zur Übertragung von *Campylobacter* beitragen, was bereits zu Campylobakteriose Ausbrüchen mit Tausenden an Infizierten führte (Doyle und Schoeni, 1986).

Prinzipiell werden Nahrungsmittel durch fäkale Kontaminationen von *Campylobacter*-Trägern kontaminiert. Rohmilch kann z.B. fäkal oder nach einer Mastitis durch das Euter kontaminiert werden. Auch Eier werden mit Ausbrüchen von Campylobakteriosen in Verbindung gebracht (Doyle, 1984).

Als Symptome nach einer Infektion mit *Campylobacter* treten starker, gelegentlich blutiger Durchfall, Unterleibsschmerzen und Bauchkrämpfe auf. Für eine Infektion reichen bereits einige hundert Zellen aus. Bei Infektionen spielen vor allem die Arten *Campylobacter jejuni* und *Campylobacter coli*, seltener auch *Campylobacter fetus* eine Rolle. Die beiden zuerst genannten Arten werden zu den thermotoleranten Vertretern von *Campylobacter* gerechnet, da sie ein Wachstumsoptimum von 42°C besitzen. Das erklärt auch, warum Geflügel oft mit *Campylobacter* durchseucht ist und *Campylobacter*-Infektionen von Geflügel und Geflügelprodukten ausgehen, bei denen die erforderlichen hygienischen Maßnahmen nicht eingehalten wurden. Die Körpertemperatur von Geflügel beträgt in der Regel 41-42°C, die optimale Wachstumstemperatur für thermotolerante *Campylobacter* Arten. Darüber hinaus sind die Vertreter der Gattung *Campylobacter* sehr anspruchsvolle Keime, die sich schwer isolieren und in Kultur halten lassen. Die mikroaerophilen Bakterien benötigen zum Wachstum eine Atmosphäre mit 5-10 % Sauerstoff. Sie finden daher im Intestinaltrakt von Tieren gute Lebensbedingungen vor. Eine Infektion mit der nicht thermotolerante Art *Campylobacter fetus* kann vor allem bei Schafen zum Abort der Föten führen.

Ein weiterer Organismus der bei Schafen und Rindern zu Frühgeburten führen kann ist *Listeria monocytogenes*. Dieser Organismus war bis in die 80er Jahre hinein vor allem für Veterinärmediziner von Interesse, da es nach Infektion mit diesem Organismus, neben den oben angesprochenen Aborten, oft zu Meningitis und Encephalitis in Schafen, Rindern oder Ziegen kam. Erst seit Beginn der 80er Jahre wird *Listeria monocytogenes* auch als sehr wichtiger Erreger von Lebensmittelinfektionen angesehen.

Im Jahre 1891 beobachtete Hayem in Frankreich und 1893 Henle in Deutschland Gram-positive Stäbchen in Zellkulturschnitten einer Leber eines Patienten; der rückblickend höchstwahrscheinlich an einer Infektion mit *L. monocytogenes* litt. Der Schwede Hülphers isolierte im Jahre 1911 ein Bakterium aus einer nekrotischen Leber eines Hasen und benannte es „*Bacillus hepatis*“. Erst vor ca. 80 Jahren wurde *L. monocytogenes* detailliert von Murray (1926) beschrieben. Ein Jahr später isolierte Pirie ein ähnliches Bakterium aus der Leber afrikanischer Springmäuse und benannte es „*Listerella hepatolytica*“. Im Jahre 1940 wurde zu Ehren des englischen Bakteriologen und Chirurgen Sir John Lister (1827-1912) die Gattung *Listeria* geschaffen. *Listeria denitrificans* (1961), *L. grayi* (1966), *L. murrayi* (1971) und *L. bulgarica* (1975), 1984 umbenannt in *L. ivanovii*, wurden nach und nach der Gattung *Listeria* zugeordnet. Als *L. monocytogenes* bezeichnete nicht pathogene Stämme vom Serotyp 6, wurden der neu geschaffenen Art *L. innocua* zugeordnet (Seeliger und Jones, 1986). Nach

einer Reihe von Aus- und Eingliederungen sowie Umbenennungen beinhaltet nun die Gattung *Listeria* seit 1992 die sechs Arten *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri* und *L. grayi* (Jones, 1992).

Listerien sind Gram-positive Stäbchen mit einem Durchmesser von etwa 0,4-0,5 µm und einer Länge von etwa 0,5-2 µm (Seeliger und Jones, 1986). Sie zeigen eine aerobe bis fakultativ anaerobe Lebensweise und bilden keine Sporen aus. Sie werden phylogenetisch den Gram-positiven Bakterien mit niedrigen G+C Gehalt der DNS zugerechnet (Woese, 1987). Sie bewegen sich charakteristisch taumelnd bei einer Temperatur von 20 bis 25°C. Listerien können von pH 6-9 und bei einer Temperatur von 1 bis 45°C wachsen. Die optimale Wachstumstemperatur liegt bei 30-37°C. Bei 37°C Wachstumstemperatur sind Listerien aufgrund der ausbleibenden Flagellinsynthese nicht mehr beweglich. Listerien sind meist katalase-positiv und oxidase-negativ. Auf Blutagar zeigt *L. monocytogenes* β-Hämolyse.

Listerien sind weitverbreitet in der Natur. Sie kommen in Erde, auf Pflanzen und im Wasser vor (Coyle *et al.*, 1984; Pearson, 1970). Listerien sind Bewohner von Silage and Abwässer (Guenich, 1984). Die Aufnahme von kontaminierter Silage wird als möglicher Weg betrachtet, wie Listerien in Rohmilch gelangen können (Donnelly, 1987). Menschen (ca. 4%) und Tiere können oft als symptomlose Träger von Listerien fungieren. Listerien wurden weiterhin in einunddreißig warmblütigen Tieren, in Arthropoden, Fischen, Insektenlarven, Fröschen und Schnecken nachgewiesen.

Durch die Aufnahme kontaminierter Lebensmittel wie Fleisch, Wurst (speziell Salami), Geflügel, Milch und Milchprodukten wie Käse (speziell Romadur, Camembert, Roquefort), Gemüse etc. treten sporadische Ausbrüche an Listeriose auf (Ho *et al.*, 1986; Conner *et al.*, 1986; Dominguez-Rodriguez *et al.*, 1985; Lovett *et al.*, 1987; Silliker, 1987; Farber und Peterkin, 1991; Fleming *et al.*, 1985). Sogar der Konsum von pasteurisierter Milch führte zum Ausbruch einer Listeriose (Fleming *et al.*, 1985). Listerien gehören aufgrund ihrer Fähigkeit, noch bei 4°C zu wachsen, zur sogenannten „Kühlschrankflora“. Dadurch erlangen sie einen gewissen Wachstumsvorteil gegenüber anderen pathogenen Lebensmittelkontaminaten.

Die von *L. monocytogenes* ausgelöste Infektionskrankheit Listeriose führt beim Menschen zu plötzlichen Fieberanfällen, Kopfschmerzen, Übelkeit, gastrointestinalen Symptomen wie Unterleibsschmerzen und Durchfall, zu Sepsis oder Endocarditis, aber auch zu Erkrankungen des Zentralnervensystems wie Meningitis und Encephalitis (Gaillard *et al.*, 1987; Ho, *et al.*, 1986; Seeliger, 1961). Risikopersonen sind vor allem schwangere Frauen, ältere und immunsupprimierte Personen wie Transplantationspatienten, immungeschwächte Personen, aber auch Diabetiker und Schwerst-Alkoholranke (Farber und Peterkin, 1991; Seeliger,

1961). Bei Schwangeren besteht die Gefahr der Infektion des Fötus. Dies kann zu einer generalisierten Bakteriämie im Fötus, zur Ausbildung einer „granulomatösen Infantiseptica“ oder zum Abort führen.

Listeria monocytogenes spielt aber nicht nur als wichtiger Erreger von Lebensmittelinfektionen eine Rolle, sondern wurde in der letzten Dekade zum genetischen Modellorganismus, um das Leben fakultativ intrazellulärer Bakterien zu studieren. Virulente Stämme von *Listeria monocytogenes* zeichnen sich durch einen intrazellulären Lebenszyklus aus und sind in der Lage, in eine Reihe von Säugerzellen wie z.B. nichtprofessionelle Phagozyten, phagozytierende Zellen wie Makrophagen (Mackaness, 1962), Monozyten oder auch in Fibroblasten einzudringen, dort zu überleben und sich zu replizieren (Bubert *et al.*, 1992). Auf dem Chromosom von *Listeria monocytogenes* befinden sich in direkter Nachbarschaft sechs Virulenzgene, die das sogenannte „Virulenzgencluster“ von *L. monocytogenes* bilden. In diesem Cluster befinden sich die Gene *hly*, *prfA*, *plcA*, *actA*, *mpl* und *plcB*. Das *hly* Gen kodiert für ein SH-aktiviertes Hämolyysin, auch Listeriolysin-O genannt. Innerhalb des Virulenzgenclusters bilden die drei Gene *mpl*, *actA* und *plcB* das sogenannte „Lecithinaseoperon“. Dieses beherbergt eine Zink-abhängige Metalloprotease (kodiert vom *mpl* Gen), ein Protein, das für die Aktinpolymerisation essentiell ist (kodiert vom *actA*-Gen) und eine Phospholipase-C, die spezifisch für Phosphatidylcholin oder Lecithin ist (kodiert vom *plcB* Gen). Diese Lecithinase benötigt die Metalloprotease zu Aktivierung. Alle Gene im „Virulenzgencluster“ stehen unter strikter Kontrolle des Transkriptions-Aktivator-Proteins PrfA, das vom autoregulierten Gen *prfA* kodiert wird und in allen virulenten Stämmen von *L. monocytogenes* nachweisbar ist (Bubert *et al.*, 1992; Leitmeister-Wächter *et al.*, 1990)

Im Gastrointestinaltrakt gelingt es *L. monocytogenes*, die Barriere der normalerweise nicht phagozytierenden Darmepithelzellen durch induzierte Phagozytose zu durchdringen. Die Anheftung an die Wirtszelle und die Internalisierung der bakteriellen Zellen wird neben dem p60 Protein von einem ca. 80 kDa großen Oberflächenprotein, dem Internalin-A vermittelt (Gaillard *et al.*, 1991; Wuenscher *et al.*, 1993). *L. monocytogenes* befindet sich nach der Internalisierung der Wirtszelle in einem Phagosom der Wirtszelle. Etwa dreissig Minuten nach der Internalisierung durch die induzierte Phagozytose gelingt es *L. monocytogenes*, mit Hilfe des Listeriolysins und einer Phosphatidylinositol-spezifischen Phospholipase C, die vom *plcA*-Gen kodiert wird, das Phagosom zu lysieren und in das Wirtszellzytosol zu entkommen. In dieser Phase des Infektionszyklus von *L. monocytogenes* induziert das ActA-Protein die

Polymerisation von Aktin an einem Pol der Zelloberfläche von *Listeria monocytogenes*. Durch das starre nun unlösliche Aktin ist es für *L. monocytogenes* möglich, sich wie ein Komet, mit dem „Aktinkometenschweif“ durch Ausbildung von Pseudopodien-artigen Strukturen in die benachbarte Zelle zu schieben und diese somit zu infizieren. Hier ist *L. monocytogenes* zunächst von einer doppelten Membran umgeben. Durch den Einsatz der Lecithinase und des Listeriolysins gelangt *L. monocytogenes* erneut ins Wirtszellzytosol. Nun kann der Zyklus von intrazellulärer Bewegung durch die Aktinpolymerisation und das Infizieren benachbarter Zellen von Neuem beginnen.

Für die Invasion von Wirtszellen ist neben Internalin-A ein extrazelluläres Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 60 kDa essentiell. Dieses p60 Protein wird vom sogenannten *iap*-Gen („*invasion associated protein*“) kodiert, welches nicht im „*Virulenzgencluster*“ lokalisiert ist. Das *Iap*-Protein ist sowohl in allen virulenten Stämmen von *Listeria monocytogenes* (Köhler *et al.*, 1990) als auch in allen *Listeria* Arten nachweisbar (Bubert *et al.*, 1992). Die Expression des p60 Proteins steht nicht unter der Kontrolle von PrfA (Köhler *et al.*, 1991). Es führt dabei zwei für die Virulenz und den Zellmetabolismus von *Listeria monocytogenes* essentielle Funktionen aus. Es ist wichtig für die Adhäsion der virulenten Listerien an die Wirtszelle und katalysiert in der späten Phase der Zellteilung die Hydrolyse des Mureins. Das Protein besitzt eine siebenundzwanzig Aminosäuren langes Signalpeptid und weist sowohl hoch konservierte (C- und N-Termini) als auch hoch-variable Regionen und Insertionsbereiche auf. Es setzt sich weiterhin aus einer ausgedehnten Domäne sich wiederholender Einheiten der Aminosäuren Threonin und Asparagin zusammen, die von einem Prolin-Serin-Lysin-Motiv abgetrennt werden (Köhler *et al.*, 1990; Wuenscher *et al.*, 1993).

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, für die drei wichtigen humanpathogenen Mikroorganismen *Listeria*, *Salmonella* und *Campylobacter* gegen die ribosomale RNS gerichtete Sonden zu entwerfen, die eine spezifische Detektion dieser Organismen mittels Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH) erlauben.

Ein weiterer Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit sollte sich mit der Evolution des „*Virulenzgenclusters*“ von Vertretern der Gattung *Listeria* beschäftigen. Detaillierte vergleichende phylogenetische Sequenzanalysen verschiedener Virulenzgene sollten zudem einen Beitrag zur Evolution von *L. monocytogenes* liefern. Zur Feindifferenzierung von *L. monocytogenes* sollten weiterhin moderne molekularbiologische Methoden entwickelt und optimiert werden.

B: MATERIAL UND METHODEN

B.1.: Molekularbiologische Methoden

Für die Herstellung aller Lösungen wurde über eine Reinstwasseranlage (Milli-Q-Plus oder Academic A10, Millipore, Eschborn, BRD) entsalztes und filtriertes Wasser (im folgenden H_2O_{reinst}) verwendet. Die Verwendung von einfach entionisiertem Wasser (im folgenden $H_2O_{\text{dest.}}$) ist bei den jeweiligen Lösungen angegeben. Chemikalien wurden, soweit dies nicht anders angegeben ist, in p.a. Qualität bezogen und verwendet. Der pH-Wert wurde mit NaOH- und HCl-Lösungen entsprechender Normalitäten eingestellt. Abweichungen davon sind gesondert vermerkt. Alle Puffer, Medien und Lösungen wurden in einem Wasserdampf-hochdruckautoklaven (Vapoclav, Sterico, Dietikon, CH, oder Varioclav Typ 500, H+P Labortechnik, Oberschleißheim, BRD) für 20 min bei 121°C und $1,013 \times 10^5$ Pa Überdruck sterilisiert. Abweichungen sind gesondert vermerkt. Hitzelabile Substanzen wurden nach dem Autoklavieren bei etwa 50°C Medientemperatur unter sterilen Bedingungen zugegeben (Sterilfilter 0,22 µm Porengröße, Millipore).

B.1.1.: Lösungen, Standardpuffer und Lösungsmittel

Alle in der vorliegenden Arbeit verwendeten Puffer und Lösungen sind im folgenden aufgelistet. Spezielle Reagentien sind in den jeweiligen Kapiteln gesondert aufgeführt.

Lösungsmittel

10 % (v/v) Essigsäure
CHISAM (Chloroform und Isoamylalkohol im Verhältnis 24:1)
EtOH_{70 %}
EtOH_{abs.}
Formamid, deionisiert
Isopropanol
Roti[®]-Phenol-Chloroform-Lösung
Roti[®]-Phenol-Lösung

Puffer und verwendete Lösungen

- 0,5 M EDTA-Lösung (0,5 M Ethylendiamintetraacetat, 20 g NaOH Plätzchen, pH 8,0)
1 x PBS-Lösung (130 mM NaCl, 10 mM Na_xPO₄, pH 7,2-7,4)
10 % APS-Lösung (10 % (w/v) Ammoniumperoxodisulfat in H₂O_{reinst} lösen, bei -20°C lagern)
10 % N-Lauryl-Sarcosin-Lösung (10 % (w/v) N-Lauryl-sarcosin in H₂O_{reinst} lösen)
10 % SDS-Lösung (10 % (w/v) Natriumdodecylsulfat in H₂O_{reinst} lösen)
10 M NH₄Ac-Lösung (10 M Ammoniumacetat in H₂O_{reinst} lösen)
10 x TBE-Puffer (Tris-Borat-EDTA-Puffer, Tris 162 g, Borsäure 27,5 g, EDTA 9,3 g, pH 8,3-8,7 bei 45°C)
25 % (w/v) SDS-Lösung (25 % (w/v) Natriumdodecylsulfat in H₂O_{reinst} lösen)
3 M NaAc (3 M Natriumacetat in H₂O_{reinst} lösen, pH 5,2)
3 x PBS-Lösung (390 mM NaCl, 30 mM Na_xPO₄, pH 7,2-7,4)
5 M NaCl (5 M Natriumchlorid in H₂O_{reinst} lösen)
Auftragspuffer (25 % (w/v) Ficoll, 0,5 % (w/v) Bromphenolblau, 0,5 % (w/v) Xylencyanol, 50 mM EDTA)
Ethidiumbromid Färbelösung (1 µg/ml H₂O)
Ethidiumbromid Stammlösung (10 mg EtBr/ml H₂O_{dest} lösen)
LiCl-Lösung (4 M Lithiumchlorid)
Lysozym-Lösung (10 mg Lysozym aus Hühnerei in 1 ml H₂O_{reinst} lösen)
PBS-Stammlösung ([Na_xPO₄-Lösung], 200 mM NaH₂PO₄, 200 mM Na₂HPO₄, pH 7,2-7,4)
PFGE-Deproteinierungs-Lösung (frisch herstellen, 50 ml EDTA-Sarcosyl-Lösung, 100 mg Proteinase K, in möglichst wenig H₂O_{reinst} lösen bevor man es zur EDTA-Sarcosyl-Lösung gibt)
PFGE-EDTA-Sarcosyl-Lösung (0,5 g N-Lauryl-Sarcosin in 100 ml 0,5 M EDTA pH 8,0 lösen. Diese Lösung dient als Stammlösung für den Lysepuffer und die Deproteinierungs-Lösung)
PFGE-Lysepuffer (immer frisch herstellen, 50 ml EDTA-Sarcosyl-Lösung, 100 mg Deoxycholinsäure 150 mg Lysozym)
Proteinase-K-Lösung (10 mg Proteinase-K (Roche, Mannheim) in 1 ml H₂O_{reinst} lösen)
Silanlösung (0,5 % (v/v) γ -Methacryloxypropyltrimethoxysilan in EtOH_{abs} lösen)
TAE-Puffer (100 x konzentriert, 4 M Tris, 1 M Natriumacetat, 0,1 M EDTA, pH 8,0 mit Eisessig einstellen)
TEMED-Lösung (N, N, N', N', Tetraethylmethyldiamin)
TE-Puffer (Tris-EDTA-Puffer, 10,0 mM Tris-HCl, 1,0 mM EDTA, pH 8,0)
TNT-Puffer (100 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,05 % (v/v) Tween[®]20)
X-Gal-Stammlösung (40 mg X-Gal in 1 ml DMF lösen)

B.1.2.: Verwendete Mikroorganismen und Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten Organismen sind in Tabelle B.1., die verwendeten Plasmide in Tabelle B.2. aufgeführt.

Tabelle B.1.: Verwendete Organismen und deren Herkunft

Art/Stamm	Referenz
<i>Campylobacter coli</i>	NCTC 11366
<i>Campylobacter fetus ssp. fetus</i>	ATCC27374
<i>Campylobacter fetus ssp. fetus</i>	TUMCam1
<i>Campylobacter fetus ssp. venerealis</i>	ATCC19438
<i>Campylobacter jejuni</i>	NCTC11322
<i>Campylobacter jejuni</i>	TUMC2.49
<i>Campylobacter jejuni</i>	TUMC5.43
<i>Campylobacter jejuni</i>	TUMC5.45
<i>Campylobacter jejuni ssp. doylei</i>	LMG9243
<i>Campylobacter jejuni ssp. jejuni</i>	DSM4688
<i>Campylobacter jejuni ssp. jejuni</i>	LMG9217
<i>Campylobacter jejuni ssp. jejuni</i>	TUMC105890
<i>Campylobacter lari</i>	LMG7607
<i>Campylobacter sputorum biovar fecalis</i>	LMG11761
<i>Campylobacter sputorum biovar fecalis</i>	LMG6617
<i>Campylobacter sputorum biovar sputorum</i>	LMG10388
<i>Campylobacter upsaliensis</i>	DSM 5365
<i>Campylobacter upsaliensis</i>	LMG 7915
<i>Campylobacter upsaliensis</i>	LMG 8853
<i>Campylobacter upsaliensis</i>	LMG 8851
<i>Citrobacter freundii</i>	Umweltisolat
<i>Citrobacter freundii</i>	Umweltisolat
<i>Enterobacter cloacae</i>	Umweltisolat
<i>Enterococcus casseliflavus</i>	DSM20680
<i>Enterococcus gallinarum</i>	DSM20628
<i>Escherichia coli INVαF'</i>	<i>in vitro</i> gen
<i>Helicobacter pylori</i>	Klinik
<i>Helicobacter pylori</i>	Klinik
<i>L. grayi</i>	TUMLis1
<i>L. innocua</i>	IMVW127
<i>L. innocua</i>	IMVW128
<i>L. innocua</i>	IMVW129
<i>L. innocua</i>	IMVW620
<i>L. innocua "OXFORD"</i>	TUMLis2
<i>L. innocua "PALCAM"</i>	TUMLis3
<i>L. innocua sv 6a</i>	NCTC11288
<i>L. innocua V62a</i>	TUMLis4
<i>L. ivanovii</i>	ATCC19119

Art/Stamm	Referenz
<i>L. ivanovii</i>	IMVW1656
<i>L. ivanovii</i>	IMVW788
<i>L. monocytogenes</i>	IMVW1302
<i>L. monocytogenes</i>	IMVW1427
<i>L. monocytogenes</i>	IMVW1428
<i>L. monocytogenes</i>	IMVW1436
<i>L. monocytogenes</i>	IMVW1516
<i>L. monocytogenes</i>	IMVW1517
<i>L. monocytogenes</i>	IMVW1577
<i>L. monocytogenes</i>	IMVW1602
<i>L. monocytogenes</i>	IMVW2291
<i>L. monocytogenes</i>	IMVW2296
<i>L. monocytogenes</i>	IMVW2309
<i>L. monocytogenes</i>	IMVW2311
<i>L. monocytogenes</i>	IMVW2312
<i>L. monocytogenes</i>	IMVW2313
<i>L. monocytogenes</i>	IMVW2314
<i>L. monocytogenes</i>	IMVW478
<i>L. monocytogenes</i>	IMVW479
<i>L. monocytogenes</i>	IMVW560
<i>L. monocytogenes</i>	IMVW566
<i>L. monocytogenes</i>	IMVW567
<i>L. monocytogenes</i>	IMVW568
<i>L. monocytogenes (sv 4d/e)</i>	IMVW1447
<i>L. monocytogenes Aachen sv 1/2a</i>	TUMLis17
<i>L. monocytogenes EGD sv 1/2a</i>	TUMLis18
<i>L. monocytogenes F-Stamm sv 3a</i>	TUMLis19
<i>L. monocytogenes Iso1</i>	TUMLis20
<i>L. monocytogenes Iso11</i>	TUMLis21
<i>L. monocytogenes Iso3</i>	TUMLis22
<i>L. monocytogenes Iso45</i>	TUMLis23
<i>L. monocytogenes Iso46</i>	TUMLis24
<i>L. monocytogenes Iso50</i>	TUMLis25
<i>L. monocytogenes LL141 sv 1/2a</i>	TUMLis26
<i>L. monocytogenes LL365 sv 1/2a</i>	TUMLis27
<i>L. monocytogenes LL93 sv 1/2a</i>	TUMLis28
<i>L. monocytogenes NV4700 (sv 4a)</i>	TUMLis29
<i>L. monocytogenes R479a</i>	TUMLis30
<i>L. monocytogenes R62a</i>	TUMLis31
<i>L. monocytogenes RIII</i>	TUMLis36
<i>L. monocytogenes ScottA sv 4b</i>	TUMLis32

MATERIAL UND METHODEN

Art/Stamm	Referenz
<i>L. monocytogenes</i> sv 1/2a	IMVW1433
<i>L. monocytogenes</i> sv 1/2a	IMVW1449
<i>L. monocytogenes</i> sv 1/2a	IMVW1454
<i>L. monocytogenes</i> sv 1/2a	IMVW1632
<i>L. monocytogenes</i> sv 1/2a	IMVW34564
<i>L. monocytogenes</i> sv 1/2a	IMVW349
<i>L. monocytogenes</i> sv 1/2a	IMVW761
<i>L. monocytogenes</i> sv 1/2a	TUMLis12
<i>L. monocytogenes</i> sv 1/2b	IMVW1464
<i>L. monocytogenes</i> sv 1/2b	IMVW1726
<i>L. monocytogenes</i> sv 1/2b	IMVW1727
<i>L. monocytogenes</i> sv 1/2b	TUMLis9
<i>L. monocytogenes</i> sv 1/2c	IMVW310
<i>L. monocytogenes</i> sv 1/2c	IMVW351
<i>L. monocytogenes</i> sv 1/2c	TUMLis13
<i>L. monocytogenes</i> sv 3a	IMVW1630
<i>L. monocytogenes</i> sv 3a	TUMLis16
<i>L. monocytogenes</i> sv 3b	IMVW1603
<i>L. monocytogenes</i> sv 3b	TUMLis7
<i>L. monocytogenes</i> sv 3c	TUMLis15
<i>L. monocytogenes</i> sv 4a	SLCC2374
<i>L. monocytogenes</i> sv 4a	TUMLis6
<i>L. monocytogenes</i> sv 4ab	TUMLis14
<i>L. monocytogenes</i> sv 4b	IMVW1724
<i>L. monocytogenes</i> sv 4b	IMVW1725
<i>L. monocytogenes</i> sv 4b	SLCC4013
<i>L. monocytogenes</i> sv 4c	TUMLis5
<i>L. monocytogenes</i> sv 4d	TUMLis10
<i>L. monocytogenes</i> sv 4e	IMVW1446
<i>L. monocytogenes</i> sv 4e	TUMLis11
<i>L. monocytogenes</i> sv 7	TUMLis8
<i>L. monocytogenes</i> V527a	TUMLis33
<i>L. monocytogenes</i> V5a	TUMLis34
<i>L. seeligeri</i>	IMVW783
<i>L. seeligeri</i>	IMVW844

Art/Stamm	Referenz
<i>L. seeligeri</i>	IMVW860
<i>L. seeligeri</i>	SLCC3954
<i>L. seeligeri</i>	SLCC5921
<i>L. seeligeri</i>	SLCC7309
<i>L. seeligeri</i>	SLCC7329
<i>L. welshimeri</i>	IMVW1656
<i>L. welshimeri</i>	IMVW420
<i>L. welshimeri</i>	SLCC5828
<i>L. welshimeri</i> R90b	TUMLis35
<i>Legionella pneumophila</i> Stamm Philadelphia	TUMLeg1
<i>Salmonella choleraesuis</i>	DSM 10062
<i>Salmonella eastborne</i>	IMVWII38
<i>Salmonella eastborne</i>	IMVWII58
<i>Salmonella enterica</i> Unterart I <i>enterica</i>	TUMSal1
<i>Salmonella enterica</i> Unterart II <i>salamae</i>	TUMSal2
<i>Salmonella enterica</i> Unterart IIIa <i>arizonae</i>	TUMSal3
<i>Salmonella enterica</i> Unterart IIIb <i>diarizonae</i>	TUMSal4
<i>Salmonella enterica</i> Unterart IV <i>houtenae</i>	TUMSal5
<i>Salmonella enterica</i> Unterart V <i>bongori</i>	TUMSal6
<i>Salmonella enterica</i> Unterart VI <i>indica</i>	TUMSal7
<i>Salmonella enteritidis</i>	IMVWV79
<i>Salmonella typhimurium</i>	ATCC14028
<i>Salmonella typhimurium</i>	ATCC14028
<i>Salmonella typhimurium</i> LT2	TUMSal8
<i>Salmonella. enteritidis</i>	IMVWV-80
<i>Salmonella. infantis</i>	IMVWII41
<i>Shewanella alga</i>	LMG2265

Abkürzungen:

ATCC	American Type Culture Collection, Rockville, USA
DSM	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig
SLCC	Special <i>Listeria</i> Culture Collection, Würzburg
TUM	Technische Universität München, Lehrstuhl für Mikrobiologie
IMVW	Institut für Milchhygiene und Milchtechnologie, Veterinärmedizinische Universität Wien
NCTC	National collection of type cultures; London; England
LMG	Laboratorium voor Microbiologie, Universiteit Gent, Belgien

Tabelle B.2.: Verwendete Plasmide.

PLASMID	RELEVANTE EIGENSCHAFTEN	HERKUNFT
PCR TM 2.1 (3,9 kb)	3'-terminale Thymidinüberhänge, Amp ^r , Kan ^r , F1 ori, ColE1 ori, lacZ α , T7 Promotor, M13 vorwärts Primer, M13 rückwärts Primer, Schnittstellen für folgende Restriktionsendonukleasen: Hind III, Kpn I, Sac I, BamH I, Spe I, BsfX I, EcoR I, EcoR V, Not I, Ava I, Xho I, Nsi I, Xba I, Apa I	<i>in vitro</i> gen, San Diego, California, USA
pactA-GFP	GFP unter Kontrolle des actA Promotors	Bubert, 1999
pSOD-GFP	GFP unter der Kontrolle des SOD Promotors	Bubert, 1999

B.1.3.: Nährmedien, Anzucht, Isolierung, Stammhaltung, Antibiotika und Zellernte

B.1.3.1.: Nährmedien zur Anzucht der verwendeten Referenzstämme

Alle Organismen wurden mit den in den entsprechenden Katalogen der Stammsammlungen aufgeführten Medien kultiviert. Die Nährmedien wurden in einem Wasserdampf-hochdruckautoklaven für 20 min bei 121°C und $1,013 \times 10^5$ Pa Überdruck sterilisiert. Die Verfestigung von Nährmedien erfolgte durch Zugabe von 15 g/l Agar (Gibco-BRL, Eggenstein, BRD). Abweichende Vorgehensweisen sind gesondert vermerkt. Alle Nährmedien, die Acriflavin (s.u.) enthalten, wurden möglichst im Dunkeln gelagert, da aus Acriflavin bei Lichteinwirkung Inhibitoren gebildet werden können, die das Wachstum der Organismen hemmen. Ebenso wurde mit allen anderen Medien verfahren, die lichtempfindliche Komponenten, wie z. B. Tetracyclin, enthalten.

Brain-Heart-Infusion Medium (DIFCO, Bacto BHI) oder Hirn-Herz Boullion (Merck, Darmstadt, BRD)

BHI Fertigmedium	37,0 g
H ₂ O _{dest.} ad	1 l

Luria-Bertani-Medium (LB-Medium)

Trypton	10,0 g
Natriumchlorid	5,0 g
Hefeextrakt	5,0 g
H ₂ O _{dest.} ad	1 l
pH 7,0-7,5	

Columbia-Agar-Basis

Spezialpepton	23,0 g
Stärke	1,0 g
Natriumchlorid	5,0 g
Agar	10,0 g
pH 7,3 ± 0,2	

Listeria-Anreicherungslösung-gepuffert

Caseinpepton-Sojamehlpepton-Lösung	30,0 g
Hefeextrakt	6,0 g
Kaliumdihydrogenphosphat	1,35 g
Di-Natriumhydrogenphosphat	9,6 g
H ₂ O _{dest.} ad	1 l
pH 7,0-7,5	
Sterilisierung für 15 min bei 121°C !	

Selektivsupplement zu „Listeria-Anreicherungslösung-gepuffert“

Nalidixinsäure	20,0 mg
Cycloheximid	25,0 mg
Acriflavin-Hydrochlorid	7,5 mg

Die Komponenten in 2 ml EtOH_{70 %} lösen. Supplement aseptisch zu 500 ml steriler, auf 50°C abgekühlter „Listeria Anreicherungslösung, gepuffert“ geben.

FRASER-Anreicherungbouillon

Proteose-Pepton	5,0 g
Caseinpepton	5,0 g
Fleischextrakt	5,0 g
Hefeextrakt	5,0 g
Natriumchlorid	20,0 g
Dinatriumhydrogenphosphat	12,0 g
Kaliumdihydrogenphosphat	1,35 g
Äsculin	1,0 g
Lithiumchlorid	3,0 g
H ₂ O _{dest.} ad	1 l
pH 7,2 ± 0,2	
Sterilisierung für 15 min bei 121°C !	

Selektivsupplement zu „FRASER-Anreicherungbouillon“

Eisen-(III)-ammoniumcitrat	250,0 mg
Nalidixinsäure	10,0 mg
Acriflavin-Hydrochlorid	12,5 mg

Die Komponenten in 5 ml EtOH₅₀ % lösen. Supplement aseptisch zu 500 ml steriler, auf 50°C abgekühlter „FRASER“-Anreicherungbouillon geben.

OXFORD-Selektivnährboden

Columbia-Agar-Basis	39,0 g
Äsculin	1,0 g
Eisen-(III)-ammoniumcitrat	0,5 g
Lithiumchlorid	15,0 g
H ₂ O _{dest.} ad	1 l
pH 7,0 ± 0,2	
Sterilisierung für 15 min bei 121°C !	

Selektivsupplement zu „OXFORD-Selektivnährboden“

Cycloheximid	200,0 mg
Colistinsulfat	10,0 mg
Acriflavin	2,5 mg
Cefotetan	1,0 mg
Fosfomycin	5,0 mg

Die Komponenten in 5 ml EtOH₇₀ % lösen. Supplement aseptisch zu 500 ml sterilem, auf 50°C abgekühlten „OXFORD-Selektivnährboden“ geben.

PALCAM-Selektivnährboden

Columbia-Agar-Basis	39,0 g
Hefeextrakt	3,0 g
Glucose	0,5 g
Äsculin	0,8 g
Eisen-(III)-ammoniumcitrat	0,5 g
Mannit	10,0 g
Phenolrot	0,08 g
Lithiumchlorid	15,0 g
H ₂ O _{dest.} ad	1 l
pH 7,2 ± 0,2	
Sterilisierung für 15 min bei 121°C !	

Selektivsupplement zu „PALCAM-Selektivnährboden“

Polymyxin-B	5,0 mg
Acriflavin-Hydrochlorid	2,5 mg
Ceftazidim	10,0 mg

Die Komponenten in 2 ml sterilem H₂O_{reinst} lösen. Supplement aseptisch zu 500 ml sterilem, auf 50°C abgekühlten „PALCAM-Selektivnährboden“ geben.

Peptonwasser, gepuffert

Pepton aus Fleisch	10,0 g
Natriumchlorid	5,0 g
Dinatriumhydrogenphosphat	3,5 g
Kaliumdihydrogenphosphat	1,5 g
pH 7,2 ± 0,2	

Fertig gemischtes Medium in 1 l H₂O_{dest.} suspendieren und unter Rühren lösen. Zu je 225 ml aliquotieren.

Rappaport-Vassiliadis-Boullion

Sojapepton	5,0 g
Natriumchlorid	8,0 g
Kaliumdihydrogenphosphat	1,6 g
Magnesiumchlorid x 6 H ₂ O	40,0 g
Malachitgrün	0,04 g
Agar	12,5 g
H ₂ O _{dest.} ad	1 l
pH 5,2 ± 0,2	

Fertig gemischtes Medium in 1l H₂O_{dest.} suspendieren und unter Rühren und Erhitzen auf 50°C lösen. Je 10 ml Volumen in Endgefäße abfüllen und 15 min bei 121°C sterilisieren.

MRSV-Nährboden (modifizierter-semisolid-Rappaport-Vassiliadis-Nährboden)

Tryptose	4,59 g
Casein-Hydrolysat	4,59 g
Natriumchlorid	7,34 g
Kaliumdihydrogenphosphat	1,47 g
Magnesiumchlorid, wasserfrei	10,93 g
Malachitgrün	0,037 g
Agar	2,7 g
pH 5,2 ± 0,2	

XLD-Agar (Xylose-Lysin-Desoxycholat-Agar)

Hefeextrakt	3,0 g
Lysin	5,0 g
Xylose	3,75 g
Lactose	7,5 g
Saccharose	7,5 g
Natriumdesoxycholat	1,0 g
Natriumchlorid	5,0 g
Natriumthiosulfat	6,8 g
Eisen-(III)-ammoniumcitrat	0,8 g
Phenolrot	0,08 g
Agar	12,5 g
H ₂ O _{dest.} ad	1 l
pH 7,4 ± 0,2	

Fertig gemischtes Medium in 1l H₂O_{dest.} suspendieren und unter Rühren durch Erwärmen auf 50°C lösen. Nicht autoklavieren.

BPLS-Agar (Brillantgrün-Phenolrot-Lactose-Saccharose-Agar)

Proteose-Pepton	10,0 g
Hefeextrakt	3,0 g
Lactose	10,0 g
Saccharose	10,0 g
Natriumchlorid	5,0 g
Phenolrot	0,08 g
Brillantgrün	12,5 mg
Agar	12,0 g
H ₂ O _{dest.} ad	1 l
pH 6,9 ± 0,2	
Sterilisierung für 15 min bei 121°C !	

Fertig gemischtes Medium in 1 l H₂O_{dest.} suspendieren und unter Rühren durch Erwärmen auf 50°C lösen.

3,5 x SMHEM Medium

Saccharose	352,9 g
MgCl ₂	0,71 g
HEPES	1,67 g
H ₂ O _{dest.} ad	1 l
pH 7,2	

B.1.3.2.: Anzucht der Organismen

Aerob wachsende Mikroorganismen wurden bei der jeweiligen optimalen Wachstumstemperatur in 100 ml Erlenmeyerkolben mit 50 ml Flüssigmedium oder in Reagenzgläsern mit 5 oder 10 ml Flüssigmedium mit Belüftung auf einem Rundschüttler (Infors, Basel, CH) bei 150-200 rpm oder auf verfestigten Nährmedien in Petrischalen angezogen.

Mikroaerophil wachsende Stämme wurden bei der jeweiligen optimalen Wachstumstemperatur in Flüssigkultur ohne Belüftung oder auf Nähragar in einem Anaerobiertopf bei reduzierter Gasatmosphäre angezogen (Oxoid-Campy-gen, Wesel, Dk).

B.1.3.3.: Isolierung von Listerien aus Umweltproben

Zur Isolierung von Listerien wurden 25 g Probe aseptisch in 225 ml „*Listeria-Anreicherungs-lösung-gepuffert*“ mit Selektivsupplement [B.1.3.1.] überführt. Der Ansatz wurde homogenisiert und anschließend bei 30°C inkubiert. Nach 24, 48 h und 7 d wurden Subkulturen in „*Fraser-Anreicherungsbouillon*“ mit Selektivsupplement [B.1.3.1.] angelegt. Dazu wurden 100 µl der Primäranreicherung in 10 ml „*Fraser-Anreicherungsbouillon*“ mit Selektivsupplement überführt und aerob bei 37°C für 24 h bebrütet. Eine Schwarzfärbung des Mediums ist als positiv zu bewerten. Alle Listerien hydrolysieren Äsculin zu Äsculetin und Glucose. Äsculetin bildet mit den vorhandenen Eisen-(III)-Ionen schwarze Präzipitate und fördert darüber hinaus das Wachstum von *L. monocytogenes*. Lithiumchlorid ist Bestandteil des Mediums, da es das Wachstum von Enterococccen hemmt, die ebenfalls Äsculin hydrolysieren können und somit zu einem falsch positiven Signal führen könnten. Kulturen die nach 48 h keine Schwarzfärbung der „*Fraser-Anreicherungsbouillon*“ mit Selektivsupplement zeigen können als frei von Listerien betrachtet werden. Nach dem sekundären Anreicherung wurde je eine Impföse auf „PALCAM“-Selektivnährboden mit Selektivsupplement [B.1.3.1.] und „OXFORD“-Selektivnährboden mit Selektivsupplement [B.1.3.1.] ausgestrichen und bei 30°C bzw. 37°C bebrütet. Die Wirkungsweise der im „OXFORD“- und „PALCAM“-Nährböden enthaltenen Antibiotika und Selektivsupplemente kann in den Nährmedienkatalogen nachgelesen werden (z.B. Oxoid Nährbodenhandbuch).

B.1.3.4.: Isolierung von Salmonellen aus Umweltproben

Zur Überprüfung der An- bzw. Abwesenheit von Salmonellen liegen gesetzliche Richtlinien vor. (z.B. LAGA M10 [Müllhandbuch 6856], DIN 38414, DEV S13, Stand 3/92). Das Vorhandensein von Salmonellen wird dabei mit klassischen mikrobiologischen Methoden durch Anreicherung auf nicht-selektiven und selektiven Medien, anschließender biochemischer Differenzierung und Serotypisierung, geprüft. Zur Isolierung von Salmonellen wurden 25 Probenmaterial aseptisch in 225 ml „*Peptonwasser gepuffert*“ [B.1.3.1.] überführt und der Ansatz für 30 min bei 37°C geschüttelt. Nach gründlicher Resuspendierung des Probenmaterials wurden die Ansätze 16-20 h bei 37°C ohne schütteln inkubiert. Nach dieser Voranreicherung wurde die Suspension erneut gründlich aufgeschüttelt und eine Subkultur von 100 µl in 10 ml „*Rappaport-Vassiliadis-Bouillon*“ oder „*modifizierten-halbfesten-Rappaport-Vassiliadis*“ -Nährboden (MSRV) [B.1.3.1.] in vier Parallelen angelegt. Zwei

Parallelen wurden anschließend 24 h bei 37°C, die anderen beiden 24 h bei 43°C inkubiert. Danach wurden die Proben aufgeschüttelt und aus jeder Parallele jeweils eine Impföse auf BPLS-Agar und XLD-Agar [B.1.3.1.] ausgestrichen. Die Nährböden wurden anschließend bei 24 h bei 37°C aerob bebrütet. Auf BPLS-Agar ergaben *Salmonella* verdächtige Isolate rosa gefärbte Kolonien, da *Salmonellen* Lactose- und Saccharose negativ sind und somit keine Verfärbung über Ansäuerung hervorrufen. *Salmonella* verdächtige Kolonien ergaben auf XLD-Agar rosa Kolonien mit einem schwarzen Zentrum, da *Salmonellen* die Zucker nicht vergären können, aber Schwefelwasserstoff freisetzen. Von beiden Nährböden wurden „*Salmonella*-verdächtige“ Kolonien abgeimpft und biochemisch mit dem Testsystem API-20E der Firma Bio Merieux (Nürtingen, BRD) differenziert. Ergaben die abgelesenen Testresultate, daß es sich um *Salmonellen* handelt wurden diese vom Nationalen veterinärmedizinischen Referenzlabor für *Salmonellen* in Berlin serotypisiert. Als Positivkontrolle in allen Versuchen diente der Stamm *Salmonella choleraesuis* ssp. *choleraesuis* DSM10062 (vormals *Salmonella senftenberg*).

B.1.3.5.: Stammhaltung und Zellernte

Von allen Stämmen wurden zur langfristigen Stammhaltung Glycerinkulturen angelegt, die bei -80°C gelagert wurden. Dazu wurden die Organismen bis zur Mitte der logarithmischen Wachstumsphase angezogen, 10 min bei 5.000 rpm zentrifugiert, zweimal mit 1 x PBS/Glycerol (4:1) gewaschen und in einem geeigneten Volumen sterilem 1 x PBS /Glycerol (4:1) aufgenommen.

Zur Wiederanzucht wurden die Organismen auf dem jeweiligen Nährmedium mit einer sterilen 1 ml Glaspipette ausgestrichen und nach dem Anwachsen mit einer sterilen Impföse vereinzelt. *Listeria*-Stämme wurden zur Unterdrückung möglicher Kontaminationen aus der Glycerinkultur auf „OXFORD“ Selektivnährboden mit Selektivsupplement [B.1.3.1.] ausgestrichen und anschließend auf BHI Nähragar vereinzelt. Zur Anzucht größerer Zellmengen wurde je eine Kolonie in 5 ml sterilem BHI Flüssigmedium überimpft und über Nacht bei 37°C aerob inkubiert. Daraufhin wurden 50 ml BHI Flüssigmedium mit 2 ml der Vorkultur beimpft. Die Hauptkultur wurde dann bis zur gewünschten optischen Dichte [B.1.3.8.] angezogen.

Salmonella Stämme wurden ebenfalls zur Unterdrückung möglicher Kontaminationen aus der Glycerinkultur zuerst auf XLD-Selektivagar [B.1.3.1.] angezogen. Positive Kolonien wurden

dann auf LB-Medium vereinzelt. Zur Anzucht von Salmonellen in Flüssigkulturen wurde ebenfalls je eine Kolonie in 5 ml LB-Medium überführt.

Alle Organismen in Flüssigkultur wurden während der logarithmischen Wachstumsphase (OD₆₀₀ 0,4-1,0) geerntet (2 ml ERG bei 14.000 x g, 4°C, Bachhofer, Reutlingen, BRD, größere Volumina bei 5.000 rpm, 4°C, Sorvall[®]RC-3B und Sorvall[®]RC-5B refrigerated centrifuges, Du Pont Instruments, Bad Nauheim, BRD) und 1-2 mal mit 1 x PBS [B.1.1.] gewaschen.

B.1.3.6.: Antibiotika

Für die Anzucht plasmidhaltiger *E. coli* Stämme unter Selektionsdruck wurde Ampicillin in einer Endkonzentration von 100 µg/ml als Hemmstoff verwendet. Das in Pulverform bezogene Natrium-Salz des Ampicillins wurde bei 4°C, die Ampicillinstammlösung (100 mg/ml [1:1 H₂O_{reinst}:EtOH_{abs}]) bei -20°C gelagert. Plasmidhaltige *Listeria* Stämme wurden mit Tetracyclin als Selektionsagens angezogen. Das Antibiotikum wurde in einer Endkonzentration von 7,5 µg/ml im Medium verwendet. Das pulverförmige Tetracyclin wurde bei 4°C, die Tetracyclinstammlösung (7,5 mg/ml [1:1 H₂O_{reinst}:EtOH_{abs}]) bei -20°C gelagert. Die Hemmstofflösungen wurden dem jeweiligen Medium nach dem Autoklavieren unter sterilen Bedingungen bei einer Temperatur von etwa 50°C zugegeben. Mit Antibiotikum versehene, verfestigte Medien wurden bei 4°C gelagert und bis 3 Wochen nach der Medienbereitung verwendet. Flüssigmedien wurden jeweils frisch aseptisch mit der jeweiligen Hemmstofflösung versetzt.

Tabelle B.3.: Verwendete Antibiotika und Hemmstoffe

ANTIBIOTIKUM/ HEMMSTOFF	WIRKUNGSWEISE	LÖSUNGSMITTEL
Ampicillin	Hemmung der Mureinbiosynthese	EtOH ₅₀ %
Cefotetan	β-Lactam Antibiotikum, Cephalosporine	EtOH ₇₀ %
Ceftazidim	β-Lactam Antibiotikum, Cephalosporine	H ₂ O _{reinst}
Colistinsulfat	Polypeptidantibiotikum gegen gramnegative Keime	EtOH ₇₀ %
Cycloheximid	Hemmung der Proteinbiosynthese bei Eucaryoten	EtOH ₇₀ %
Fosfomycin	Inhibitor der Zellwandbiosynthese	EtOH ₇₀ %
Nalidixinsäure	Hemmung der DNA Synthese (DNS Gyrase Hemmer)	EtOH ₅₀ %
Polymyxin-B	Porenbildner in der Zellmembran	H ₂ O _{reinst}
Tetracyclin	Hemmung der Proteinbiosynthese	EtOH ₅₀ %

B.1.3.8.: Bestimmung der optischen Dichte von Bakterienkulturen

Die optische Dichte (OD) der Bakterienkulturen wurde in Kunststoffküvetten im Spektralphotometer (Beckmann DU 650, München) bei einer Wellenlänge von 450 und 600 nm gemessen. Der jeweilige Blindwert wurde durch eine Messung mit dem entsprechenden sterilen Medium ermittelt.

B.1.4.: Zellfixierungen

B.1.4.1.: Zellfixierung mit Paraformaldehydlösung

4 % Paraformaldehydlösung (Amann et al., 1990)

33 ml H₂O_{reinst} wurden auf 60-65 °C erhitzt und nach Zugabe von 2-3 g Paraformaldehyd tropfenweise mit 10 N NaOH versetzt bis sich die Lösung aufgeklärt hat. Nach Zugabe von 16,6 ml 3 x PBS wurde die Lösung auf ca. 20°C abgekühlt und der pH Wert auf 7,2-7,4 eingestellt. Die Lösung wurde steril filtriert (0,22 oder 0,45 µm Porengröße, Millipore, Eschborn) und war bei -20°C gelagert einige Tage haltbar.

Frisch hergestellte 4 % Paraformaldehydlösung wurde im Verhältnis 3:1 mit Zellsuspension vermischt und bis zu 16 h bei 4°C inkubiert. Die Suspension wurde 5 min zentrifugiert (14.000 x g, 4°C, Bachhofer, Reutlingen). Sedimentierte, fixierte Zellen wurden danach zweimal mit 1 x PBS-Lösung gewaschen und mit 1 x PBS/EtOH_{abs} [1:1] aufgenommen. Die fixierten Zellen wurden bei -20°C gelagert.

B.1.4.2.: Zellfixierung mit Ethanol

25 ml der Zellsuspension wurden mit 25 ml EtOH_{abs} versetzt, gemischt und mindestens 3 h bis ÜN bei 4°C gelagert. Nach Zentrifugation wurde der Ansatz zweimal mit 1 x PBS Lösung gewaschen, in 1 x PBS : EtOH_{abs} [1:1] aufgenommen und bei -20°C gelagert.

B.1.5.: Isolierung von Nukleinsäuren

B.1.5.1.: Isolierung von chromosomaler DNS aus *Listeria* Zellen

Reine, hochmolekulare DNS wurde mit dieser, zur DNS Extraktion aus *Listeria* Zellen optimierten Methode gewonnen. Dazu wurden 2 ml einer logarithmischen Kultur in ein steriles 2 ml-ERG überführt, abzentrifugiert (14,000 x g, 4°C, Bachofer) und einmal mit 500 µl 1 x PBS-Puffer gewaschen. Nach Resuspendierung der Zellen in 500 µl H₂O_{reinst} und Zugabe von 25 µl Lysozym-Lösung (10 mg/ml) wurde der Ansatz bei 37°C bis zur Zelllyse inkubiert. Um RNS aus der Nukleinsäurelösung zu entfernen, wurden 2,5 µl DNase-freie RNase (100 mg/ml, QIAGEN, Hilden) zum Ansatz pipettiert und dieser für 10 min bei 37°C inkubiert. Es folgten die Zugabe von 25 µl Proteinase-K-Lösung (10 mg/ml) und ein Inkubationsschritt für 20 min bei 50°C. Zur Extraktion von Proteinen wurden 600 µl Roti[®]-Phenol-Lösung zugegeben und der Ansatz gründlich gemischt. Nach Zentrifugation für 10 min bei 4°C wurde die obere, nukleinsäurehaltige Phase in ein neues ERG überführt und mit 1 Vol. Roti[®]-Phenol-Chloroform-Lösung extrahiert. Es wurde erneut zentrifugiert und die obere Phase in ein neues, steriles ERG überführt. Die DNS wurde durch Zugabe von 1/9 Vol. 3 M Natriumacetat pH 5,2 und 2,5 Vol. EtOH_{abs.} durch Inkubation für 1 h bei -20°C aus der Lösung präzipitiert. Nach Sedimentation der Nukleinsäuren für 15 min bei 14,000 x g und 4°C, wurde die DNS mit EtOH_{70 %} gewaschen und in 50 – 100 µl H₂O_{reinst} oder TE-Puffer aufgenommen.

B.1.5.2.: Isolierung chromosomaler DNS mit dem QIAGEN „DNeasy Tissue Kit“

Zur Isolierung hochmolekularer chromosomaler DNS wurde auch das „DNeasy-Tissue“-Kit (QIAGEN, Hilden, BRD) verwendet. Die DNS Extraktion wurde gemäß den Herstellerangaben durchgeführt. Der Zellaufschluß erfolgte dabei mittels enzymatische Lyse durch Lysozym, die Reinigung der chromosomalen DNS durch Säulenchromatographie. Das Vorgehen für die Isolierung wurde dem beigelegten Handbuch entnommen.

Die Konzentration und Qualität der isolierten chromosomalen DNS wurde nach [B.1.6.] bestimmt. Die DNS wurde einer Konzentration von 100 ng/µl zu 50 µl aliquotiert und bei -20°C gelagert. Einmal aufgetaut wurde die DNS bei 4°C gelagert.

B.1.5.3.: Isolierung von Plasmid DNS mit dem „QIAprep“ Plasmid Isolierungs Kit

Zur Plasmidisolierung wurde auch der „QIAprep“ Spin Plasmid Isolierungskit (QIAGEN, Hilden, BRD) verwendet. Der Zellaufschluß basiert hier auf dem Prinzip der alkalischen Lyse, die Reinigung der Plasmid DNS auf dem Prinzip der Reinigung durch Säulenchromatographie. Das Vorgehen für die Isolierung wurde dem beigelegten Handbuch entnommen. Mit dieser Methode konnte Plasmid DNS stets in hoher Ausbeute und sehr rein isoliert werden.

B.1.6.: Quantitative und qualitative Untersuchung der Nukleinsäurelösungen

B.1.6.1.: Photometrische Konzentrationsbestimmung der Nukleinsäurelösungen

Zur Konzentrationsbestimmung der Nukleinsäurelösungen (Clark und Swika, 1977) wurde ein geeignetes Aliquot der Nukleinsäurelösung mit H_2O_{reinst} verdünnt und in einem Spektralphotometer (Beckmann DU 650, München, BRD) vermessen. Für die Konzentrationsberechnungen von Nukleinsäurelösungen gelten in Näherung folgende Zusammenhänge (Cryer *et al.*, 1975).

doppelsträngige (ds) DNS:	1 OD _{260 nm} entspricht \cong 50 $\mu\text{g/ml}$
einzelsträngige (ss) RNS:	1 OD _{260 nm} entspricht \cong 37 $\mu\text{g/ml}$
einzelsträngige (ss) DNS:	1 OD _{260 nm} entspricht \cong 20 $\mu\text{g/ml}$

Verunreinigungen der Nukleinsäurelösungen können durch Bestimmen der Extinktionen bei 230, 260 und 280 nm bestimmt werden, indem man die Quotienten E_{260}/E_{280} und E_{260}/E_{230} bildet. Für eine hinreichende Reinheit der isolierten Nukleinsäuren gelten dabei folgende Richtwerte (Marmur, 1961, Sambrook *et al.*, 1989).

$$E_{260}/E_{280} \geq 1,8$$
$$E_{260}/E_{230} \geq 2,2$$

B.1.6.2.: Qualitative Analyse der Nukleinsäurelösungen

Zur qualitativen Analyse der einzelnen Nukleinsäurepräparationen wurde eine horizontale Agarosegelelektrophorese durchgeführt. Hierbei wurden die Nukleinsäuren in einem

elektrischen Feld in einer Agarosematrix (meist 1% Agarosegel in 1 x TAE-Puffer) aufgetrennt. Als Längenstandard diente die 75 bp-12,2 kb DNS Leiter (Roche, Mannheim). Die Auftrennung der Nukleinsäuren erfolgt bei einer Stromstärke von etwa 130 mA und bei maximal 150 V Spannung. Nach Beendigung des Laufs wurde das Gel in eine Färbewanne mit 500 ml H₂O_{dest} und 50 µl EtBr-Stammlösung überführt. Nach 20-30 min Färben wurde das Gel in eine Wanne mit H₂O_{dest.} überführt und für ca. 15 min gewässert. Die Dokumentation der aufgetrennten Nukleinsäuren erfolgte mit einem Videodokumentationssystem unter UV Durchstrahlung (302 nm) und mit dem dazugehörigen „Image Capture“ Computer.

B.1.7.: Isolierung und Reinigung von DNS-Fragmenten aus Agarosegelen

Für die Isolierung von DNS Fragmenten aus Agarosegelen wurde das „QIAex“ Gel Extraktion Kit (QIAGEN, Hilden) oder DNS Gel Extraktions Kit (Roche, Mannheim, BRD) verwendet. Dabei wurde die DNS durch vorübergehende, selektive Bindung an einer Silika-Matrix von störenden Bestandteilen wie Proteinen, Salzen usw. abgetrennt. Die DNS wurde mit EtBr-Lösung nur kurz angefärbt und die DNS enthaltenden Gelstücke während UV-Bestrahlung mit einer Wellenlänge von 302 nm mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten. Die Extraktion der DNS aus den Agarose-Gelstücken erfolgte nach Angaben des Herstellers.

B.1.8.: Enzymatische Behandlung von DNS-Molekülen

B.1.8.1.: Hydrolyse von DNS mit Restriktionsenzymen

Restriktionsendonukleasen vom Typ II erkennen spezifisch palindromische Tetra- bis Oktanukleotidsequenzen und hydrolysieren die DNS innerhalb dieser Erkennungssequenzen (Arber, 1978). Dabei entstehen entweder glatte- („*blunt-ends*“) oder 5'- bzw. 3'-überstehende („*sticky-ends*“) Enden entstehen. Für die Restriktion von DNS wurden die Ansätze nach Herstellerangaben mit dem Restriktionsenzym und dem mitgelieferten Puffer versetzt und bei den angegebenen Temperaturen und inkubiert. Die Überprüfung des Restriktionsverbaus erfolgte mittels einer horizontalen Agarosegelelektrophorese, bei der jeweils ungeschnittene neben geschnittener DNS aufgetragen wurde.

B.1.8.2.: Verknüpfen von DNS Molekülen mit T4-DNS-Ligase

Die T4-DNS-Ligase katalysiert die ATP abhängige Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen 3'-Hydroxy- und 5'-Phosphat-Enden von doppelsträngigen DNS Molekülen (Weiss *et al.*, 1968). Die Ligationsreaktion wurde mit dem vom Hersteller mitgelieferten Puffersystem nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

B.1.8.3.: Enzymatische Verlängerung von Oligonukleotiden mit Terminaler Transferase

Für die enzymatische 3'-Verlängerung von Oligonukleotiden um ein Didesoxynukleotid wurde in der vorliegenden Arbeit die Reaktion mit Terminaler Transferase (Roche, Mannheim) benutzt. Diese 3'-dd-Oligonukleotide wurden in der kompetitiven PCR [B.1.10.3.2.] eingesetzt.

Reaktionsansatz

Oligonukelotid	100 pmol
„ <i>Tailing-buffer</i> “	4 µl
CoCl ₂	4 µl
ddNTP	1 µl
Terminale Transferase (25u/µl)	1 µl
H ₂ O _{reinst} ad	20 µl

Der Reaktionsansatz wurde vorsichtig gemischt, 15 min bei 37°C inkubiert und anschließend sofort auf Eis gestellt. Zum Abstoppen der Reaktion wurde 2 µl Stopplösung (200 µl 0,2 M EDTA-Lösung, 1 µl Glycogen) und 2,5 µl 4 M LiCl zugegeben. Die Reaktionsprodukte wurden danach durch Zugabe von 75 µl EtOH_{abs.} und Inkubation ÜN bei -20°C aus der Lösung gefällt. Die Oligonukleotide wurden durch Zentrifugation (14.000 x g, 4°C, Bachofer) sedimentiert und anschließend mit 150 µl EtOH_{70 %} gewaschen. Die markierten Oligonukleotide wurden bei RT getrocknet, in 100 µl H₂O_{reinst} aufgenommen und bei -20°C gelagert.

B.1.9.: Transformation von Mikroorganismen

B.1.9.1.: Transformation von *Escherichia coli*

In der vorliegenden Arbeit wurden die Klonierungskits *TA Cloning*[®] *Kit* und *TOPO-TA Cloning*[®] *Kit* zur Klonierung von PCR Fragmenten verwendet (*in vitro* gen, Carlsbad, USA). Die Vektorsysteme pCR[™] 2.1 und TOPO-pCR[™] 2.1 wurden für die Transformation von *E. coli* INV α F' Zellen verwendet. Alle für die Transformation benötigten Lösungen und die kompetenten Zellen mit Ausnahme des verfestigten LB-Mediums waren im Klonierungskit enthalten. Die Ligation, Transformation und die Identifizierung rekombinanter Klone erfolgte nach Angaben des Herstellers.

B.1.9.2.: Transformation von *Listeria monocytogenes*

Mit einer ÜN Kultur der jeweiligen *Listeria* Kultur wurden 50 ml BHI Medium 1:25 beimpft. Dieser Ansatz wurde bis Anfang der logarithmischen Wachstumsphase aerob auf dem Rundschtüttler (180-200 rpm) inkubiert. Nach Zugabe von 25 μ l Penicillin-G-Lösung (5 mg/ml) wurde die Kultur weiter bis zur Mitte der logarithmischen Wachstumsphase inkubiert. Die Zellen wurden geerntet (5.000 x g, 4°C) und anschließend 2 x mit 3,5 x SMHEM Medium [B.1.3.1.] gewaschen, anschließend in 500 μ l 3,5 x SMHEM Medium gründlich resuspendiert und zu 250 μ l aliquotiert. Diese kompetenten *Listeria* Zellen wurden entweder sofort elektrotransformiert oder bei -80°C gelagert. In der vorliegenden Arbeit wurden *Listeria* Zellen mit den Plasmiden *pactA-GFP* und *psod-GFP* (Bubert *et al.*, 1999) transformiert. Dazu wurden zu den auf Eis gestellten kompetenten Zellen 5 μ l des jeweiligen Plasmids pipettiert. Dieser Ansatz wurde in eine gekühlte und trockene Elektroporationsküvette (EquiBio, Boughton Monchelsea, Kent, UK, Elektrodenabstand 2 mm) überführt. Nach Elektroporation der Plasmide (100 Ω , 2,25 kV, 25 μ F) für 3 s wurde der gesamte Ansatz mit 2 x 500 μ l sterilem BHI Medium in ein steriles ERG überführt. Die phänotypische Expression erfolgte durch 3 h Inkubation bei 37°C. Jeweils 180 μ l wurden daraufhin auf BHI^{Tet, 7,5}-Medium ausplattiert und bis zu 2 Tage bei 37°C aerob bebrütet. Einzelne Kolonien wurden gepickt und auf das Vorhandensein des Plasmids hin überprüft [B.1.5.4.].

B.1.10.: In vitro Amplifizierung von DNS mittels der Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

B.1.10.1.: Verwendete PCR Systeme

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Polymerasen und PCR Systeme sind in Tabelle [B.4.] zusammengefaßt.

Tabelle B.4.: Verwendete Polymerasen und PCR Systeme für die Durchführung der PCR

PCR SYSTEM	AKTIVITÄT	AUS ORGANISMUS	HERSTELLE R	U/ μ L
AmpliTaQ Gold	5'-3'-DNS Synthese 5'-3'-Exonukleaseaktivität	<i>Thermus aquaticus</i>	Perkin Elmer	5
Expand High Fidelity PCR System	5'-3'-DNS Synthese 5'-3'-Exonukleaseaktivität 3'-5'-Korrekturlesefunktion	<i>Thermus aquaticus</i> <i>Pyrococcus woesei</i>	Roche	3,5
Extensor Hi-Fidelity PCR Kit	5'-3'-DNS Synthese 5'-3'-Exonukleaseaktivität 3'-5'-Korrekturlesefunktion	<i>Thermus aquaticus</i> <i>Pyrococcus woesei</i>	Abgene	2,5
Long PCR Kit	5'-3'-DNS Synthese 5'-3'-Exonukleaseaktivität 3'-5'-Korrekturlesefunktion	<i>Thermus aquaticus</i> <i>Pyrococcus woesei</i>	Sawady	5
TaKaRa Ex Taq	5'-3'-DNS Synthese 5'-3'-Exonukleaseaktivität	<i>Thermus aquaticus</i>	TaKaRa	5
Taq DNA Polymerase in storage buffer B	5'-3'-DNS Synthese 5'-3'-Exonukleaseaktivität	<i>Thermus aquaticus</i>	Promega	5
Tfl DNA Polymerase	5'-3'-DNS Synthese 5'-3'-Exonukleaseaktivität	<i>Thermus flavus</i>	Promega	5
Thermo-Start™ DNA Polymerase	5'-3'-DNS Synthese 5'-3'-Exonukleaseaktivität	<i>Thermus aquaticus</i>	Abgene	5

B.1.10.2.: Verwendete Primer für die PCR

Alle in der vorliegenden Arbeit für PCR eingesetzten Oligonukleotide (Primer) wurden von MWG Biotech (Ebersberg, BRD) oder Interactiva (Ulm, BRD) synthetisiert und lyophilisiert bezogen. Nach Resuspendierung der Primer in H₂O_{reinst} wurde die Konzentration durch photometrische Vermessung bestimmt oder dem beigegeführten Datenblatt entnommen.

Verwendete Abkürzungen

V: „Vorwärts“- Primer, an den – Strang bindend
R: „Rückwärts“-Primer, an den + Strang bindend

M=A+C, R=A+G, W=A+T, S=G+C, Y=C+T, V=A+G+C, H=A+C+T, D=A+G+T, B=G+T+C, N=A+G+C+T, K=G+T

B.1.10.2.1.: 16S-rDNS spezifische Primer

Tabelle B.5.: 16S-rDNS spezifische Primer

Name	5'-3'Sequenz	Bindungsposition in <i>E. coli</i> (Brosius, 1981)
616-V	AGA-GTT-TGA-TYM-TGG-CTC-AG	16S 8-28
630-R	CAK-AAA-GGA-GGT-GAT-CC	16S 81528-1542
630-V	GGA-TCA-CCT-CCT-TTM-TG	16S 81528-1542
27-V	AGA-GTT-TGA-TCC-TGG-CTC-AG	16S 827-46
1492-R	GGT-TAC-CTT-GTT-ACG-ACT-T	16S 81492-1510

B.1.10.2.2.: 23S-rDNS spezifische Primer

Tabelle B.6.: 23S-rDNS spezifische Primer

Name	5'-3'Sequenz	Bindungsposition in <i>E. coli</i> (Brosius, 1981)
118V	TCY-GAA-TGG-GGN-AAC	115-130
118R	GTT-BCC-CCA-TTC-GCA	115-128
985R	CCG-GTC-CTC-TCG-TAC	2654-2669
1606-R	TGT-GTC-GGT-TTG-CGG-TAC	1606-1624
1370-V	ATA-GGC-GTA-GGC-GAT-GG	1370-1387

B.1.10.2.3.: 5S-rDNS spezifische Primer

Tabelle B.7.: 5S-rDNS spezifische Primer

Name	5'-3'Sequenz	Bindungsposition in <i>E. coli</i> (Brosius, 1981)
504R	SWG-TTC-GRV-AWG-GGA	35-50

B.1.10.2.4.: *Iap*-Gen spezifische Primer

Tabelle B.8.: *iap*-Gen spezifische Primer

Name	5'-3'Sequenz
<i>iap</i> -P-I-dd-II/III-V	TAC-TTA-ACT-GAC-AAA-GTA-G*
<i>iap</i> -P-I-dd-III-R	AGC-ATT-TGT-GTT-CGT-GTT-T*
<i>iap</i> -P-I-dd-II-R	ATT-CGT-ATT-GGA-GTT-TGT-ATT-A*
<i>iap</i> -P-II/III-dd-I-R	AGT-ATT-TGA-GTT-TGT-ATT-AGT-AT*
<i>iap</i> -P-II-dd-I/III-V	ACK-AAY-ACA-AAT-ACW-GCT-M*
<i>iap</i> -P-II-dd-III-R	TGT-GTT-CGT-GTT-TGT-ATT-TGT*
<i>iap</i> -P-III-dd-I/II-V	GAG-GTK-GCT-GCT-GCT-G*
<i>iap</i> -P-III-dd-II-R	GGA-GTT-TGT-ATT-AGT-ATT-GGT*
<i>iap</i> -P-III-R	ATT-CGT-ATT-AGT-ATT-TGA-GTT-TG
<i>iap</i> -P-III-V	TAC-TTA-ACT-GAC-AAA-GCA-GT
<i>iap</i> -P-II-R	GGA-GTT-TGT-ATT-AGT-ATT-GGT-A
<i>iap</i> -P-II-V	ACT-AAC-ACT-AAC-ACA-AAT-RC
<i>iap</i> -P-I-R	TGT-GTT-CGT-GTT-TGT-ATT-TGT-G
<i>iap</i> -P-I-V	AAT-GAG-GTC-GCT-AAA-ACA-G
<i>iap</i> -P-R	TTA-TAC-GCG-ACC-GAA-GCC-AA
<i>iap</i> -P-V	ATG-AAT-ATG-AAA-AAA-GCA-AC
<i>iap</i> -TN-R	TTT-TCC-AAG-GTG-TTT-TTG-AGC
<i>iap</i> -TN-V	TTC-TTC-TTC-AAT-TTA-TGT-AGG
MonoA	CAA-ACT-GCT-AAC-ACA-GCT-ACT
MonoB	GCA-CTT-GAA-TTG-CTG-TTA-TTG

B.1.10.2.5.: *PlcA*-Gen spezifische Primer

Tabelle B.9.: *plcA*-Gen spezifische Primer

Name	5'-3'Sequenz
<i>plcA</i> -V	ACC-AGG-TAC-ACA-TGA-ATA-CGA
<i>plcA</i> -R	CCG-AGG-TTG-CTC-GGA-GAT-AT

B.1.10.2.6.: Primer für „RAPD-PCR“

Tabelle B.10.: Verwendete Primer für die RAPD-PCR

Name	5'-3' Sequenz
UBC-127	ATC-TGG-CAG-C
HLWL-74	ACG-TAT-CTG-C
OPM-1	GTT-GGT-GGC-T

B.1.10.3.: PCR Techniken

B.1.10.3.1.: „Hot Start“-PCR

Bei dieser Variante der PCR, (Chou *et al.*, 1992) wird die DNS Polymerase erst nach erfolgter Denaturierung der „Template“-DNS in den Reaktionsansatz einpipettiert. Dadurch kann eine Amplifikationsreaktion durch unspezifische Bindung der Primer während der Aufheizphase des „Thermocyclers“ unterbunden werden. Zusätzlich wird eine ungewollte Verlängerung der Primer unterbunden, die sonst ebenfalls zu einer unspezifischen Bindung und somit zu unerwünschten Amplifikationsprodukten führen könnten.

Durch eine Modifizierung der „Hot-start-PCR“, der sogenannten „inversen-Hot-start-PCR“, kann auch die Amplifikation von DNS Kontaminationen unterbunden werden. Dabei wird der Amplifikationsansatz, der alle Komponenten außer der Template DNS enthält, mit DNase bei RT inkubiert (Rochelle *et al.*, 1992). Nach anschließender Inaktivierung der DNase durch 5 min Inkubation bei 95°C wird die Reaktion durch Zugabe der Template DNS gestartet.

B.1.10.3.2.: „Kompetitive“-PCR

Um die Spezifität einer PCR zu erhöhen bzw. um die Amplifikation der DNS von Nicht-Zielorganismen, die in ihrer Bindungsstelle nur eine geringe Anzahl von Basenfehlpaarungen zum jeweiligen Primer besitzen, zu unterbinden, wurde in der vorliegenden Arbeit und in einer im Arbeitskreis angefertigten Diplomarbeit (Walcher, 1999) die Methode der kompetitiven PCR entwickelt, die auf dem zusätzlichen Einsatz von Primern in der PCR beruht, die an ihrem 3'-Terminus eine Dideoxyribose tragen. Diese Primer werden so konstruiert, daß sie an die DNS-Abschnitte der Nicht-Zielorganismen binden. Durch die 3'-Dideoxygruppe können diese Primer durch die DNS-Polymerasen nicht mehr verlängert

werden und tragen somit dazu bei, die Bildung unspezifischer Amplifikationsprodukte zu unterbinden.

B.1.10.3.3.: „Nested“-PCR

Durch die „*nested-PCR*“-Variante kann die Spezifität und die Sensitivität einer PCR erhöht werden. Einer primären Amplifikation von DNS Abschnitten folgt eine sekundäre Amplifikation mit Primern, die ihre Bindungsstelle innerhalb des ersten Amplifikats besitzen. Wird bei der sekundären Amplifikation nur ein interner Primer verwendet, so spricht man von einer „*semi-nested-PCR*“.

B.1.10.3.4.: „Multiplex“-PCR

Wird in einer PCR mehr als ein Primerpaar zur Amplifikation bestimmter DNS Abschnitte gleichzeitig eingesetzt, spricht man von der sogenannten „*Multiplex PCR*“-Technik. Bei erfolgreichem Einsatz dieser PCR Variante lassen sich in einer Reaktion mehrere Gene oder Genabschnitte gleichzeitig amplifizieren und nachweisen. Diese Methode eignet sich daher besonders für diagnostische Zwecke.

B.1.10.3.5.: „Randomly-Amplified-Polymorphic-DNA“-PCR (RAPD-PCR)

Diese PCR Variante wird zur Subtypisierung von Stämmen einer Art oder zur Differenzierung und Charakterisierung von nah verwandten Organismen verwendet. Dabei wird nur ein Primer oder gleichzeitig mehrere Primer (Multiplex-RAPD-PCR) in die Reaktion eingesetzt. Als Primer werden stets Dekamere verwendet, die einen T_D -Wert von 50°C aufweisen. Durch die sehr unstringente „*Annealing*“-Temperatur von 30-37°C lagert sich der oder die Primer zufällig an verschiedene, komplementäre Bereiche im Chromosom an und werden im Elongationsschritt verlängert. Aus der zyklischen Amplifikation resultiert ein Bandenmuster, das spezifisch für die Stamuntercheidung sein kann und als „Fingerabdruck“ bezeichnet wird. Die in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Primer für die RAPD-PCR sind in [B.1.10.2.6.] aufgelistet, das verwendete Temperatur-Zeit Programm ist unten angegeben.

Primäre Denaturierung	94°C	1 min
45 Zyklen		
Denaturierung	94°C	30 s
Annealing	39°C	60 s
Elongation	72°C	2 min
Abschließende Elongation	72°C	10 min

B.1.10.4.: Standardansatz und Reaktionsprogramm für die Durchführung der PCR

B.1.10.4.1.: PCR in Glaskapillaren

Für die spezifische Amplifizierung von DNS wurde in der vorliegenden Arbeit unter anderem die sogenannte Kapillar-PCR-Technik (Rapid Cycler Idaho Technologies, Idaho Falls, USA) eingesetzt. Alle Reagentien und Glaskapillaren außer Primer und DNS-Polymerasen wurden von der Betreiberfirma bezogen.

Standardansatz für eine Reaktion:

10 x BSA	5,0 µl
10 x MgCl ₂ (20 mM)	5,0 µl
10 x Nukleotidmix (200µmol „each“)	5,0 µl
15 pmol P _V	1,0 µl
15 pmol P _R	1,0 µl
ad H ₂ O _{reinst}	50 µl
Polymerase	0,3 µl
DNS	100 ng

Der Reaktionsansatz wurde auf Eis in ein 1,5 ml ERG pipettiert und anschließend in eine 50 µl Glaskapillare überführt. Nach thermischer Versiegelung der Enden wurde die Kapillare in die Halterung des Thermocyclers eingesetzt. Nach Beendigung der Reaktion wurden die Glaskapillaren mit einem Glasschneider geöffnet und der Inhalt in ein 1,5 ml ERG überführt. Ein Aliquot von 5 µl wurde daraufhin durch horizontale Gelelektrophorese überprüft.

Kapillar PCR Standardprogramm

Primäre Denaturierung	94°C	1 min
30 Zyklen		
Denaturierung	94°C	30 s
Annealing	x°C	30 s
Elongation	72°C	x s
Abschließende Elongation	72°C	1 min

Slope 9,0

B.1.10.4.2.: PCR in Reaktionsgefäßen oder in Mikrotiterplatten

Als „*Thermocycler*“ für die PCR in 200 µl und 500 µl Reaktionsgefäßen und in Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen (Biozym V Boden) wurden in der vorliegenden Arbeit die Geräte PTC-100 (MJ-Research, Watertown, USA), Gradient Master Cycler (Eppendorf) und Primus-96 (MWG-Biotech) verwendet. Die Gradientenfunktion des Gradient Master Cycler erlaubte es neu konstruierte Primer bezüglich ihrer Annealingtemperatur zu optimieren.

Standardansatz für eine Reaktion:

10 x PCR-Puffer	5,0 µl
10 x MgCl ₂ (20-25 mM)	5 µl ^x
10 x Nukleotidmix (200 µmol)	5,0 µl
50 pmol P _V	1,0 µl
50 pmol P _R	1,0 µl
ad H ₂ O _{reinst}	50 µl ^{xx}
Polymerase	0,3 µl
DNS	100 ng

^x Die Konzentration an MgCl₂ im PCR-Ansatz wurde je nach benötigter Stringenz variiert.

^{xx} Bei anderen Gesamtvolumina der Reaktionsansätze (25 oder 100 µl) wurden die Volumina der jeweiligen Komponenten dem Standardreaktionsansatz angeglichen

B.1.10.5.: Verwendete Additive für die PCR

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Additive in die PCR eingesetzt, um die Amplifikation verschiedener DNS Abschnitte zu verbessern. Dimethylsulfoxid (DMSO) wurde eingesetzt, um zum einen die Ausbildung von Primerdimeren zu verringern und zum anderen, um etwaige Sekundärstrukturen in der Template-DNS, die eine erfolgreiche Amplifikation verhindern, aufzulösen. Tetramethylammoniumchlorid (TMAC) steigert bei geeigneter Reaktionsführung die Ausbeuten an Amplifikationsprodukt. Dabei hebt TMAC 2 H-Brücken-A-T Bindungen auf das energetische Niveau einer 3 H-Brücken-G-C-Bindung. Der Einsatz von bis zu 10 % (v/v) Glycerol in die PCR kann die Anlagerung der Primer verbessern.

B.1.10.6.: Aufreinigung von PCR Produkten

PCR Produkte wurden entweder nach horizontaler Agarosegelelektrophorese und Anfärben der DNS durch Ausschneiden interessierender Banden und Extraktion aus den Agaroseblöcken mit einem Gelextraktionskit [B.1.7.], oder direkt nach der Reaktion durch den „QIAquick“ PCR purification Kit (QIAGEN, Hilden) aufgereinigt und somit von störenden Mono-, Oligonukleotiden, Proteinen und unspezifischen PCR Amplifikaten befreit. Eine Überprüfung der aufgereinigten Produkte erfolgte erneut durch horizontale Agaroseelektrophorese.

B.1.11.: DNS Sequenzierung

Für die Sequenzierung von DNS wurde in der vorliegenden Arbeit eine automatische DNS Sequenziereinheit (LI-COR Longreader 4200, MWG-Biotech, Ebersberg) verwendet. Der Sequenzlauf wurde mit der Software „*Base ImageIR V 4.0*“ und „*V 4.2*“ gesteuert. Die Auswertung der Sequenzdaten erfolgte ebenfalls mit diesem Softwarepaket. Die nichtradioaktive Sequenzanalyse erfolgte nach dem „*Cycle Sequencing*“ Prinzip (Murray *et al.*, 1977).

B.1.11.1.: Verwendete Primer für die Sequenzierung

Die Markierung der Sequenzierprodukte erfolgte durch Verwendung von Fluoreszenzfarbstoff markierten Primern. Alle verwendeten Sequenzierprimer wurden von MWG Biotech (Ebersberg) bezogen und waren an ihrem 5'-Terminus mit einem im infraroten Bereich bei 800 nm absorbierenden Farbstoff (IRD₈₀₀) gekoppelt. Die Detektion erfolgte mittels eines Infrarotlasers.

Alle verwendeten Sequenzierprimer sind in Tabelle [B.11.] zusammengefaßt

Tabelle B.11.: Verwendete IRD₈₀₀ markierte Primer für die nichtradioaktive Sequenzierung

Name	Spezifität	5'-3' Sequenz
P100K-R-IR	16S rDNS	GTT-ACC-TTG-TTA-CGA-CTT
P611-V-IR	16S rDNS	CAT-GCA-AGT-CGA-ACG
1019IRry97	23S rDNS	TTC-GRR-GAG-AAC-CAG-CTA
1019Irvm97	23S rDNS	TAG-CTG-GTT-CTY-YCC-GAA
1037 Irrm97	23S rDNS	CTT-ACC-CGA-CAA-GGA-ATT-TCG
609-R-IR	16S rDNS	ACT-ACH-GGG-GTA-TCT-AA
609V-IR	16S rDNS	TTA-GAT-ACC-CCD-GTA-GT
630IrrMy98	16S rDNS	AAG-GAG-GTG-ATC-CA(R)-CC
699-R-IR	16S rDNS	AGG-GTT-GCG-CTC-GTT-GC
699-V-IR	16S rDNS	GCA-ACG-AGC-GCA-ACC-CT
992Irry97	23S rDNS	TTC-CCT-CAC-RGT-ACT
992IRvm97	23S rDNS	AGT-ACC-GTG-AGG-RAA
<i>iap</i> -R-IR	<i>iap</i> -Gen	GCC-AAC-TAG-ATA-TTT-ACC-CC
<i>iap</i> V-IR	<i>iap</i> -Gen	AAA-AAA-GCA-ACT-ATC-GCG-GC
M13-R(-29)-IR	Polylinker	CAG-GAA-ACA-GCT-ATG-ACC
M13-V(-20)-IR	Polylinker	TGT-AAA-ACG-ACG-GCC-AGT

Verwendete Abkürzungen: M=A+C, R=A+G, W=A+T, S=G+C, Y=C+T, V=A+G+C, H=A+C+T, D=A+G+T, B=G+T+C, N=A+G+C+T, K=G+T.

B.1.11.2.: Vorbereitung des Polyacrylamidgel und der Sequenzierereinheit

Sequenziergel

Harnstoff (Urea ultra pur)	21 g
H ₂ O _{reinst}	32 ml
Acrylamidstammlösung (Long Ranger™ gel solution, FMC Bioproducts, Rockland, Maine, USA)	4,3 ml
DMSO	500 µl
10 % (w/v) APS	350 µl
TEMED	50 µl

Durchführung

Die verwendeten Glasplatten (Länge 66 cm) wurden mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ und $\text{EtOH}_{96\%}$ gründlich gereinigt und mit einem Schallplattenreiniger von Staub befreit. Zur Erhöhung der Stabilität und Haftfähigkeit des Gels im Bereich des Vorkamms wurden beide Glasplatten silanisiert. Dafür wurden 165 μl Silanlösung und 5 μl 10 % Essigsäure aufgetropft und mit einem Stück Zellstoff in die Glasplatten eingerieben. Nach 15 min wurden die Platten erneut mit $\text{EtOH}_{96\%}$ gereinigt und von Staub befreit. Nach Anbringen der Abstandhalter wurden die Glasplatten mit Klammern fixiert und auf einen Gießtisch gelegt. Die fertige Sequenziergellösung wurde nun mit einer 50 ml Spritze mit aufgesetzten Sterilfilter (0,45 μm Porenweite, Gelman Sciences, Supor[®] Acrodisk[®] 25, Ann Arbor, USA) zwischen die Glasplatten gegossen und der Vorkamm fixiert. Nach erfolgter Polymerisation in horizontaler Lage (ca. 1 h) wurden die Glasplatten erneut gründlich gereinigt, getrocknet und in die Sequenziereinheit nach Herstellerangaben eingehängt.

Nachdem der obere und untere Puffertank mit insgesamt 1 l 0,8 x TBE versehen wurde, konnte der Stromkreis an der Sequenziereinheit geschlossen und der Vorlauf durch Anlegen einer Spannung von 2 kV gestartet werden. Dabei wurde das Gel und der Laufpuffer auf 45°C erwärmt und die Abtasteinheit und der Detektionslaser auf die Beschaffenheit des Gels und der Glasplatten hin optimal justiert.

B.1.11.3.: Sequenzierreaktion

In einer Mikrotiterplatte mit 96 Vertiefungen (Biozym, Oldendorf, BRD) wurde die zu sequenzierende DNS mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{reinst}}$ auf ein Volumen von 20 μl verdünnt. Zu dieser Lösung wurde 5 μl einer 1,25 pmol Lösung des jeweiligen IRD₈₀₀ markierten Sequenzierprimers gegeben. Jeweils 6 μl dieser Lösung wurden in 4 Vertiefungen der Mikrotiterplatte überführt in denen je 2 μl des jeweiligen Terminationsgemisches (je x 2 μl ddAtp^{mix}, ddCTP^{mix}, ddGTP^{mix} und ddTTP^{mix}) vorgelegt waren. Der Terminationsmix war bereits gebrauchsfertig im „*cycle-sequencing-kit*“ (Amersham Pharmacia, Freiburg, BRD) vorhanden. Dieser Ansatz wurde nun mit einer hitzestabilen Folie (Microseal[™] `A` Film, MJ Research, Watertown, USA) dicht abgeschlossen, in einen programmierbaren Thermocycler (PTC-100[™], MJ Research, Watertown) überführt und die Reaktion gestartet. Nach Beendigung der Programme wurde die Sequenzierreaktion durch Zugabe von 2,5 μl Stoppuffer abgebrochen. Für die

direkte Sequenzierung von PCR Produkten und die Sequenzierung von Plasmid-DNS wurden folgende Temperatur-Zeit-Zyklen verwendet.

Sequenzierung von Plasmid-DNS

Primäre Denaturierung	94°C	5 min
<hr/>		
25 Zyklen		
Denaturierung	94°C	30 s
Annealing	60°C	30 s
<hr/>		
Abschließende Elongation	72°C	5 min

Direktsequenzierung von 16S- und 23S-rDNA Amplifikaten

Primäre Denaturierung	94°C	5 min
<hr/>		
25 Zyklen		
Denaturierung	94°C	30 s
Annealing	45°C	30 s
<hr/>		
Abschließende Elongation	72°C	5 min

Direktsequenzierung von *iap*-Gen Amplifikaten

Primäre Denaturierung	94°C	4 min
<hr/>		
25 Zyklen		
Denaturierung	94°C	25 s
Annealing	50°C	25 s
Elongation	68°C	35s
<hr/>		
15 Zyklen		
Denaturierung	94°C	15 s
Elongation	68°C	30s
<hr/>		

B.1.11.4.: Auswertung der Sequenzdaten

Alle erhaltenen Sequenzen an 16S- und 23S-rDNA wurden in ein „*Alignment*“ bereits bekannter Sequenzen der Datenbank der TU-München (Dr. Ludwig) eingepaßt. Hierbei wurde darauf geachtet, daß sich die homologen Positionen nach der Anordnung an der gleichen Stelle befanden. In den variablen Sequenzbereichen dienten Sekundärstrukturanalysen oder kleinere Gruppen konservierter Basenfolgen als Orientierung zur Bestimmung homologer Positionen. Eine automatische Anordnung der Sequenzen war mit dem Tool „*Aligner*“ aus dem ARB Software Paket (Strunk und Ludwig, 1997) möglich. Andere Daten wie *iap*-Gen oder *plcA*-Gen Sequenzen wurden ebenfalls in ein „*Alignment*“ aus bereits bekannten Sequenzen eingepaßt.

B.1.12.: Rekonstruktion von Stammbäumen

Die Stammbäume zur Rekonstruktion phylogenetischer Verwandtschaften wurden nach der „*Maximum-Parsimony*“, „*Neighbor-Joining*“ (Saitou und Nei, 1987). oder „*Maximum-Likelihood*“ (Felsenstein, 1981). Methode erstellt. Alle Baumberechnungsverfahren waren im Programmpaket ARB implementiert (Strunk *et. al.*, 1997). Die Matrix der paarweisen Distanzwerte diente als Grundlage zur Stammbaumrekonstruktion nach der „*Neighbor-joining*“ Methode (Saitou und Nei, 1987). Mittels „*Maximum-Parsimony*“ und „*Maximum-Likelihood*“-Analysen wurde die Topologie der Stammbäume überprüft und gegebenenfalls korrigiert.

B.1.13.: Oligonukleotidsonden

B.1.13.1.: Konstruktion von rRNS gerichteten Sonden

Spezifische Oligonukleotidsonden wurden mit der im Programmpaket ARB implementierten Funktion „*Probe-Design*“ entwickelt. Mittels der Funktion „*Probe-Match*“ des ARB Programmpaketes konnte die Spezifität der Sonden gegenüber anderen Organismen überprüft werden.

B.1.13.2.: Markierung mit Fluoreszenzfarbstoffen

Alle für die fluoreszierende *in situ* Hybridisierung eingesetzten Oligonukleotidsonden wurden vom Hersteller (MWG-Biotech, Ebersberg, oder Interactiva, Ulm) fertig markiert bezogen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die Fluoreszenzfarbstoffe Fluos, Fluos-Prime, Cy3 und Cy5 verwendet.

Tabelle B.12.: Kenndaten der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe

Farbstoff	Absorptionsmaximum [nm]	Emmissionsmaximum [nm]	Extinktionskoeffizient ϵ in [l x mol x cm]
Fluos	494	518	$7,5 \times 10^4$
Fluos-Prime *	494	518	$7,5 \times 10^4$
Cy3	554	570	$1,3 \times 10^5$
Cy5	650	667	2×10^5

*Verbesserte Aufreinigung, nur über MWG Biotech zu beziehen

B.1.13.3.: Photometrische Vermessung der markierten Oligonukleotide

Nach Rekonstituierung der fluoreszenzmarkierten Oligonukleotide in H_2O_{reinst} wurden Verdünnungen im Verhältnis 1:100 mit H_2O_{reinst} (für Cy3 und Cy5-markierte Oligonukleotidsonden) bzw. mit Carbonat Puffer pH 9,0 (für Fluos oder Fluos-Prime-markierte Oligonukleotidsonden) hergestellt und im Spektralphotometer (Beckmann Photometer DU 650, München) vermessen. Die Farbstoffmarkierungsrate konnte durch Bildung des Quotienten aus Nukleotidabsorption (OD_{260}) und Farbstoffabsorption (Fluos, Fluos-Prime OD_{490} ; Cy-3 OD_{550} und Cy-5 OD_{650}) ermittelt werden. Bei vollständiger Umsetzung war der gemessene Wert gleich den Quotienten der beiden molaren Extinktionskoeffizienten (ϵ), was bei den verwendeten Farbstoffen und einer durchschnittlichen Länge der eingesetzten Oligonukleotide von 18 Basen bei Fluos und Fluos-Prime Markierung Werten von 2,5-3, bei Cy-3 Markierung von ca. 2 und bei Cy-5 Markierung von ca. 1 entsprach. Die Konzentration der markierten Oligonukleotide wurde mit folgender Formel ermittelt:

$$1 \text{ OD}_{260} \cong 20 \mu\text{g ssDNS ml}^{-1}$$

Die Stammlösungen der markierten Oligonukleotide wurden bei -20°C gelagert. Aus diesen wurden durch Verdünnung mit H_2O_{reinst} oder mit sterilem TE-Puffer Arbeitslösungen mit

einer Konzentration von 30 ng/μl (Cy3 und Cy5 markierte Sonden) und 50 ng/μl (Fluos markierte Sonden) hergestellt und bei -20°C gelagert.

B.1.13.4.: Verwendete rRNS gerichtete Oligonukleotidsonden

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten fluoreszenzmarkierten Oligonukleotidsonden sind in Tabelle [B.13.] zusammengefaßt.

Tabelle B.13.: Verwendete Oligonukleotidsonden

SONDE	POSITION IN <i>E. COLI</i>	SPEZIFITÄT	REFERENZ	SONDENSEQUENZ 5'-3'
EUB-338-I	16S, 338-355	<i>Bacteria</i>	Amann, 1990	GCT-GCC-TCC-CGT- AGG-AGT
EUB-338-II	16S, 338-355	<i>Planctomycetales</i>	Daims, 1999	GCA-GCC-ACC-CGT- AGG-TGT
EUB-338-III	16S, 338-355	<i>Verrucomicrobiales</i>	Daims, 1999	GCT-GCC-ACC-CGT- AGG-TGT
GAM-42A	23S, 1027-1043	<i>γ-Proteobacteria</i>	Manz, 1992	GCC-TTC-CCA-CAT- CGT-TT
BET42a	23S, 1027-1043	<i>β-Proteobacteria</i>	Manz, 1992	GCC-TTC-CCA-CTT- CGT-TT
BET-42A-C	23S, 1027-1043	<i>β-Proteobacteria</i>	Manz, 1992	GCC-TTC-CCA-CTT- CGT-TT
LegPne!	16S, 621-638	<i>L. pneumophila</i>	Grimm, 1998	ATC-TGA-CCG-TCC- CAG-GTT

B.1.14.: Pulsed-Field-Gel-Electrophorese-Fragment-Längen-Polymorphismen (PFGE-RFLP)

Mit der „Pulsed-Field“-Gelelektrophorese (PFGE) ist es möglich sehr große chromosomale DNS-Stücke in einer Agarosematrix aufzutrennen. Dabei wird die DNS nach ihrer Größe nicht in einem linearen Feld, sondern in einem hexagonal abwechselnd gepulsten Feld aufgetrennt. Dadurch erreicht man, daß die DNS nicht in den Poren des Gels steckenbleibt, sondern kontinuierlich aufgetrennt wird. Kombiniert man diese Methode der Elektrophorese mit der Methode der Restriktionsfragmentlängenpolymorphismen (RFLP) unter Verwendung von sehr selten schneidenden Restriktionsendonukleasen, so entstehen spezifische Bandenmuster. Diese Methode kann zur Stammdifferenzierung von Mikroorganismen eingesetzt werden.

B.1.14.1.: Präparation von *Listeria* „cell gel plugs“ für PFGE

Eine auf BHI Medium gewachsene einzeln liegende *Listeria* Kolonie wurde in 5 ml BHI Medium inokuliert und ÜN bei 37°C aerob auf dem Rundschtüttler (100-150 rpm) inkubiert. Die Zellen wurden geerntet und 2 x mit 1 ml TE-Puffer gewaschen. Danach wurden die Zellen in 1 ml TE-Puffer gründlich resuspendiert und die optische Dichte der Kultur auf 1,2 ($\pm 0,05$) bei einer Wellenlänge von 610 nm mit TE-Puffer eingestellt. Mit TE-Puffer wurde ein 1,6 % Gel hergestellt (*Chromosomal grade agarose*, BIO Rad) und im Wasserbad bei einer Temperatur von 60-65°C gehalten. 0,5 ml von jeder Kultur wurden in ein 1,5 ml ERG pipettiert, mit gleichem Volumen der aufgeschmolzenen Agarose versetzt und durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren gründlich gemischt. Die Suspension wurde in die Vertiefungen der Gießvorrichtung eingefüllt und das Gel durch Inkubation bei RT für ca. 15 min verfestigt. Die Gelblöcke wurden mit einem sterilen Spatel in ein Gefäß mit 2 ml Lysepuffer geben und bei 37°C ÜN inkubiert. Die Gelblöcke wurden anschließend 5 min mit TE-Puffer gewaschen. Der TE-Puffer wurde verworfen und durch 2 ml Deproteinierungslösung ersetzt. Es folgte eine Inkubation bei 50°C bis zu 48 h. Die Gelblöcke wurden nun kurz 1 x mit 2 ml TE-Puffer gespült und dann 2 x je 30 min mit 2 ml TE-Puffer gewaschen. Wurden die Gelblöcke nicht gleich weiterverarbeitet, konnten sie mit 0,5 M EDTA-Lösung versetzt bei 4°C gelagert werden.

B.1.14.2.: Präparation des Gels und Gellauf

Zur Weiterverarbeitung wurden ca. 4 mm des Gels mit einem sterilem Skalpell abgeschnitten, in ein steriles 1,5 ml ERG überführt und 2 x 20 min mit 400 μ l TE-Puffer gewaschen. Der TE-Puffer wurde durch 1 x Enzympuffer ersetzt und der Ansatz 20 min bei RT inkubiert. Der Enzympuffer wurde verworfen und mit 200 μ l frischem 1 x Enzympuffer und dem jeweiligen Restriktionsenzym versehen (für *Listeria* Typisierung 100 units/plugin *Apa* I, 25 units/plugin *Asc*I, beides New England Biolabs). Der Ansatz wurde ÜN bei der jeweiligen optimalen Temperatur inkubiert. Nach Beendigung der Restriktion wurde der Enzympuffer verworfen und durch 1 x TE-Puffer ersetzt. Nach 20 min Waschen wurde der TE-Puffer entfernt und durch 0,5 x TBE-Puffer ersetzt. Dieser Ansatz wurde mindestens 20 min oder bis zum Beladen des Gels inkubiert.

Während die Gelblöckchen in TBE-Puffer inkubierten, wurde ein 1% Gel (*Chromosomal grade agarose*, BIO Rad) aufgeschmolzen und bei etwa 60°C mit eingesetzten Kamm in der

vorgesehenen Vorrichtung gegossen. Nach Verfestigung des Gels wurde der Kamm vorsichtig gezogen und die Gelblöckchen mit Hilfe eines sterilen Spatels bis zum Grund der Taschen eingebracht. Ebenso wurde mit dem Molekulargewichtsstandard verfahren. Die Geltaschen wurden nun, möglichst ohne Luftblasen zurückzulassen, mit 1 % Gellösung versiegelt. 2 – 2,5 l 0,5 x TBE wurden in die PFGE-Zelle (Chef DRII, Biorad) gegeben und mit Hilfe der Umwälzpumpe und einem angeschlossenen Rückflußkühler mit Kühlwasserbad auf 14°C thermostatisiert. Nach Überführung des Gels in die Elektrophoresezelle wurden die Laufparameter eingestellt (Für *ApaI* und *AscI* Restriktionen „Initial Amp time 4,0“, „Final Amp time 40,0“, „Ratio 1,0“, „Voltage 200“, „Running time 22 hrs“ (für kleine, 10 „well“, Gele, „Running time 24 hrs“ (für große, 15 „well“, Gele) und der Gellauf gestartet. Nach Beendigung des Gellaufs wurde das Gel vorsichtig aus der Apparatur entnommen und Analog zu Agarosegelen mit Ethidiumbromid gefärbt.

B.1.15.: Herstellung und Markierung von Polyribonukleotidsonden durch *in vitro* Transkription

B.1.15.1.: Prinzip der *in vitro* Transkription

RNS-Polymerasen aus Bakteriophagen wie T7, T3 und SP6 bauen während der Transkription einer DNS-Matrize, bei der sie bis zu 20 µg RNS/µg Matrize erzeugen, markierte Ribonukleotide in die wachsende RNS-Kette ein (Höltke *et al.*, 1990). Eine DNS Matrize, die für die *in vitro* Transkription mit RNS-Polymerasen geeignet ist, muß einen Promotor enthalten, der hoch spezifisch von der entsprechenden RNS Polymerase erkannt wird. Dabei gibt es zwei unterschiedliche Methoden. Entweder man verwendet spezielle Transkriptionsvektoren, deren „multiple cloning site“ an einen solchen Phagenpromotor anschließt, oder PCR Produkte, die am 5'-Ende bei einem der flankierenden Primer eine zusätzliche Sequenz, die der Sequenz des Phagenpromotors entspricht, besitzen. In der vorliegenden Arbeit wurden die Transkripte aus Vektoren gewonnen, die die gewünschte Promotorsequenz trugen. Um eine definierte Länge des Transkripte zu erhalten, wurde der Transkriptionsvektor vor der *in vitro* Transkription mit einem Restriktionsenzym am 3'-Ende des Inserts linearisiert. Man spricht dabei von einer „run-off“ Transkription.

B.1.15.2.: Durchführung der *in vitro* Transkription

Lösungen und Enzyme:

T7-RNS-Polymerase (Roche)
DNase I, RNase frei (Roche)
RNasin (Roche)
10 x Transkriptionspuffer (Roche)
ATP (Roche)
CTP (Roche)
GTP (Roche)
UTP (Roche)
DIG-11-UTP (Roche)
Fluos-12-UTP (Roche)
EDTA-Lösung

10 x Markierungsgemisch (10 x Ribo-NTP-Mix)

ATP	10,0 mM
CTP	10,0 mM
GTP	10,0 mM
UTP	6,5 mM
Fluos-12-UTP, oder DIG-11-UTP	3,5 mM

Durchführung

Standardreaktionsansatz

1 µg linearisierte Matrizen DNS	x µl
10 x Markierungsgemisch	3 µl
10 x Transkriptionspuffer	3 µl
T7-RNS-Polymerase	3 µl
RNasin	1,5 µl
H ₂ O _{reinst} , DEPC	ad 30 µl

Der Reaktionsansatz wurde vorsichtig, ohne Auf- und Abziehen des Pipettenspitzeninhalts, durchmischt und 3 h bei 37°C in einem Thermoblock (Bachofer) inkubiert. Durch Zugabe von 3 µl DNase I, RNase frei und anschließender Inkubation für 15 min bei 37°C in einem Heizblock (Bachofer) wurde die Matrizen-DNS abgebaut. Nach Zugabe von 3 µl EDTA-Lösung zum Abstoppen der DNase Behandlung wurden die Transkripte durch Zugabe von 16 µl 10 M NH₄Ac-Lösung und 156 µl eiskaltem EtOH_{abs} und Inkubation für mindestens 3 h bei

-20°C gefällt. Der Ansatz wurde 20 min zentrifugiert (14.000 x g, 4°C, Bachhofer), der Überstand vorsichtig abgenommen und die sedimentierten Transkripte mit 1 ml EtOH_{70%} gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation für 15 min (14.000 x g, 4°C) wurde der Überstand vorsichtig abgehoben, die transkribierte RNS kurz im Vakuum getrocknet („Speed Vac“, Bachhofer), in 50-100 µl H₂O_{reinst}, DEPC aufgenommen und zum Schutz vor mit 2 µl RNasin (Roche) versetzt und bei -20°C gelagert.

B.1.16.: Hybridisierungen

B.1.16.1.: Ermittlung von Hybridisierungs- und Waschbedingungen

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Oligonukleotid- und Polyribonukleotidsonden zum spezifischen Nachweis von rRNS eingesetzt. Zur Abschätzung der Hybridisierungsbedingungen wurden folgende Formeln herangezogen und in Anlehnung daran die optimalen Hybridisierungsbedingungen empirisch bestimmt.

DNS-DNS-Hybridisierungen:

Zur Abschätzung der Dissoziationstemperatur bei Oligonukleotiden in DNS-DNS-Hybriden gilt folgender Zusammenhang (Wahl *et. al.*, 1987)

$$T_d = 4(\sum G + C) + 2(\sum A + T) \text{ in } ^\circ\text{C in } 6 \times \text{SSC}$$

RNS-RNS-Hybridisierungen:

Zur Berechnung der Schmelztemperatur von Polynukleotiden mit einer Länge bis zu 500 Nukleotiden in RNS-RNS Hybriden wurde folgende Formel herangezogen. (Wetmur, 1991; Wahl *et. al.*, 1987)

$$T_m = 78 + 16,6 \cdot \log_{10} \left[\frac{[Na]^+}{1,0 + 0,7 \cdot [Na]^+} \right] + 0,41 \cdot (\% G + C) - \frac{500}{D} - P - 0,35 \cdot (\% FA)$$

RNS-DNS-Hybridisierungen:

Für die Berechnung der Dissoziationstemperatur von Oligonukleotiden mit einer Länge von 10-50 Basen in RNS-DNS Hybriden wurde folgende Formel verwendet (Lathe, 1985; Wahl *et al.*, 1987)

$$T_d = 81,5 + 16,6 \cdot \log M + 0,4(\%G + C) - \frac{820}{n} - 0,5(\%FA)$$

Abkürzungen:

T_m	Schmelztemperatur [°C]
T_d	Dissoziationstemperatur [°C]
$[Na]^+$	Konzentration der Natriumionen [mol/l]
%G+C	Anteil Guanin und Cytosin an den Gesamtbasen
n	Länge des Hybrids
P	Anzahl der Fehlpaarungen in %
% FA	Gehalt an Formamid

Alle Hybridisierungen mit fluoreszenzmarkierten Oligonukleotidsonden wurden bei 46°C, alle Waschschrte bei 48°C durchgeführt. Hybridisierungen mit DIG markierten Polyribonukleotidsonden wurden bei den angegebenen Temperaturen durchgeführt. Die notwendige Stringenz wurde durch Zugabe von Formamid zum Hybridisierungspuffer eingestellt.

B.1.16.2.: Hybridisierung ganzer Zellen auf Objektträgern

Für Hybridisierungen ganzer Zellen auf Objektträgern wurden teflonbeschichtete Objektträger mit 6 oder 10 Aussparungen (Paul Marienfeld, Bad Mergentheim, BRD) verwendet. Die auf den Objektträger aufgebrachtten Zellen wurden bei 60°C angetrocknet und zur Dehydratisierung in einer aufsteigenden Ethanolreihe (je 3 min 50 %, 80 % und 100 % EtOH) behandelt.

Um den Verlust von Zellen während der Hybridisierungsprozedur möglichst gering zu halten, konnten die verwendeten Objektträger zusätzlich noch mit Gelatine beschichtet werden. Dazu wurden möglichst saubere und staubfreie, trockene Objektträger in die auf 60°C vorgewärmte Gelatinelösung (0,1 % (w/v) Gelatine, 0,01 % (w/v) Kaliumchromsulfat) eingetaucht und anschließend an einem staubfreien Ort getrocknet.

B.1.16.3.: Vorbehandlung der Zellen

Gram-positive Zellen wurden nach Dehydratisierung noch mit Lysozym-, und oder Proteinase-K-Lösung vorbehandelt. Dazu wurden 15 µl der Lösung pro Aussparung aufgetropft und der Ansatz inkubiert. Die optimale Inkubationstemperatur und Zeit wurden durch Zeitreihen ermittelt. Die so vorbehandelten Zellen wurden anschließend erneut dehydratisiert und dann hybridisiert.

B.1.16.4.: Hybridisierung mit Fluoreszenzfarbstoff-markierten Oligonukleotid-sonden

Hybridisierungspuffer (Hybridisierung bei 46 °C)

Die Stringenz im Hybridisierungspuffer wurde durch Zugabe unterschiedlicher Mengen an Formamid eingestellt.

5 M NaCl	360 µl
1 M Tris/HCl pH 8,0	40 µl
Formamid	nach Tabelle
H ₂ O _{reinst}	nach Tabelle
Fluoreszenzfarbstoff markierte Sonde	1 µl
10 % (w/v) SDS	2 µl

Tabelle B.14.: Formamidkonzentrationen im Hybridisierungspuffer bei 46°C Hybridisierungstemperatur

% Formamide	Formamide [µl]	H ₂ O _{reinst} [µl]
0	0	1.600
5	100	1.500
10	200	1.400
15	300	1.300
20	400	1.200
25	500	1.100
30	600	1.000
35	700	900
40	800	800
45	900	700
50	1.000	600
60	1.100	500
65	1.200	400
70	1.300	300
80	1.600	0

Die benötigte Stringenz wurde im Waschpuffer zur Vermeidung großer Formamid Abfallmengen durch Variation der NaCl Konzentration eingestellt. Ab 20 % Formamid im Hybridisierungspuffer wurde zusätzlich zur Komplexierung störender zweiwertiger Kationen 500 µl 0,5 M EDTA-Lösung zugegeben. Ab 70 % Formamid im Hybridisierungspuffer reichte die Zugabe von EDTA-Lösung aus, da hier das Na-Salz des Komplexierungsmittels verwendet wurde.

Tabelle B.15.: Konzentrationen an NaCl im Waschpuffer bei Hybridisierungen von fluoreszenzmarkierten Oligonukleotidsonden.

Waschpuffer (Waschen bei 48 °C)

% Formamid im Hybridisierungs- puffer' Hybridisierung bei 46°C	[NaCl] in mol	µl 5 M NaCl auf 50 ml, ab 20 % FA Zugabe von 500 µl 0,5 M EDTA
0	0,900	9.000
5	0,636	6.300
10	0,450	4.500
15	0,318	3.180
20	0,225	2.150
25	0,159	1.490
30	0,112	1.020
35	0,080	700
40	0,056	460
45	0,040	300
50	0,028	180
55	0,020	100
60	0,014	40
65	0,010	-
70	0,007	+ 350 µl EDTA
75	0,005	+ 250 µl EDTA
80	0,0035	+ 175 µl EDTA

Durchführung:

In die Aussparungen der Objektträger mit den fixierten und vorbehandelten Zellen wurden 9 µl Hybridisierungspuffer und je 1 µl Fluoreszenzfarbstoff markierter Sonde (Fluos-markierte Oligonukleotidsonden wurden in einer Konzentration von 50 ng/µl, Cy3- oder Cy5-markierte Oligonukleotidsonden in einer Konzentration von 30 ng/µl eingesetzt) aufgetropft und gut vermischt, ohne die Oberfläche zu verkratzen oder Zellen abzulösen. Der Objektträger wurde in ein 50 ml Probengefäß (Greiner, Nürtingen, BRD), in dem ein mit 2 ml Hybridisierungspuffer befeuchtetes Stück Zellstoff eingebracht wurde, überführt und 1-1,5 h bei 46°C in einem Hybridisierungssofen (Bachofer, Reutlingen) inkubiert. Nach einem 15 min

Waschschritt in einem mit 50 ml Waschpuffer gefüllten Probengefäß wurde der Objektträger getrocknet.

B.1.16.5.: Hybridisierung mit mehrfach DIG-markierten Polyribonukleotidsonden

Hybridisierungspuffer:

5 M NaCl	30 µl
1 M Tris/HCl pH 8,0	40 µl
Formamid	x µl
H ₂ O _{reinst} , DEPC	ad 2 ml
DIG-markierte Polyribonukleotidsonde	y µl
10 % (w/v) SDS	2 µl

Für eine Hybridisierung wurde 250 ng mit DIG-markierter Polyribonukleotidsonde eingesetzt.

F_{ab}-Inkubationspuffer

5 M NaCl	280µl
1 M Tris	40 µl
10 % (w/v) Blockierungsvorratslösung	20 µl
H ₂ O _{reinst}	ad 2 ml

F_{ab}-Waschpuffer

5 M NaCl	7 ml
1 M Tris/HCl pH 8,0	5 ml
H ₂ O _{reinst}	ad 50 ml

Durchführung:

Auf die Aussparungen der Objektträger mit den vorbehandelten und fixierten Zellen wurden 9 µl Hybridisierungspuffer und 250 ng der jeweiligen Polyribonukleotidsonde pipettiert und vorsichtig gemischt. Anschließend wurde der Objektträger in ein 50 ml Probengefäß, in dem ein mit 2 ml Hybridisierungspuffer befeuchtetes Stück Zellstoff ausgelegt war, überführt. Nach einem 30 min Denaturierungsschritt bei 80°C wurde der Objektträger 3-5 h bei bis zu 52°C hybridisiert. Nach erfolgter Hybridisierung wurde überschüssige Sonde vorsichtig mit H₂O_{reinst} entfernt und der Objektträger durch einen Luftstrom getrocknet. Die Detektion des Digoxigenins erfolgte nach der Hybridisierung mit anti-DIG-POD-F_{ab}-Fragmenten (Roche, Mannheim). Dazu wurden pro Aussparung auf den Objektträger 17 µl F_{ab}-Inkubationspuffer und 3 µl anti-DIG-POD-F_{ab}-Fragment (200 µg/ml) aufgebracht und der Ansatz 1 h bei RT

inkubiert. Um ungebundene F_{ab} -Fragmente zu entfernen, schloß sich ein 10 min Waschschrift bei RT in einem mit 50 ml Waschpuffer gefüllten Probengefäß an. Die Hybridisierungen wurden anschließend mit dem „TSA-direct-Green“ (Fluorescein-Tyramid) oder „TSA-direct-Red“ (Cyanine-3-Tyramid) Kit“ (NEN™ Life science Products, Boston) nach Herstellerangaben detektiert.

B.1.17.: Mikroskopische Techniken

B.1.17.1.: Detektion fluoreszenzmarkierter Zellen durch Epifluoreszenzmikroskopie

Um Ausbleichungseffekte während der mikroskopischen Auswertung zu verhindern, wurden die hybridisierten Zellen in Citifluor-AF1 (Citifluor Ltd, London) eingebettet, der Objektträger mit einem Deckglas versehen und nach 10 min Inkubationszeit unter dem Mikroskop (Axioplan, Zeiss) durch Vergleich des Fluoreszenz- und des Phasenkontrastbildes ausgewertet. Es wurden Plan-Neofluar Objektive mit 20, 40, 63- und 100-facher Vergrößerung verwendet. Für die Mikroskopie von mit *L. monocytogenes* infizierten Zellkulturen wurde ein inverses Mikroskop der Firma Leica (Leica DM IRB) verwendet.

Tabelle B.16.: Kenndaten der zur Fluoreszenzmikroskopie verwendeten Filtersysteme (BP = Bandpaßfilter, LP = Langpaßfilter, HQ = High quality)

Filtersatz	Anregungsfilter	Farbteiler [nm]	Emissionsfilter	eingesetzt für
Filter 01	BP 365	395	LP 397	DAPI
Filter 09	450-490	510	LP 520	Fluos
Filter 15	BP 546	580	LP 590	Cy3
Filter 16	BP 485	510	LP 520	Fluos
Filter 20	BP 546	560	575-640	Cy3
Filter-CTC	HQ 535/50	Q 565 LP	HQ 610/75	Cy3
26	BP 575-625	645	BP 660-710	C5

B.1.17.2.: Konfokale Laserscanning-Mikroskopie

In der vorliegenden Arbeit wurde das konfokale Laserscanning-Mikroskop LSM-510 der Firma Zeiss (Oberkochen) verwendet. Diese Art der Mikroskopie besitzt den Vorteil, ausschließlich aus der Fokusebene stammende Fluoreszenzsignale zu detektieren. Die Detektion von Streulichtsignalen, die von ober- und unterhalb der eigentlichen Fokusebene stammen, kann somit umgangen werden. Das zu untersuchende Präparat wird dabei punktförmig mit monochromatischem Licht angeregt. Als Lichtquelle dienen hierbei Laserlinien mit unterschiedlicher Wellenlänge (Argon = 488 nm, Helium-Neon = 543 nm bzw. 633 nm). Die Bildaufnahmen erfolgten mit dem vom Hersteller mitgelieferten Softwarepaket „*Laserscanning-Microscope*“ 510 (Version 2.01).

B.2.: Zellbiologische Methoden

B.2.1.: Verwendete Zelllinien

In der vorliegenden Arbeit wurden für Infektionsstudien mit *L. monocytogenes* die 3 Zelllinien CaCo-2, Tib-73 und P-388 verwendet. Es handelte sich hierbei um Makrophagen (P-388, murine Mausmakrophagen), Hepatozyten (Tib-73, Mausembryo Hepatozyten) und Darmepithelzellen (CaCo-2, aus einem Adenocarcinom stammend). Alle verwendeten Lösungen und Medien wurden vor Verwendung in einem thermostatisierten Wasserbad auf 37°C vorgewärmt. Alle Zelllinien wurden in einem Brutschrank bei 37°C in einer 5 % CO₂ Atmosphäre inkubiert. Allgemein wurde besonders auf Sterilität bei der Handhabung von Zellkulturen geachtet.

B.2.2.: Verwendete Lösungen, Medien und Kulturgefäße

Lösungen

- 1 x PBS mit Ca²⁺/Mg²⁺ (25 ml 20 x PBS, 25 ml 20 x Calcium-Magnesiumlösung, 450 ml H₂O_{reinst})
- 1 x PBS ohne Ca²⁺/Mg²⁺ (25 ml 20 x PBS, 475 ml H₂O_{reinst})
- 20 x Calcium-Magnesium-Lösung (2 g Magnesiumchlorid-Hexahydrat, 2 g Calciumchlorid-Dihydrat)
- 20 x PBS (160 g NaCl, 4 g KCl, 23 g *di*-Natriumhydrogenphosphat, 4 g Kalium-*di*-Hydrogenphosphat)
- Cytochalasin-D-Lösung (1 mg Cytochalasin-D/ml)
- Gentamycin-Lösung (50 mg Gentamycin in 1 ml H₂O_{reinst} einer 50 mg/ml)
- Hoechst-33342-Farbstofflösung (Konzentration 1 mg/ml)
- Propidiumiodid-Lösung (200 µg Propidiumiodid /ml H₂O_{reinst} lösen)

Zellkulturmedien

FCS (Fötale Kälberserum, Gibco BRL, Karlsruhe)
RPMI-1640^{-FCS} (RPMI-1640-Zellkulturmedium mit L-Gluthamin, Gibco-BRL)
RPMI-1640^{+FCS} (RPMI-1640-Zellkulturmedium mit L-Gluthamin und 10 %
(v/v) FCS)
RPMI-1640^{+FCS + Genta} (RPMI-1640-Zellkulturmedium mit L- Gluthamin und
10 % (v/v) FCS und 20 µl Gentamycin-Lösung
Trypsin-EDTA Lösung

0,02 % (w/v) EDTA
0,05 % Trypsin
in 1 x PBS ohne Ca²⁺ und Mg²⁺

Kulturgefäße

Zellkultur-Schalen (92 x 17 mm, 40 x 12 mm, Nunc, Wiesbaden-Biebrich)
Zellkultur-Multischalen (132 x 88 mm mit 6 Vertiefungen, 132 x 88 mm mit
24 Vertiefungen, Nunc)
Zellkultur-Flaschen (Schräghals, 50 ml Volumen, Schräghals 260 ml Volumen,
Nunc)

B.2.3.: Hitzeinaktivierung von fötalem Kälberserum (FCS)

Das Serum wurde vom Hersteller auf -20°C gekühlt geliefert. Zum Auftauen wurde die Serumflasche ÜN bei 4°C inkubiert. Zur Inaktivierung des Komplements wurde das Serum unter schütteln in einem auf 56°C thermostatisierten Wasserbad 30 min behandelt. Das hitzeinaktivierte Serum wurde unter aseptischen Bedingungen in 50 ml Probengefäße aliquotiert und bei -20°C gelagert. Einmal aufgetaut wurde hitzeinaktiviertes FCS bei 4°C gelagert.

B.2.4.: Auftauen von eingefrorenen Zellkulturen

Zur langfristigen Stammhaltung wurden die Zellkulturen in flüssigen Stickstoff (Einfriermedium 10 % (v/v) DMSO in RPMI-1640^{+FCS}) gelagert. Zum Auftauen wurden die Kryoröhrchen möglichst schnell in ein auf 37°C temperiertes Wasserbad transferiert. Nach dem Auftauen wurden 1 bis 2 ml der Zellen in 25 ml RPMI-1640^{+FCS}-Medium suspendiert und in eine Kulturschale überführt. Nach ca. 3 Stunden wurden die Zellen von dem zytotoxischen Gefriermedium, das Dimethylsulfoxid (DMSO) enthält, befreit. Dazu wurde das Medium gewechselt. Dieser Vorgang wurde nach einem Tag wiederholt.

B.2.5.: Trypsinisieren und Passagieren von Zellkulturen (Freshney *et. al.*, 1987)

Zum Passagieren der Zelllinien wurde das Nährmedium mit einer an einer Vakuumpumpe angeschlossenen sterilen Pasteurpipette abgesaugt. Die Zellen wurden anschließend mit 1 x PBS-Lösung ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} gewaschen. Dazu wurden 1 x PBS-Lösung ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} (3-4 ml bei Zellkultur-Schale 40 x 12 mm. 10 ml bei Zellkultur-Schale 92 x 17 ml) auf die Zellen gegeben, geschwenkt und die Flüssigkeit erneut mit einer Pasteurpipette abgesaugt. Durch Zugabe von 1 ml Trypsin-EDTA-Lösung und Inkubation des Ansatzes bei 37°C für ca. 5 min wurden die Zellen vom Boden der Zellkulturgefäße abgelöst. Danach konnten die Zellen in RPMI-1640^{+FCS}-Medium resuspendiert werden und in neue Zellkultur-Schalen oder Zellkultur-Flaschen ausgesät werden. Makrophagen, die sich nicht durch trypsinisieren von Schalenboden ablösen lassen, wurden abgeschabt, in frischem Nährmedium resuspendiert und in neue Kulturgefäße ausgesät.

B.2.6.: Herstellung von „Infektionsaliquots“

Eine einzeln liegende Kolonie der verwendeten *L. monocytogenes* Stämme wurde in 5 ml BHI-Medium angeimpft und ÜN bei 37°C auf dem Rundschtüttler inkubiert. Die Hauptkultur wurde 1:25 in 50 ml BHI Medium in 100 ml Erlenmeyerkolben inokuliert und bis zu Erreichen der endlogarithmischen Wachstumsphase auf dem Rundschtüttler bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugieren bei 5.000 rpm bei 4°C für 10 min geerntet, 2 x mit 10 ml 1x PBS-Lösung gewaschen und in 10 ml steriler 1 x PBS- /Glycerin-Lösung 4:1 gründlich resuspendiert. Die resuspendierten Zellen wurden zu 500 µl aliquotiert und bei -80°C gelagert. Zur Bestimmung der Zellzahl wurde ein Infektionsaliquot aufgetaut und durch Plattenverdünnungsreihen die Zellzahl bestimmt.

B.2.7.: Infektion von Zelllinien mit nativen *L. monocytogenes* Stämmen

Die Zellen wurden bis zur Ausbildung eines „konfluenten-monolayers“ angezogen. Das Medium wurde mit einer an einer Vakuumpumpe angeschlossenen sterilen Pasteurpipette entfernt und durch 3 ml 1 x PBS-Lösung mit $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ ersetzt. Die Petrischalen wurden leicht geschwenkt und der Puffer erneut mit einer sterilen Pasteurpipette abgesaugt und durch 3 ml RPMI-1640^{+FCS} ersetzt. Ein Zellkultur-Schälchen wurde zur Bestimmung der Zellzahl trypsinisiert und die Zellzahl mittels einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer bestimmt. (bei Tib-

73 Hepatozyten und CaCo-2 Epithelzellen). Die Zellzahl an Makrophagen wurde durch abschaben der Zellen in 1 x PBS mit $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ und ebenfalls durch Auszählen bestimmt. Die Zellen wurden nun mit *L. monocytogenes* Zellen infiziert. Dazu wurden die Infektionsaliquots aufgetaut und die Zellen mit einer bestimmten „MOI“ („multiplicity-of-infection“) abhängig von der bestimmten Zellzahl und der verwendeten Zelllinie infiziert. Tabelle B.17 faßt die MOI und die Infektionsdauer für die jeweiligen Zelllinien zusammen.

Tabelle B.17.: Infektionszeiten und verwendete MOI für die einzelnen Zelllinien

Zelltyp	Zelllinie	Infektionsdauer	MOI
Hepatocyten	Tib-73	1,5 h	100
Darmepithelzellen	CaCo-2	1 h	20-50
Makrophagen	P-388	45 min	1-10

Nach erfolgter Infektion wurden das Medium mit Hilfe einer sterilen Pasteurpipette abgezogen und der Ansatz drei mal mit je 3 ml 1 x PBS mit $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ gewaschen. Der Puffer wurde entfernt und die Zellen mit 3 ml RPMI-1640^{+FCS + Gentamycin} versehen. Das Antibiotikum soll alle Listerien abtöten, die die Zelle nicht infiziert haben und noch frei im Medium waren. Nach 1 h und 24 h wurden die Infektionsraten bestimmt. Dazu wurde das Medium durch eine sterile Pasteurpipette entfernt und die Zellen 2 x mit 3 ml 1 x PBS-Lösung ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ gewaschen. Den Infektionsschälchen wurden 2 ml 0,05 % (w/v) eiskalte SDS Lösung zugegeben und der Ansatz auf Eis gebettet bei 4°C 15-30 min inkubiert. Die so lysierten Zellen wurden nun gründlich resuspendiert und die Zellzahl an Bakterien durch Anlegen von Verdünnungsreihen von 10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} und 10^{-3} in Triplikaten auf verfestigtem BHI-Medium bestimmt.

B.2.8.: Infektion von Zellen mit GFP-markierten *L. monocytogenes* Zellen

Für die Infektion der Zelllinien mit GFP-markierten Listerien wurden verschiedene *L. monocytogenes* Stämme mit den Plasmiden *psod*-GFP und *pactA*-GFP [B.1.2.] elektrotransformiert [B.1.9.2.]. Die Infektion wurde bis zur Zugabe der SDS Lyse-Lösung analog zur Infektion mit nativen *L. monocytogenes*-Stämmem [B.2.7.] durchgeführt. Abweichend hierzu wurden die Zellen mit 3 ml 1 x PBS ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ gewaschen und die Flüssigkeit mit einer sterilen Pasteurpipette abgesaugt. Makrophagen wurden mit 2 ml 1 x PBS ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ versetzt und vom Schalenboden vorsichtig abgeschabt. Hepatozyten und Epithelzellen wurden mit 0,5 ml Trypsin-EDTA-Lösung von Schalenboden abgelöst und in

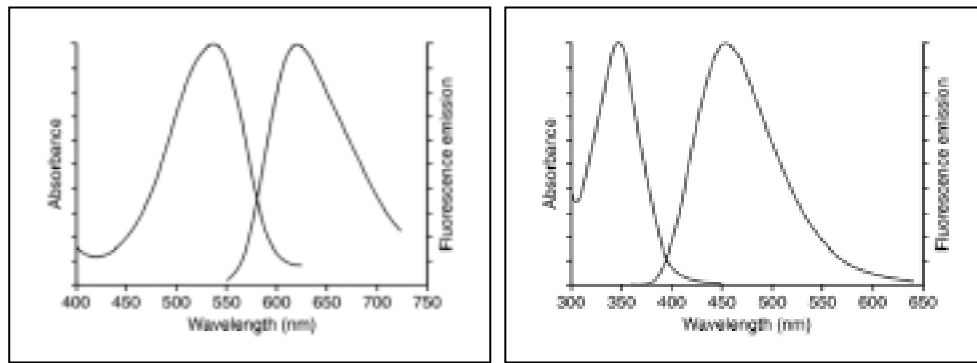
ein steriles 10 ml Probengefäß überführt indem 1 ml 1 x PBS-Lösung ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ vorgelegt war. Das Schälchen wurde mit 0,5 ml 1 x PBS-Lösung mit $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ nachgespült und die Lösung ebenfalls in das 10 ml Probengefäß überführt. Dieser Ansatz wurde bis zu Auswertung auf Eis inkubiert. Die Auswertung erfolgte an einem Durchflußcytometer („*Epics Elite ESP cell sorter*“, Coulter) und wurde freundlicherweise von Herrn PD Dr. Andreas Simm vom Lehrstuhl für Physiologische Chemie am Theodor-Boveri-Institut für Biowissenschaften der Universität Würzburg durchgeführt.

B.2.9.: Adhäsionstests

Zelllinien wurden bis zur Dichte eines „konfluenten-*monolayers*“ angezogen. Die Zellen wurden Analog zu Infektionen mit nativen *L. monocytogenes*-Stämmem [B.2.7.] behandelt. 30 min vor der Infektion wurde 1 µl Cytochalasin-D-Lösung/ml Zellkulturmedium zugegeben und durch schwenken gründlich gemischt. Cytochalasin-D verhindert die Mikrofilamentumlagerung der Zelle. Adhärente Bakterienzellen können nicht mehr aufgenommen werden. Die Zellen wurden 1 x mit 1 x PBS-Lösung mit $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ gewaschen und mit 3 ml RPMI-1640^{-FCS}-Zellkulturmedium versetzt. Alle Zelllinien wurden mit einer MOI von 50 infiziert. Die Zellen wurden nach der Infektion (CaCo-2 Epithelzellen für 1 h, Tib-73 Hepatozyten für 1,5 h und P388 Makrophagen für 45 min) 5 x mit 1 x PBS-Lösung mit $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ gewaschen und entweder wie unter [B.2.7.] beschrieben die adhärennten Zellen durch ausplattieren oder durch Auszählen mittels Durchflußcytometrie [B.2.8.] bestimmt.

B.2.10.: Infektion von Zellkulturen mit GFP-markierten *L. monocytogenes* Stämmen und mikroskopische Auswertung

Zur mikroskopischen Betrachtung der Infektionsstudien wurden GFP-markierte *L. monocytogenes* Stämme verwendet. Zusätzlich wurde noch eine Färbung mit Propidiumiodid und Höchst-33342 durchgeführt. Propidiumiodid kann nur durch nicht intakte Zellmembranen diffundieren. Deswegen eignet sich die Färbung mit Propidiumiodid zur Unterscheidung zwischen lebenden und toten Zellen. Der Fluoreszenzfarbstoff Hoechst-33342 färbt eukaryotische Zellkerne an. In Abbildung B.1. sind die Absorptions- und Emmissionsmaxima der verwendeten Farbstoffe zusammengefaßt.



Propidiumiodid

Hoechst-33342

Abbildung B.1.: Absorptions- und Emmissionsmaxima von Propidiumiodid und Höchst-33342

Die Kombination der beiden Farbstoffe diente eigentlich für Apoptose Untersuchungen wurde aber im Zusammenhang mit der Infektion von verschiedenen Zelllinien mit GFP markierten *L. monocytogenes* Stämmen verwendet. Zur Infektion wurden nur *L. monocytogenes* Stämme verwendet, die mit dem Plasmid *psod*-GFP transformiert waren. Die Zellen wurden Analog zu [B.2.7.] bis zur Infektion behandelt. Abweichend wurden alle Zelllinien mit einer „MOI“ von 20 infiziert. Nach 4 h und 20 h wurden die Infektionsschälchen unter dem Mikroskop betrachtet. Dazu wurde dem Medium 30 min vor Beendigung der Infektion 10 µl der Hoechst-33342-Farbstofflösung zugegeben und gründlich gemischt. 2 min vor Ende der Infektionszeit wurden 2 µl Propidiumiodid zugegeben. Nun konnte das Infektionsschälchen unter dem Mikroskop betrachtet und ausgewertet werden.

C.: Ergebnisse

C.1.: Anreicherung und Isolierung von Listerien und Salmonellen aus Umweltproben

C.1.1.: Isolierung von Listerien aus Umweltproben

In der vorliegenden Arbeit wurden Listerien unter anderem aus verschiedenen Belebtschlämmen wie in [B.1.3.3.] beschrieben aus 25 g Ausgangsmaterial isoliert. Beprobte wurden die Belebungsbecken der Anlagen „Großlappen“, „Dietersheim“ und „Grüneck“. Es konnten aus allen untersuchten Belebtschlämmen Listerien isoliert werden. Insgesamt wurden 80 Isolate gewonnen und näher untersucht. Von diesen Isolaten wurde nach [B.1.5.1.] DNS isoliert und mittels PCR [B.1.10.] überprüft, ob es sich bei den Isolaten um Listerien und *L. monocytogenes* handelt. Jede DNS aus den Isolaten lieferte nach PCR mit den *iap*-Gen spezifischen Primerpaar *iap*-P-V/*iap*-P-R [B.1.10.2.4.] Amplifikate der erwarteten Größe von etwa 1,45 kb. Sechs Isolate konnten mittels PCR und den für *L. monocytogenes* spezifischen Primerpaar MonoA/MonoB [B.1.10.2.4.] als *L. monocytogenes* identifiziert werden. Tabelle C.1. faßt die Herkunft der isolierten *L. monocytogenes* Stämme zusammen.

Tabelle C.1.: Herkunft der mittels Selektivanreicherung und PCR als *L. monocytogenes* identifizierten Isolate aus verschiedenen Belebtschlämmen

<i>Isolat</i>	<i>Herkunft</i>
Isolat-1	Großlappen, Belebungsbecken I
Isolat-3	Großlappen, Belebungsbecken I
Isolat-11	Dietersheim, Belebungsbecken I
Isolat-45	Grüneck, Belebungsbecken
Isolat-46	Grüneck, Belebungsbecken
Isolat-50	Großlappen, Belebungsbecken I

Die Überprüfung der Isolate durch das in der vorliegenden Arbeit entwickelte diagnostische PCR-Verfahren wird in Kapitel [C.4.2.1.1.4.] näher beschrieben. Zur Überprüfung der Ergebnisse wurden die 16S-rDNS Gene der als *L. monocytogenes* typisierten Isolate mittels PCR [B.1.10.] unter Verwendung des Primerpaares 616V/630 R [B.1.10.2.1.] amplifiziert und die Amplifikate nach Aufreinigung [B.1.10.6.] direkt einer nichtradioaktiven Sequenzanalyse unterzogen [B.1.11.]. Die erhaltenen Sequenzen wurden in ein „*Alignment*“ an vorhandenen 16S-rRNS Sequenzen (Dr. Ludwig, Stand 2000) eingepaßt und eingerechnet. Abbildung C.1. zeigt ein phylogenetisches Dendrogram berechnet nach der „*Neighbor-Joining*“-Methode mit

den erhaltenen Sequenzdaten der *L. monocytogenes*-Isolate aus Belebtschlamm. Die Anzahl an sequenzierten Basen ist bei den jeweiligen Isolaten im Dendrogramm angegeben.

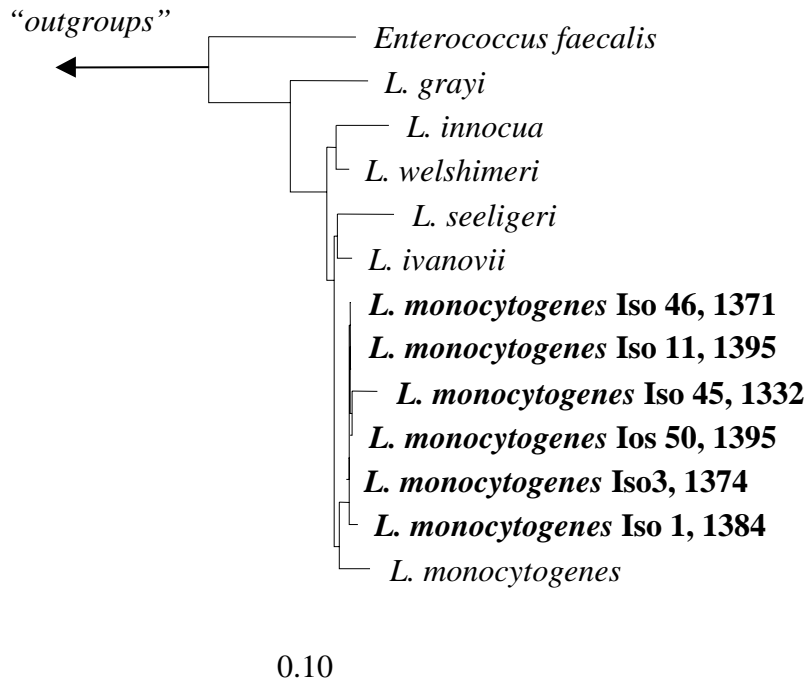


Abbildung C.1.: Phylogenetisches Dendrogramm basierend auf 16S-rRNS Sequenzen aller *L. monocytogenes* Isolate aus Belebtschlamm berechnet nach der „Neighbor-Joining“-Methode unter Verwendung eines Sequenzfilters, der nur Alignmentpositionen berücksichtigt, die bei 50 % der im Datensatz vorhandenen Bakterien konserviert sind. Der Balken gibt 10 % Sequenzdivergenz an.

C.1.2.: Isolierung von Salmonellen aus Bioabfallvergärungsanlagen

Im Rahmen einer im Arbeitskreis angefertigten Diplomarbeit (Adamczyk, 1999) und der vorliegenden Arbeit wurden aus zwei Bioabfallvergärungsanlagen Salmonellen, wie in [B.1.3.4.] beschrieben aus 25 g Ausgangsmaterial, isoliert. Salmonellen stellen in derartigen Anlagen, insbesondere bei der Nachrotte der Gärrückstände, ein hygienisches Problem dar. Beprobte wurden zwei Kompostverwerter, die beide organischen Müll anaerob vergären. Die Anlagen verarbeiten ca. je 20.000 t/a organischen Müll. Als organischer Müll dient hier biologischer Haushaltsmüll, Speisereste, verpackte und abgelaufene Lebensmittel, Altholz etc. Der zurückbleibende Faulschlamm wird aerob kompostiert. Ein Übersichtsplan der Prozeßführung der beiden Anlagen ist bei Adamczyk (1999) zusammengefaßt.

Es konnten aus beiden Anlagen Salmonellen aus verschiedenen Stufen der Prozeßführung nach der Hygienisierungsstufe isoliert werden. Dies wurde durch die Verwendung von

ERGEBNISSE

Selektivmedien [B.1.3.1], biochemischer Differenzierung (Api-20E, Bio Merieux, Nürtingen) und anschließender Serotypisierung [B.1.3.4.] bestätigt. In Tabelle C.2. sind die Ergebnisse der Isolierung von Salmonellen aus Bioabfallvergärungsanlagen sowie der Probenahmeort zusammengefaßt. Bei den Isolaten S-21 und S-22 handelte es sich nicht um Salmonellen, sondern um zwei *Citrobacter freundii* Stämme (bestätigt durch Sequenzanalyse der 16S-rRNS und Serotypisierung, Daten nicht gezeigt).

Tabelle C.2.: Die Tabelle zeigt zusammenfassend die Ergebnisse der Serotypisierung aller erhaltenen Isolate aus den beiden Bioabfallvergärungsanlagen, die unterschiedlichen Probenahmestellen und das Resistenzprofil. Amp¹=Ampicillin, C²=Chloramphenicol, S³=Streptomycin, Su⁴=Sulfonamid, Te⁵=Tetracyclin, Fr⁶= Furazolidon, Sxt⁷=Sulfamethoxazol/Trimethoprim, W⁸=Trimethoprim, Na⁹=Nalidixinsäure.

Isolat	Serovar	Seroformel	Resistenz	beprobte Anlage	Ursprung
S-1	<i>S. typhimurium</i>	1,4,5,12:i:1,2	Amp ¹ , C ² , S ³ , Su ⁴ , Te ⁵	Högl	Gärprodukt
S-2	<i>S. thompson</i>	6,7:k:1,5	sensibel	Högl	Überschußwasser
S-3	<i>S. isangi</i>	6,7:d:1,5	sensibel	Högl	Faulreaktor
S-4	<i>S. infantis</i>	6,7:r:1,5	Fr ⁶	Högl	Bioabfall
S-5	<i>S. livingstone</i>	6,7:d:l,w	sensibel	Kirchstockach	Methanreaktor, Ablauf
S-6	<i>S. rissen</i>	6,7:f,g:-	sensibel	Kirchstockach	Methanreaktor, Ablauf
S-7	<i>S. rissen</i>	6,7:f,g:-	sensibel	Kirchstockach	Methanreaktor, Ablauf
S-8	<i>S. infantis</i>	6,7:r:1,5	sensibel	Kirchstockach	Methanreaktor, Schlamm
S-9	<i>S. infantis</i>	6,7:r:1,5	sensibel	Kirchstockach	Methanreaktor, Schlamm
S-10	<i>S. infantis</i>	6,7:r:1,5	sensibel	Kirchstockach	Methanreaktor, Schlamm
S-11	<i>S. rissen</i>	6,7:f,g:-	sensibel	Kirchstockach	Hydrolyse 2
S-12	<i>S. rissen</i>	6,7:f,g:-	sensibel	Kirchstockach	Hydrolyse 2
S-13	<i>S. rissen</i>	6,7:f,g:-	sensibel	Kirchstockach	Hydrolyse 2
S-14	<i>S. rissen</i>	6,7:f,g:-	sensibel	Kirchstockach	Hydrolyse 1
S-15	<i>S. rissen</i>	6,7:f,g:-	sensibel	Kirchstockach	Hydrolyse 1
S-16	<i>S. rissen</i>	6,7:f,g:-	sensibel	Kirchstockach	Hydrolyse 1
S-17	<i>S. rissen</i>	6,7:f,g:-	sensibel	Kirchstockach	Nitrifikation
S-18	<i>S. rissen</i>	6,7:f,g:-	sensibel	Kirchstockach	Nitrifikation
S-19	<i>S. rissen</i>	6,7:f,g:-	sensibel	Kirchstockach	Nitrifikation
S-20	<i>S. infantis</i>	6,7:r:1,5	sensibel	Kirchstockach	Nitrifikation
S-23	<i>S. enteritidis</i>	9,12:g,m:-	sensibel	Kirchstockach	Hydrolyse 1
S-24	<i>S. enteritidis</i>	9,12:g,m:-	sensibel	Kirchstockach	Hydrolyse 1
S-25	<i>S. enteritidis</i>	9,12:g,m:-	sensibel	Kirchstockach	Hydrolyse 1
S-26	<i>S. typhimurium</i>	1,4,5,12:i:1,2	Amp ¹ , C ² , S ³ , Su ⁴ , Sxt ⁷ , Te ⁵ , W ⁸	Kirchstockach	Hydrolyse 1
S-27	<i>S. typhimurium</i>	1,4,5,12:i:1,2	Amp ¹ , S ³ , Su ⁴ , Te ⁵	Kirchstockach	Hydrolyse 1
S-28	<i>S. typhimurium</i>	1,4,5,12:i:1,2	Amp ¹ , C ² , S ³ , Su ⁴ , Sxt ⁷ , W ⁸	Kirchstockach	Hydrolyse 1
S-29	<i>S. typhimurium</i>	1,4,5,12:i:1,2	sensibel	Kirchstockach	Methanreaktor
S-30	<i>S. thompson</i>	6,7:k:1,5	sensibel	Kirchstockach	Methanreaktor

Tabelle C.2.: Fortsetzung

Isolat	Serovar	Seroformel	Resistenz	beprobte Anlage	Ursprung
S-31	<i>S. enteritidis</i>	9,12:g,m:-	sensibel	Kirchstockach	Methanreaktor, Schlamm
S-32	<i>S. typhimurium</i>	1,4,5,12:i:1,2	Amp ¹ , S ³ , Su ⁴ , Te ⁵	Kirchstockach	Hydrolyse 1
S-33	<i>S. enteritidis</i>	9,12:g,m:-	sensibel	Kirchstockach	Methanreaktor, Schlamm
S-34	<i>S. enteritidis</i>	9,12:g,m:-	sensibel	Kirchstockach	Methanreaktor, Schlamm
S-35	<i>S. newport</i>	6,8:e,h:1,2	Na ⁹	Kirchstockach	Methanreaktor, Schlamm
S-36	<i>S. enteritidis</i>	9,12:g,m:-	sensibel	Kirchstockach	Methanreaktor, Schlamm
S-37	<i>S. enteritidis</i>	9,12:g,m:-	sensibel	Kirchstockach	Methanreaktor, Schlamm
S-38	<i>S. enteritidis</i>	9,12:g,m:-	sensibel	Kirchstockach	Methanreaktor, Schlamm
S-39	<i>S. enteritidis</i>	9,12:g,m:-	sensibel	Kirchstockach	Methanreaktor, Schlamm
S-40	<i>S. newport</i>	6,8:e,h:1,2	Na ⁹	Kirchstockach	Methanreaktor, Schlamm
S-41	<i>S. enteritidis</i>	9,12:g,m:-	sensibel	Kirchstockach	Methanreaktor, Schlamm
S-42	<i>S. enteritidis</i>	9,12:g,m:-	sensibel	Kirchstockach	Methanreaktor, Schlamm
S-43	<i>S. enteritidis</i>	9,12:g,m:-	sensibel	Kirchstockach	Methanreaktor, Schlamm

Von den Isolaten S-1 bis S-20 wurden die 16S-rDNS Sequenzen durch nichtradioaktive Direktsequenzierung [B.1.11.] mit dem Primerpaar 609-V-IR/699-R-IR [B.1.11.1.] bestimmt und in den vorhandenen Datensatz an 16S-rRNS Sequenzen (Dr. Ludwig, Stand 2000) eingerechnet. Abbildung C.2. zeigt ein phylogenetisches Dendrogramm berechnet nach dem „Neighbor-Joining“-Verfahren der 16S-rDNS Sequenzdaten der untersuchten *Salmonella* Isolate und der im Datensatz vorhandenen Salmonellen Sequenzen.

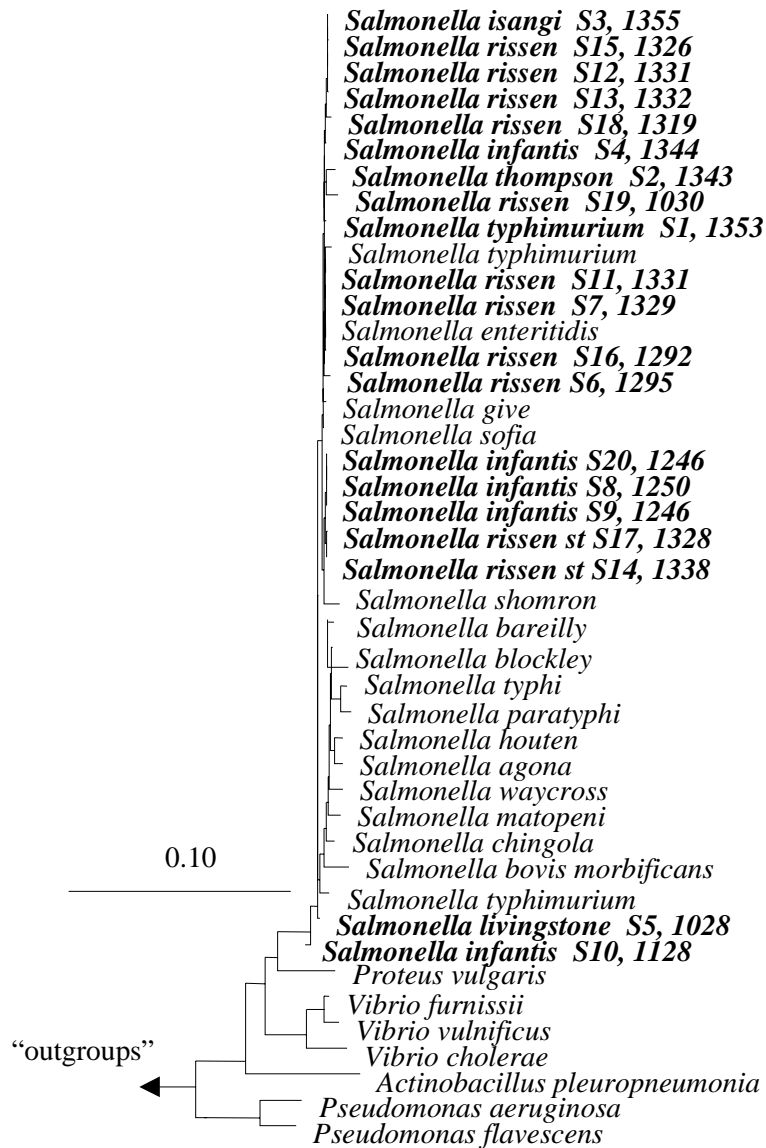


Abbildung C.2.: Phylogenetisches Dendrogramm berechnet nach der „Neighbor-Joining“ Methode der 16S-rDNS Sequenzen der untersuchten *Salmonella*-Isolate unter Verwendung eines Sequenzfilters, der nur Alignmentpositionen berücksichtigt, die bei 50 % der im Datensatz vorhandenen Bakterien konserviert sind. Der Balken gibt 10 % Sequenzdivergenz an.

C.2.: *In situ* Detektion von Listerien, Salmonellen und *Campylobacter*

C.2.1.: *In situ* Detektion von Listerien

C.2.1.1.: Verwendete Sonden und deren Spezifität zur Detektion von Listerien

Für die Detektion von Listerien durch fluoreszierende *in situ* Hybridisierung wurden zwei gegen die 16S-rRNS gerichtete Gensonden konstruiert. Die Sonde Lis-1255 (Bindungsposition 16S-rRNS in *E. coli* nach Brosius *et al.*, 1981, 1255-1272) wurde ursprünglich als Primer für die Detektion von Listerien durch PCR verwendet (Wang *et al.*, 1992), konnte aber sehr gut für die *in situ* Detektion von Listerien eingesetzt werden. Diese Sonde erfaßt neben allen sechs bisher bekannten Arten der Gattung *Listeria* auch die beiden Nicht-Zielorganismen *Brochotrix thermosphacta* und *Brochotrix campestris*. Aus diesem Grund und um den Mehrfachsondenkonzept Folge zu leisten, wurde eine zweite Sonde konstruiert. Die Sonde Lis-637 (Bindungsposition 16S-rRNS in *E. coli* nach Brosius *et al.*, 1981, 637-658) erfaßt fünf Vertreter der Gattung *Listeria* aber nicht *L. grayi*. Dies ist vertretbar, da *L. grayi* zum einen nicht pathogen für Mensch und Tier ist und zum anderen sehr selten als Kontamination in Lebensmitteln auftritt. Abbildungen C.3. und C.4. zeigen die Sondensequenz und die jeweiligen Sondenbindungsstellen von Ziel- und Nicht-Zielorganismen mit ihren Basenfehlpaarungen zu den beiden Sonden.

Oligonukleotidsonde Lis-1255

Sondensequenz	5´-ACCTCGCGGCTTCGCGAC-3´
Sondenzielregion	5´-GUCGCGAAGCCGCGAGGU-3´
<i>Listeria monocytogenes</i>	-----
<i>Listeria innocua</i>	-----
<i>Listeria welshimeri</i>	-----
<i>Listeria seeligeri</i>	-----
<i>Listeria ivanovii</i>	-----
<i>Listeria grayi</i>	-----
<i>Brochothrix thermosphacta</i>	-----
<i>Brochothrix campestris</i>	-----
<i>Desulfonatronovibrio hydrogenophila</i>	-----g-----
<i>Shewanella putrefaciens</i>	==u-----
<i>Shewanella alga</i>	==u-----
<i>Shewanella amazonensis</i>	==u-----
<i>Shewanella woodyi</i>	==u-----

Abbildung C.3.: Sequenzvergleich der Sondensequenz und der Bindungsregion der Sonde Lis-1255 mit allen im Datensatz der TU-München (Dr. Ludwig, Stand 2000) vorhandenen Arten durch das im Softwarepaket ARB implementierte Programm „probe-match“.

Die Oligonukleotidsonde Lis-637

Sondensequenz	5´-CACTCCAGTCTTCCAGTTTCC-3´
Sondenbindungsstelle	5´-GGAAACUGGAAGACUGGAGUG-3´
<i>Listeria monocytogenes</i>	-----
<i>Listeria innocua</i>	-----
<i>Listeria welshimeri</i>	-----
<i>Listeria seeligeri</i>	-----
<i>Listeria ivanovii</i>	-----
<i>Enterococcus gallinarum</i>	-----g=====N-----
<i>Enterococcus casseliflavus</i>	-----g=====N-----
<i>Enterococcus faecium</i>	-----g=====N-----
<i>Enterococcus durans</i>	-----g=====N-----
<i>Pediococcus acidilactici</i>	-----g=====N-----
<i>Bacillus mycoides</i>	-----g=====N-----

Abbildung C.4.: Sequenzvergleich der Sondensequenz und der Bindungsregion der Sonde Lis-637 mit allen im Datensatz der TU-München (Dr. Ludwig, Stand 2000) vorhandenen Arten durch das im Softwarepaket ARB implementierte Programm „probe-match“.

Die optimalen Hybridisierungsbedingungen wurden mit Reinkulturen von Ziel- und Nicht-Zielorganismen durch Hybridisierung mit aufsteigenden Formamidkonzentrationen im Hybridisierungspuffer eingestellt. Für beide Sonden wurden als Zielorganismen Ethanolfixative aller 13 bekannten Serovarianten von *L. monocytogenes* und aller *Listeria*

Arten, als Nicht-Zielorganismus wurde für die Sonde Lis-1255 *Shewanella alga* und für die Sonde Lis-637 *Enterococcus gallinarum* und *Enterococcus casseliflavus* verwendet.

Dabei zeigten alle untersuchten *L. monocytogenes*-Stämme und *Listeria*-Arten unter optimalen Hybridisierungsbedingungen mit der Sonde Lis-1255 starke fluoreszierende Signale. Die Sonde Lis-637 detektierte ebenfalls alle getesteten Listerien außer *L. grayi* mit hoher Signalstärke. Eine Mischung aus *L. monocytogenes* RIII und *L. grayi* wurde mit den Sonden Lis-1255-Fluos und Lis-637-Cy3 hybridisiert. Der Stamm *L. monocytogenes* RIII ist eine Rauhmutter, in der die Querwände bei der Zellteilung nicht mehr getrennt werden können. Diese Mutante zeigt somit ein fadenartiges Wachstum. *L. grayi* dagegen liegt als Einzelzelle vor. Durch Verwendung dieser beiden Stämme bei der *in situ* Hybridisierung konnten die Sondersignale leicht zugeordnet werden (Abbildungen C.5., E und F). Die beiden Sonden Lis-1255 und Lis-637 sollten bei 40 % Formamid im Hybridisierungspuffer für *in situ* Hybridisierungen bei 46°C eingesetzt werden. Unter diesen Bedingungen zeigen die beiden getesteten *Enterococcus* Arten sowie *Shewanella alga* nach Hybridisierung keine bis sehr schwache Signale.

C.2.1.2.: *In situ* Detektion von Listerien mit Polyribonukleotidsonden.

In der vorliegenden Arbeit konnten weder auf 16S noch auf der 23S-rRNS Sondenbindungsstellen gefunden werden, die es erlaubte, *L. monocytogenes* von *L. innocua* *in situ* mit Oligonukleotidsonden zu differenzieren. Es konnten zwar Bereiche auf der 16S-rRNS gefunden werden, die es erlauben sollten, diese beiden Organismen unter Verwendung diverser Kompetitoren zu detektieren (Daten nicht gezeigt), jedoch zeigten sich die ausgewählten Regionen nicht zugänglich für fluoreszenzmarkierte Oligonukleotidsonden. Darum wurde versucht, mit Polyribonukleotidsonden, die gegen die Domäne III der 23S-rRNS gerichtet sind, *L. monocytogenes* von *L. innocua* *in situ* zu differenzieren. Durch PCR [B.1.10.] wurde ein Teil der Domäne III der 23S-rDNS von *L. monocytogenes* EGD sv 1/2a und *L. innocua* sv 6a mit dem Primerpaar 1370V/1606R [B.1.10.2.] amplifiziert und das erhaltene Amplifikat in einen Sequenziervektor kloniert, der die Promotorsequenz für eine T7-RNS-Polymerase trug. Durch Sequenzierung wurde die Orientierung des „inserts“ bestimmt. Nach Linearisierung des Vektors auf der promotorabgewandten Seite mittels Hydrolyse durch die Restriktionsendonuklease *Bam*HI konnte durch *in vitro*-„run-off“ Transkription [B.1.15.] unter Verwendung von markierten Ribonukleotiden sowohl eine mehrfach DIG-markierte Polyribonukleotidsonde in „antisense“, als auch in „sense“

Orientierung hergestellt werden. Eine Diskriminierung zwischen *L. innocua* und *L. monocytogenes* gelang jedoch nicht, da sich die Sondenbindungsstellen der beiden Organismen lediglich in einer Position unterscheiden. Für eine *in situ* Detektion von Listerien konnten diese Sonden jedoch verwendet werden. Abbildungen C.5. G bis H zeigen die Ergebnisse nach Hybridisierung mit einer mehrfach DIG markierten Polyribonukleotidsonde in „sense“ und „antisense“ Orientierung. Die Zellen wurden zur Erhöhung der Permeabilität für Gensonden 15 min mit 10 µl LysozymbLösung [B.1.1.] bei RT und anschließend für 5 min mit 10 µl Proteinase-K-Lösung [B.1.1.] bei RT behandelt.

C.2.1.3.: *In situ* Detektion von Listerien in Rohmilch nach Selektivanreicherung

Listerien spielen vor allem in der milchverarbeitenden Industrie als humanpathogene Kontaminanten eine wichtige Rolle (Farber und Peterkin, 1991). Vor allem in der Weichkäseproduktion lassen sich immer wieder Proben finden, die mit Listerien belastet sind. Aber auch aus kontaminierter Rohmilch lassen sich Listerien isolieren. Milchkühe können an einer durch *L. monocytogenes* oder *L. ivanovii* verursachten Mastitis, einer Entzündung des Euters, leiden. In der vorliegenden Arbeit wurden fünf Rohmilchproben von verschiedenen landwirtschaftlichen Betrieben auf eine Kontamination mit Listerien untersucht. In direkt nach der Probenahme fixierter Rohmilch konnten bei keiner Listerien *in situ* detektiert werden. Aus diesem Grund wurden Anreicherungskulturen wie in [B.1.3.3.] beschrieben angelegt. Nach 1, 2, und sieben Tagen wurde ein Aliquot entnommen und für die *in situ* Hybridisierung mit Ethanol fixiert [B.1.4.2.]. Vier Proben zeigten nach sieben Tagen Selektivanreicherung und *in situ* Hybridisierung der Fixative keine Kontamination mit Listerien an. Diese Proben zeigten auch nach zwei Tagen Inkubation in „FRASER-Anreicherungsbouillon“ mit Selektivsupplement [B.1.3.3.] keine Schwarzfärbung durch Äsculinhydrolyse an und konnten somit als „Listerien-frei“ angesehen werden. Bei einer Probe konnten jedoch bereits nach zwei Tagen Listerien *in situ* nachgewiesen werden. Bei den Abbildungen C.6. A und B sind die Ergebnisse zusammengefaßt. In Abbildung C.5. C und D ist die *in situ* Detektion von Listerien in Rohmilch nach sieben Tagen Selektivanreicherung gezeigt.

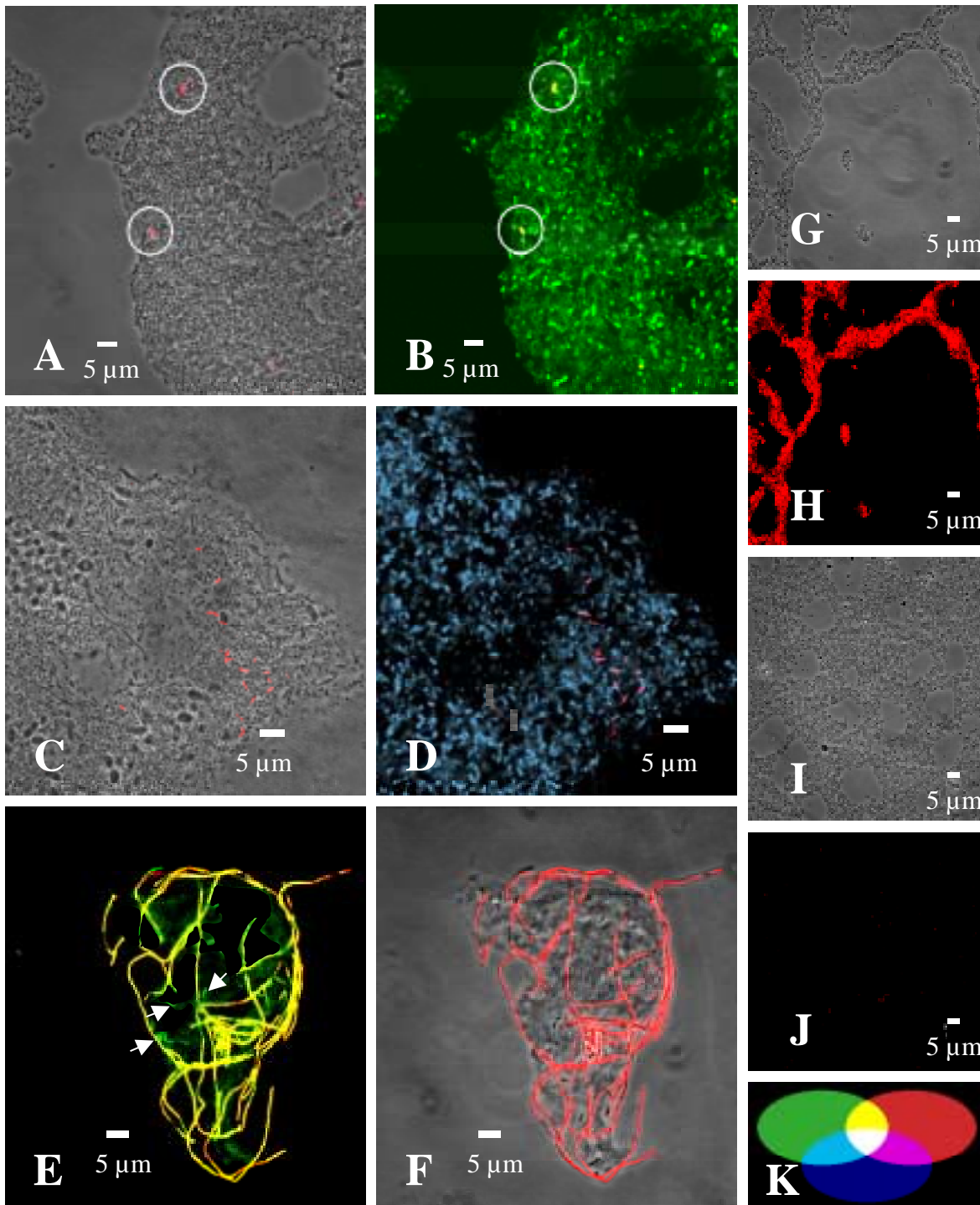


Abbildung C.5.: **A, B** = *In situ* Hybridisierung einer Rohmilchanreicherung nach zwei Tagen mit den Sonden EUB-338-mix-FluosPrime und Lis-637-Cy3, Vergrößerung 1.000 fach. **A** = Phasenkontrastbild und Überlagerung mit dem Fluoreszenzsignal der Sonde Lis-637-Cy3; **B** = Fluoreszenzbild des gleichen Bildausschnittes wie bei **A** durch Überlagerung der Sondensignale von Eub-338-mix-FluosPrime und Lis-637-Cy3; **C, D** = *In situ* Hybridisierung einer Rohmilchanreicherung nach sieben Tagen mit den Sonden EUB-338-mix-Cy5 und Lis-637-Cy3, Vergrößerung 1.000 fach; **C** = Phasenkontrastbild und Überlagerung der Fluoreszenzsignale der Sonden Lis-637-Cy3; **D** = Fluoreszenzbild des gleichen Bildausschnittes wie bei **C** durch Überlagerung der Sondensignale von Eub-338-mix-Cy5 und Lis-637-Cy3; **E, F** = *In situ* Hybridisierung eines künstlichen Gemisches aus *Listeria monocytogenes* Stamm RIII TUMLis36 und *Listeria grayi* TUMLis1 mit den Sonden Lis-1255-Fluos und Lis-637-Cy3; **E** = Überlagerung des Fluoreszenzsignals der Sonden Li-1255-Fluos und Lis-637-Cy3; **F**: Phasenkontrastbild des gleichen Bildausschnittes wie bei **E** und Überlagerung mit den Sondensignalen der Sonde Lis-637-Cy3, Vergrößerung 1.000 fach; **G, H, I, J** = *In situ* Hybridisierung von *Listeria*

monocytogenes Stamm EGD sv 1/2a TUMLi18 mit mehrfach DIG-markierten Polyribonukleotidsonden und anschließender Detektion mit anti-DIG-POD-F_{ab}-Fragmenten und dem TSA-System; **G** = Phasenkontrastbild; **H** = Fluoreszenzbild des gleichen Bildausschnittes wie bei **G** mit einer mehrfach DIG-markierten Polyribonukleotidsonde in „*antisense*“ Orientierung mit 95 % Formamid im Hybridisierungspuffer bei 52°C Hybridisierungstemperatur; **I** = Phasenkontrastbild; **J** = Fluoreszenzbild des gleichen Bildausschnittes wie bei **I** nach Hybridisierung mit einer mehrfach DIG-markierten Polyribonukleotidsonde in „*sense*“ Orientierung unter den gleichen Hybridisierungs- und Detektionsbedingungen am CLSM wie bei **H**.

C.2.2.: *In situ* Detektion von Salmonellen

C.2.2.1.: Verwendete Sonden und deren Spezifität zur Detektion von Salmonellen

Für die *in situ* Detektion von *Salmonella* spp. wurde eine gegen die 23S-rRNS gerichtete Sonde verwendet. Die Sonde Salm-63 (Bindungsposition *E. coli* 23S-rRNS, 1742-1760, Dr. Ludwig, unveröffentlicht) erfaßt alle im Datensatz der TU-München (Dr. Ludwig, Stand 2000) vorhandenen Sequenzdaten der 23S-rRNS von Salmonellen. Eine zusätzliche Sequenzanalyse der Sondenbindungsstelle der 23S-rRNS aller sieben *Salmonella enterica* Unterarten [B.1.2.] zeigte ebenfalls keine Basenfehlpaarungen zur Sonde Salm-63. Daneben wird aber auch *Plesiomonas shigelloides* von der Sonde detektiert. Abbildung C.6. zeigt die von der Sonde erfaßten Mikroorganismen und Organismen, die bis zu einer Basenfehlpaarung in ihrer 23S-rRNS Zielregion zur Sonde haben.

Oligonukleotidsonde Salm-63

Sondensequenz	5´-TCGACTGACTTCAGCTCC-3´
Sondenbindungsstelle	5´-GGAGCUGAAGUCAGUCGA-3´
<i>Salmonella</i> ser. <i>typhimurium</i>	-----
<i>Salmonella</i> ser. <i>typhi</i>	-----
<i>Salmonella</i> ser. <i>dublin</i>	-----
<i>Salmonella</i> spp. <i>bongori</i>	-----
<i>Salmonella</i> spp. <i>arizonae</i>	-----
<i>Salmonella</i> spp. <i>indiana</i>	-----
<i>Salmonella enterica</i> Unterart I <i>enterica</i>	-----
<i>Salmonella enterica</i> Unterart II <i>salamae</i>	-----
<i>Salmonella enterica</i> Unterart IIIa <i>arizonae</i>	-----
<i>Salmonella enterica</i> Unterart IIIb <i>diarizonae</i>	-----
<i>Salmonella enterica</i> Unterart IV <i>houtenae</i>	-----
<i>Salmonella enterica</i> Unterart V <i>bongori</i>	-----
<i>Salmonella enterica</i> Unterart VI <i>indica</i>	-----
<i>Plesiomonas shigelloides</i>	-----
<i>Escherichia coli</i>	-----A-----
<i>Vibrio cholerae</i>	-----A-----
<i>Citrobacter freundii</i>	-----A-----
<i>Enterobacter cloacae</i>	-----A-----

Abbildung C.6. Sondensequenz und Sondenbindungsregion der Sonde Salm-63 von Ziel- und Nicht-Zielorganismen bis zu einer Basenfehlpaarung in der Bindungsregion.

Der optimale Einsatz der Sonde für die Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung wurde durch Anlegen von Formamidreihen bestimmt. Dazu wurde der Stamm *S. typhimurium* LT2 als Zielorganismus verwendet. Als Nicht-Zielorganismus zur Sonde Salm-63 dienten zwei *Citrobacter freundii* Stämme und *Enterobacter cloacae*. Die Sonde Salm-63 sollte bei 35-40 % Formamid im Hybridisierungspuffer bei 46°C Hybridisierungstemperatur eingesetzt werden. Unter diesen Hybridisierungsbedingungen zeigte der Stamm *Salmonella typhimurium* LT2 starke fluoreszierende Signale, während Hybridisierungen der verwendeten Nicht-Zielorganismen mit der Sonde Salm-63 keine detektierbaren Fluoreszenzsignale zeigten.

Alle aus Stammsammlungen bezogenen *Salmonella* Stämme [B.1.2.] und Eigenisolate [C.1.2.] konnten durch *in situ* Hybridisierung mit der Sonde Salm-63 detektiert werden und zeigten stets starke fluoreszierende Signale.

C.2.2.2.: *In situ* Detektion von Salmonellen in Bioabfallvergärungsanlagen

In Abschnitt [C.1.2.] wurde die Isolierung von Salmonellen aus Bioabfallvergärungsanlagen beschrieben. Von den jeweiligen Anreicherungskulturen wurden Proben entnommen und mit Ethanol und 4 % Paraformaldehydlösung [B.1.4.1. und B.1.4.2.] fixiert. Durch fluoreszierende *in situ* Hybridisierung mit der Sonde Salm-63 konnten Salmonellen nach Anreicherung in vielen Stufen der Prozeßführung in beiden Anlagen nachgewiesen werden. Ein direkter Nachweis von Salmonellen in nicht angereicherten Proben gelang nicht. Abbildungen C.7. A bis E zeigen zusammenfassend die Ergebnisse des *in situ* Nachweises von Salmonellen in Bioabfallvergärungsanlagen nach Anreicherung in gepuffertem Peptonwasser. Bei den aufgeführten Hybridisierungen wurden stets die Sonden Gam-42a-Cy5 mit Kompetitor Bet-42a-C und Salm-63-Cy3 bei 35 % Formamid im Hybridisierungspuffer bei 46°C Hybridisierungstemperatur eingesetzt. In der vorliegenden Arbeit konnten Salmonellen nach Anreicherung z.B. im angelieferten Bioabfall, im Gärprodukt und im Überstandswasser, das in kommunale Kläranlagen abgeführt wird nachgewiesen werden. Die Probenahmestelle des Gärrückstandes und des Überstandswasser befanden sich nach der Hygienisierungstufe.

C.2.2.3.: Bestimmung des Detektionslimits des Salmonellennachweises durch FISH

Den Betreibern von Bioabfallvergärungsanlagen legt der Gesetzgeber strenge hygienische Vorschriften vor. Unter anderem dürfen in 25 g Probenmaterial nach Anreicherung (siehe [B.1.3.4.]) keine Salmonellen nachgewiesen sein. Aus diesem Grund wurde versucht, die minimale Zeit zu bestimmen, die es erlaubt, Salmonellen durch fluoreszierende *in situ* Hybridisierung zu detektieren. Für dieses Experiment wurde der nicht pathogene Laborstamm *S. typhimurium* LT2 verwendet. Von einer Reinkultur wurde durch Plattenverdünnungsreihen die Zellzahl bestimmt. Durch Verdünnung der Zellsuspension wurde versucht in 25 g Gartenerde (Endprodukt nach der Nachrotte der Gärrückstände) mit einer *Salmonella* Zelle zu beimpfen. Die Zellkonstanz des verwendeten *Salmonella* Stammes bei Lagerung in Flüssigkultur bei 4°C wurde durch Anlegen von Plattenverdünnungsreihen in Triplikaten nach einem und zwei Tagen Lagerung überprüft. Die bestimmten Zellzahlen waren in der Originalzellsuspension und nach ein und zwei Tagen Lagerung bei 4°C nahezu identisch (Adamczyk, 2000). Zur Überprüfung der Abwesenheit von Salmonellen in der Probe wurde parallel Erde wie in [B.1.3.1.] beschrieben behandelt. In dieser Negativprobe konnten nach

Durchführung der gesamten Anreicherungsprozedur [B.1.3.4.] keine Salmonellen nachgewiesen werden.. Dieser Ansatz wurde in 225 ml gepuffertes Peptonwasser überführt und bei 37°C inkubiert. Zur Bestimmung der Detektionseffizienz des *Salmonella*-Nachweises mit fluoreszierenden Gensonden wurde nach 10 h Inkubation alle zwei Stunden ein Aliquot entnommen, fixiert [B.1.4.1.] und mit der Sonde Salm-63 hybridisiert. Nach 18 h Stunden konnten bereits Salmonellen *in situ* nachgewiesen werden. Durch ein ähnlich durchgeführtes Experiment, in einer im Arbeitskreis angefertigten Diplomarbeit (Adamczyk, 1999), mit autoklavierter Gartenerde konnte ebenfalls theoretisch eine angeimpfte *Salmonella* Zelle nach 18 h Voranreicherung in gepuffertem Peptonwasser durch fluoreszierende *in situ* Hybridisierung nachgewiesen werden. Eine *Salmonella* Zelle in 25 g Probenmaterial kann also einschließlich Hybridisierungsprozedur theoretisch nach einem Tag nachgewiesen werden. Abbildung C.7. F zeigt die Ergebnisse der Hybridisierung nach 18 h Anreicherung in Peptonwasser mit den Sonden Salm-63 und Eub-338-mix-FluosPrime bei 2.000 facher Vergrößerung.

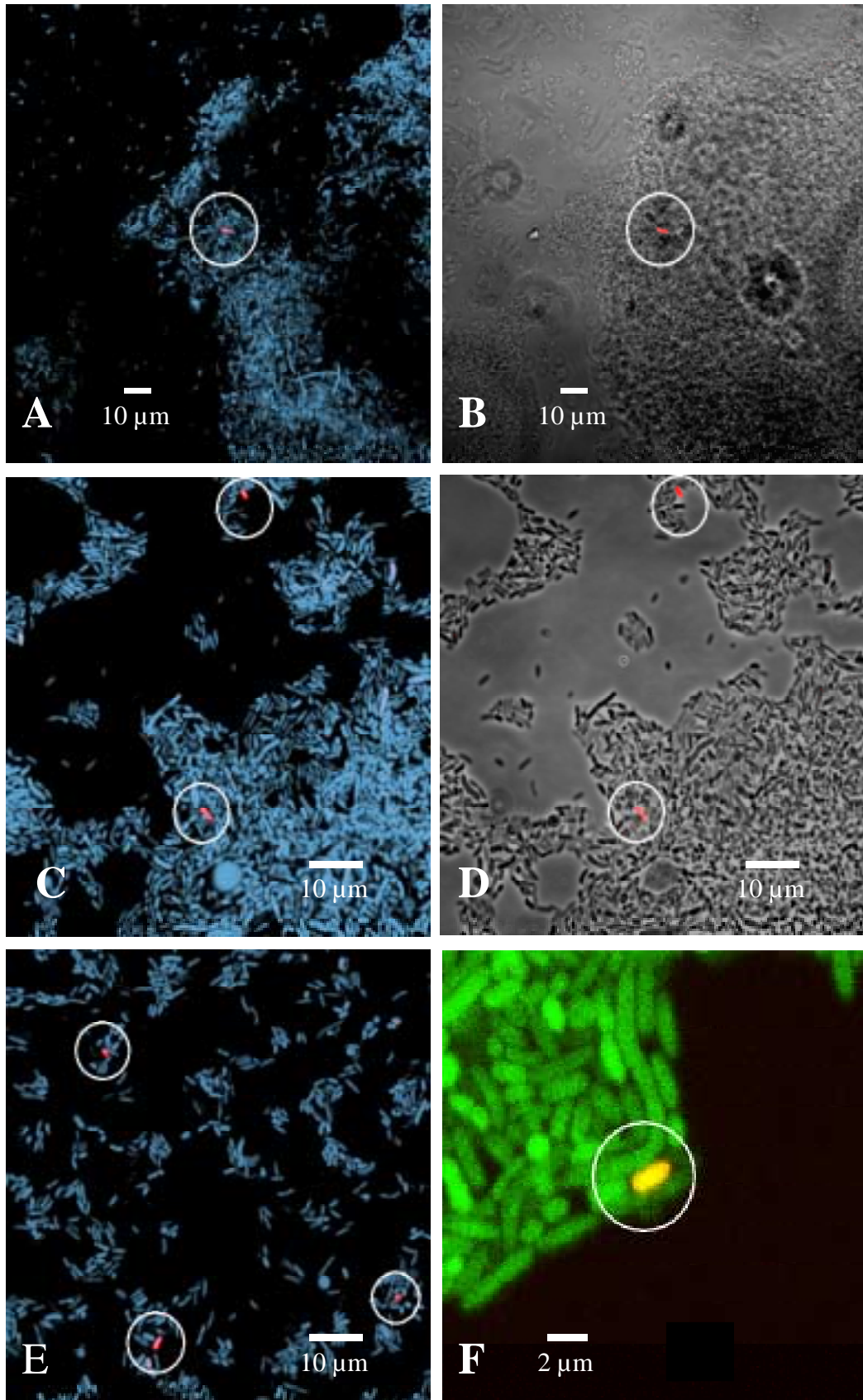


Abbildung C.7.: **A, B** = *In situ* Hybridisierung von Speiseresten nach drei Tagen Anreicherung in Peptonwasser mit den Sonden Gam-42a-Cy5 und Salm-63-Cy3; **A** = Überlagerung der Fluoreszenzsignale der beiden Sonden Salm-63-Cy3 und Gam-42a-Cy5; **B** = Überlagerung des Phasenkontrastbildes und des Fluoreszenzsignals der Sonde Salm-63-Cy3 des gleichen Bildausschnittes wie bei A; **C, D** = *In situ* Hybridisierung einer Probe des Gärrückstandes nach drei Tagen Anreicherung in Peptonwasser mit den Sonden Gam-42a-Cy5 und Salm-63-Cy3 **C**= Überlagerung der Fluoreszenzsignale der beiden Sonden Salm-63-Cy3 und Gam-42a-Cy5. **D** = Überlagerung des Phasenkontrastbildes und des Fluoreszenzsignals der Sonde Salm-63-Cy3 des gleichen Bildausschnittes wie bei C. **E** = *In situ* Hybridisierung von Überstandswasser nach drei Tagen Anreicherung in Peptonwasser mit den Sonden Gam-42a-Cy5 und Salm-63-Cy3, Überlagerung der Fluoreszenzsignale der beiden Sonden Salm-63-Cy3 und Gam-42a-Cy5. **F** : *In situ* Hybridisierung mit den Sonden Eub-338-mix-FluosPrime und Salm-63-Cy3 zur Bestimmung des Detektionslimits des *Salmonella* Nachweises durch FISH.

C.2.3.: *In situ* Detektion von *Campylobacter*

C.2.3.1.: Verwendete Sonden und deren Spezifität zur Detektion von *Campylobacter*

Die Vertreter der Gattung *Campylobacter* werden vereinfacht in thermotolerante und nicht-thermotolerante Arten unterteilt. Zu den thermotoleranten *Campylobacter* Arten zählen die Arten *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari* und *C. upsaliensis* (van Doorn, *et al.*, 1999). Zu den nicht-thermotoleranten *Campylobacter* Arten zählen unter anderem die Arten *C. fetus*, *C. sputorum* subsp. *veneralis*, *C. sputorum* subsp. *bubulus* und *C. sputorum* biovar. *fecalis*. In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Sonden zur *in situ* Detektion von *Campylobacter* verwendet (Meier, persönliche Mitteilung) und modifiziert Es wurde zum einen die Sonde Camp-653 (Bindungsposition 16S-rRNS in *E. coli* nach Brosius *et al.*, 1981, 653-671) und zum anderen Cajeco-1427 (Bindungsposition 23S-rRNS in *E. coli*, 1981, 1427-1445) eingesetzt. Die Spezifität der Sonden wurde durch Hybridisierung von Ziel- und Nicht-Zielorganismen zur Sonde mit aufsteigenden Formamidreihen bestimmt. Als Zielorganismen der Sonde Camp-653 wurden alle in der vorliegenden Arbeit verwendeten *Campylobacter* Arten getestet [B.1.2.] Sie zeigten stets starke, fluoreszierende Signale. Als Nicht-Zielorganismen der Sonde Camp-653 wurde zwei klinische Isolate von *Helicobacter pylori* eingesetzt. Unter stringenten Bedingungen zeigten die beiden *H. pylori* Stämme keine detektierbaren Fluoreszenzsignale. Abbildung C.8. zeigt die Sondensequenz der Sonde Camp-653 und die Sondenbindungsregion von Zielorganismen und die Basenfehlpaarungen von Nicht-Zielorganismen zur Sonde. Die Sonde Camp-653 Sollte bei 30 % Formamid Im Hybridisierungspuffer bei 46°C Hybridisierungstemperatur eingesetzt werden.

Oligonukleotidsonde Camp-653

Sondensequenz	5´-CTGCCTCTCCCTYACTCT´-3´
Sondenbindungsstelle	5´-AGAGURAGGGAGAGGCAG-3´
<i>Campylobacter curvus</i>	-----
<i>Campylobacter concisus</i>	-----
<i>Campylobacter mucosalis</i>	-----
<i>Campylobacter fetus</i>	-----
<i>Campylobacter hyointestinalis</i>	-----
<i>Campylobacter upsaliensis</i>	-----
<i>Campylobacter helveticus</i>	-----
<i>Campylobacter jejuni</i>	-----
<i>Campylobacter hyoilei</i>	-----
<i>Campylobacter coli</i>	-----
<i>Campylobacter lari</i>	-----
<i>Campylobacter curvus</i>	-----
<i>Campylobacter sputorum</i>	-----
<i>Campylobacter gracilis</i>	-----
<i>Campylobacter showae</i>	-----
<i>Campylobacter rectus</i>	-----
<i>Campylobacter sputorum</i>	-----
<i>Helicobacter acinonychis</i>	-g=====U=====N==-
<i>Helicobacter pylori</i>	-----=U=====u==-
<i>Helicobacter nemestrinae</i>	-----=U=====u==-
<i>Helicobacter felis</i>	-----=U=====u==-

Abbildung C.8.: Sequenz der Sonde Camp-653 und die Bindungspositionen der Zielorganismen, sowie die Basenfehlpaarungen zur Sonde der Nicht-Zielorganismen. R = G oder A, Y = C oder T

Zur *in situ* Detektion der thermotoleranten Vertreter der Gattung *Campylobacter* wurde die Sonde Cajeco-1427 eingesetzt. Getestet wurde diese Sonde an Fixativen der Arten *C. coli*, *C. jejuni*, *C. lari* und *C. upsaliensis*. Alle Arten zeigten nach Hybridisierung starke Hybridisierungssignale. Abbildung C.9. zeigt die Sondensequenz der Sonde Cajeco-1427 und die Sondenbindungsregion von Zielorganismen und die Basenfehlpaarungen von Nicht-Zielorganismen zur Sonde.

Oligonukleotidsonde Cajeco-1427

Sondensequenz	5´-AGCCCTAAGCGTCCTTCC-3´
Sondenbindungsstelle	5´-GGAAGGACGCUUAGGGCU-3´
<i>Campylobacter coli</i>	CGAU-=====-AAGG
<i>Campylobacter jejuni</i>	CGAU-=====-AAGG
<i>Campylobacter lari</i>	CGAU-=====-AAGC
<i>Campylobacter hyoilei</i>	CGAU-=====-AAGG
<i>Campylobacter upsaliensis</i>	CGAU-=====-AAGG
<i>Campylobacter mucosalis</i>	CGAU-=====-A=u--AAAG
<i>Campylobacter concisus</i>	CGAU-=====-A=u--AAGC
<i>Wolinella succinogenes</i>	CGAC-==gg=====A=====u--AAAC

Abbildung C.9.: Sondensequenz und Sondenbindungsstellen der Ziel- und Nicht-Zielorganismen zur gegen die 23S-rRNS gerichteten Sonde Cajeco-1427 mit Ihren Basenfehlpaarungen zur Sonde.

Abbildung C.9. A und B zeigt die Ergebnisse der Hybridisierung einer artifiziellen Mischung von *C. jejuni* (thermotolerant) und *C. fetus* (nicht-thermotolerant) mit den Sonden Eub-338-mix-Cy5, Camp-653-Cy3 und Cajeco-1427-Fluos. In Abbildung C.9.; E sind die Ergebnisse einer *in situ* Hybridisierung eines artifiziellen Gemisches aus *C. coli*, *L. monocytogenes* EGD sv 1/2a und *Legionella pneumophila* Stamm Philadelphia mit den Sonden Legpne1-Cy5, Lis-1255-Cy3 und Camp-653-Fluos zusammengefaßt.

C.2.3.2.: In situ Detektion von *Campylobacter* in roher Hühnerleber

1 g käuflich erworbene Hühnerleber wurde mit 10 ml 1 x PBS-Puffer versetzt und mechanisch homogenisiert. Dieser Zellbrei wurde mit 4% Paraformaldehydlösung [B.1.4.1.] fixiert. Abweichend zum Standardfixierungsprotokoll wurde vier mal mit 10 ml 1 x PBS Lösung gewaschen bevor die Suspension in EtOH_{abs}/H₂O_{reinst} aufgenommen wurde. Ohne Anreicherungsschritte konnten thermotolerante *Campylobacter* Arten direkt in der homogenisierten und fixierten Hühnerleber nachgewiesen werden. Die gleichen Ergebnisse konnten nach schneiden der Hühnerleber mit einem Kryomikrotom erzielt werden. Die Abbildungen C.10. C und D zeigen eine Hybridisierung eines 10 µm dicken Kryoschnittes einer fixierten Hühnerleber mit den Sonden Camp-653-Cy3 und Cajeco-1427-Fluos bei 400 facher Vergrößerung. Die Abbildungen C.10., F und G zeigen die Hybridisierung homogenisierter und fixierter Hühnerleber mit den Sonden Camp-653-Cy3 und Cajeco-1427-Fluos.

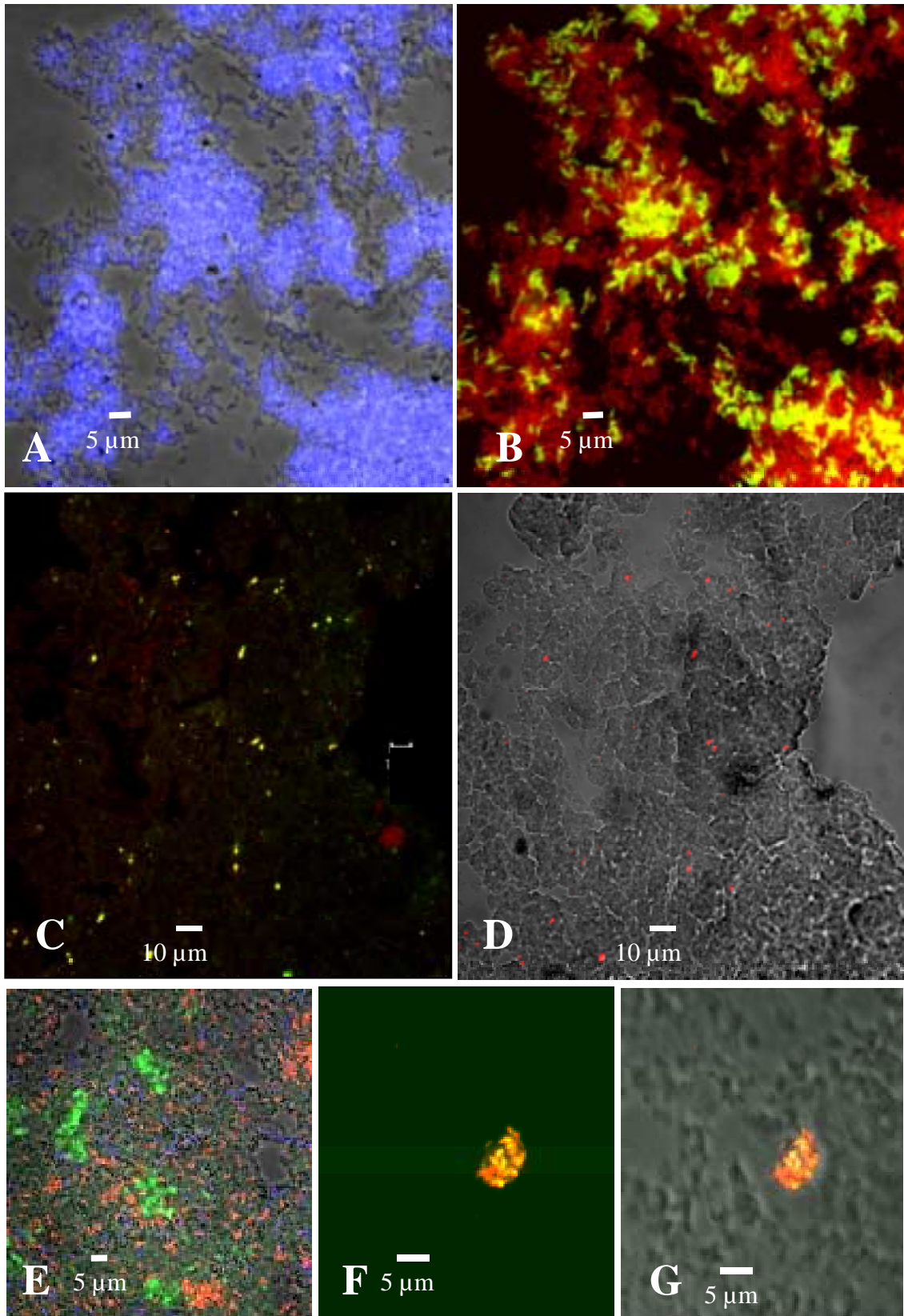


Abbildung C.10.: **A, B** = *In situ* Hybridisierung eines artifiziellen Gemisches aus *Campylobacter jejuni* und *Campylobacter fetus* mit den Sonden EUB-338-mix-Cy5, Camp-653-Cy-3 und Cajeco-1427-Fluos, Vergrößerung 1.000 fach; **A** = Phasenkontrastbild und Überlagerung mit dem Fluoreszenzsignal der Sonde EUB-338-mix-Cy5; **B** = Fluoreszenzbild des gleichen Bildausschnittes wie bei **A** durch

Überlagerung der Sondersignale von Camp-653-Cy3 und Cajeco-1427-Fluos; **D** = *In situ* Hybridisierung eines 10 µm dicken Cryoschnittes einer Hühnerleber mit den Sonden Camp-653-Cy3 und Cajeco-1427-Fluos; **C** = Phasenkontrastbild und Überlagerung des Fluoreszenzsignals der Sonde Camp-653-Cy3; **D**: Fluoreszenzbild des gleichen Bildausschnittes wie bei C durch Überlagerung der Sondersignale von Camp-653-Cy3 und Cajeco-1427-Fluos, Vergrößerung 400 fach; **E**: *In situ* Hybridisierung eines artifiziellen Gemisches aus *Campylobacter coli*, *Listeria monocytogenes* Stamm EGD sv 1/2a und *Legionella pneumophila* Stamm Philadelphia mit den Sonden Legpne1-Cy5, Lis-1255-Cy3 und Camp-653-Fluos. Alle drei Fluoreszenzkanäle sind hier mit dem Phasenkontrastbild übereinandergelagert, Vergrößerung 1.000 fach; **F**, **G** = *In situ* Hybridisierung einer mechanisch homogenisierten Hühnerleber mit den Sonden Camp-653-Cy3 und Cajeco-1427-Fluos; **F** = Überlagerung der Fluoreszenzsignale der beiden Sonden; **G** = Überlagerung der Fluoreszenzsignale der beiden Sonden mit dem Phasenkontrastbild des gleichen Bildausschnittes. Vergrößerung 2.000 fach.

C.3.: Untersuchungen zur Evolution des „Virulenzgenclusters“ von allen bekannten *Listeria* Arten durch vergleichende Sequenzanalyse

Der humanpathogene Vertreter der Gattung *Listeria*, *Listeria monocytogenes*, besitzt eine Vielzahl von Virulenzfaktoren, die zum Teil in direkter Nachbarschaft auf dem Chromosom lokalisiert sind und das sogenannte „Virulenzgencluster“ bilden (Kuhn und Goebel, 1995). Dieser wird von den lebenswichtigen Genen *prs* und *ldh* flankiert (Abbildung C.11. und Tabelle C.3.). Diese Virulenzfaktoren wurden in der letzten Dekade eingehend charakterisiert und waren bzw. sind Gegenstand intensiver Forschung (Bohne *et al.*, 1996; Brehm *et al.*, 1996; Cossart und Lecuit, 1998; Goebel *et al.*, 1993). Interesse besteht vor allem darin, die Funktionsweise der unterschiedlichen Virulenzgene, deren Regulation und deren Zusammenwirken mit anderen Virulenzfaktoren zu untersuchen und somit die Lebensweise von fakultativ intrazellulär lebenden Bakterien besser zu verstehen. Neben *L. monocytogenes* besitzt der ausschließlich tierpathogene Organismus *L. ivanovii* eine ähnliche Anhäufung von Virulenzgenen, die ebenfalls in direkter Nachbarschaft auf dem Chromosom lokalisiert sind. Überraschenderweise besitzt ein nicht pathogener Vertreter der Gattung *Listeria*, *L. seeligeri*, innerhalb dieser flankierenden *prs* und *ldh* Gene nicht nur die Gene, welche im „Virulenzgencluster“ von *L. monocytogenes* lokalisiert sind, sondern zusätzlich noch fünf weitere. Betrachtet man diesen Bereich des Genoms der anderen drei Vertretern der Gattung *Listeria*, *L. innocua*, *L. welshimeri* und *L. grayi*, so findet man auch hier eine mehr oder weniger hohe Anzahl an Genen, die von den Genen *prs* und *ldh* flankiert werden.

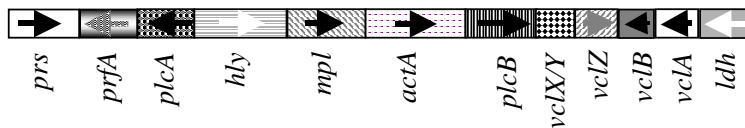
Ziel der vorliegenden Arbeit war es, ausgehend von Sequenzdaten der Virulenzgene, die von Eva Ng vom Lehrstuhl für Mikrobiologie des Theodor-Boveri-Instituts für Biowissenschaften der Universität Würzburg zur Verfügung gestellt wurden und Sequenzdaten anderer Virulenzgene, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit bestimmt wurden, durch detaillierte

vergleichende Sequenzanalyse, ein Szenario zur Evolution des „Virulenzclusters“ der *Listeria* Arten zu erstellen.

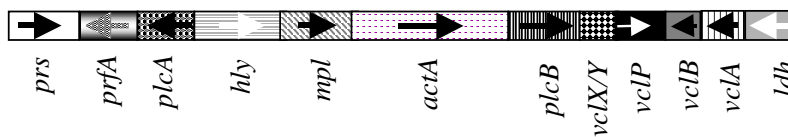
C.3.1.: Anordnung der Gene im „Virulenzcluster“

Die folgende schematische Darstellung [Abb. C.11.] gibt nach jetzigem Kenntnisstand einen Überblick über die Anordnung der einzelnen Gene der bekannten *Listeria* Arten, die sich im „Virulenzcluster“ befinden wieder. Die Funktion der Virulenzgene ist soweit bekannt, in Tab. C.3. zusammengefaßt.

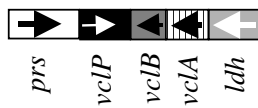
L. monocytogenes



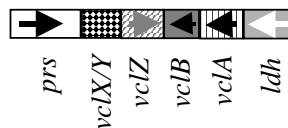
L. ivanovii



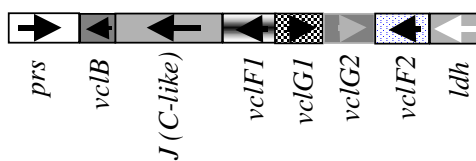
L. welshimeri



L. innocua



L. grayi



L. seeligeri

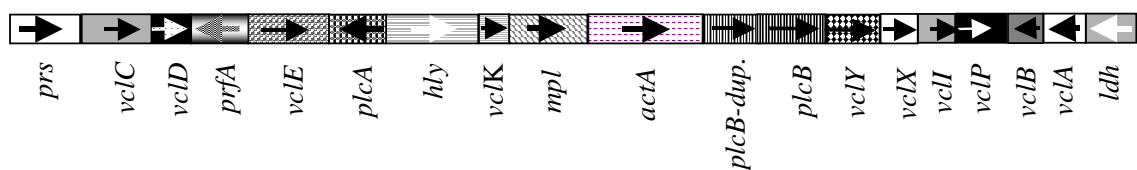


Abbildung C.11.: Anordnung der Gene des Virulenzclusters und der Gene, die sich innerhalb der flankierenden *prs* und *ldh* Gene bei den *Listeria* Arten befinden.

Tabelle C.3.: Funktion der Gene im „Virulenzgencluster“, soweit dies bekannt ist.

Gen	Funktion
<i>actA</i>	ActA Protein, Actin Polymerisation
<i>hly</i>	Listeriolysin O, Hämolyisin
<i>ldh</i>	Lactatdehydrogenase
<i>mpl</i>	Metalloprotease
<i>plcA</i>	Phosphatidylserin-spezifische Phospholipase C
<i>plcB</i>	Phosphatidylcholin-spezifische Phospholipase C
<i>prfA</i>	Transkriptionsregulator
<i>prs</i>	Ribosephosphat-Pyrophosphokinase
<i>vclA</i>	unbekannt
<i>vclB</i>	unbekannt
<i>vclC</i>	unbekannt
<i>vclD</i>	hypothetische Zuckerisomerase
<i>vclF1</i>	Transkriptionsregulator der MerR-Familie
<i>vclF2</i>	Transkriptionsregulator der MerR-Familie
<i>vclG1</i>	hypothetische Oxyacylreduktase
<i>vclG2</i>	hypothetische Oxyacylreduktase
<i>vclI</i>	unbekannt
<i>vclJ</i>	unbekannt
<i>vclK</i>	unbekannt
<i>vclP</i>	hypothetische Phosphoesterase
<i>vclX</i>	Unbekannt
<i>vclX/Y</i>	Membrananker wahrscheinlich Signalpeptid
<i>vclY</i>	Unbekannt
<i>vclZ</i>	hypothetisches Lipoprotein

C.3.2.: Verwendete Datensätze

Für vergleichende Sequenzanalysen wurden in der vorliegenden Arbeit Voll- und Teilsequenzen der Gene *prs*, *vclB* (vormals *orfB*), *ldh*, *vclA* (vormals *orfA*), *iap*, 16S-rRNS und 23S-rRNS der einzelnen *Listeria* Arten verwendet. Um eine Verwechslung mit anderen Sequenzdaten, die in öffentlichen Datenbanken abgelegt sind, zu vermeiden, wurden Gene mit bisher unbekannter Funktion nicht mit *orf* („open reading frame“), sondern mit *vcl* („virulence cluster loci“) benannt (Ng *et al.*, 2000). Von allen Genen wurde eine Datenbank erstellt, in welche die Sequenzen in ein „Alignment“ eingepaßt wurden. Primär wurde versucht, für phylogenetische Untersuchungen Gene zu verwenden, die in allen *Listeria* Arten vorhanden sind. Hierzu wurden die Gene *prs*, *ldh* und *vclB* herangezogen. Neben Sequenzen dieser drei Gene, die sich im Virulenzgencluster befinden, wurden noch Sequenzdaten des *iap*-Gens und der 16S- und 23S-rRNS- aller bisher verfügbaren Listerien verwendet. Neben diesen sechs Genen, die im Genom aller *Listeria* Arten vorhanden sind wurden noch Sequenzdaten des *vclA* Gens für vergleichende Sequenzanalysen herangezogen. Dieses Gen kann in allen *Listeria* Arten außer *L. grayi* nachgewiesen werden (siehe Abb. C.11.).

C.3.3.: Phylogenetische Analyse der Sequenzdaten

Mit Hilfe des Programmpakets *ARB* und den darin enthaltenen Unterprogrammen zur Stammbaumberechnung (Strunk, 1993, Strunk, Ludwig, 1997) wurden für alle Gene phylogenetische Bäume und Dendrogramme basierend auf Nukleinsäuresequenzdaten nach der „*Maximum-Likelihood*“ (Felsenstein, 1981), „*Neighbor-Joining*“ (Saitou und Nei, 1987). und „*Maximum-Parsimony*“ Methode sowie Aminosäuresequenzdaten („*Maximum Likelihood*“, „*Neighbor-Joining*“ und „*Fitch-Margoliash*“-Methode) unter Verwendung diverser Sequenzfilter erstellt [B.1.12.]. Tabelle C.4. zeigt die Ergebnisse aller Baumberechnungsverfahren mit den Nukleinsäuresequenzdaten und den verwendeten Genen.

Tabelle C.4.: Ergebnisse der auf Nukleinsäuresequenzdaten basierenden Baumberechnungen, die auf die verschiedenen Sequenzdatensätze angewendet wurden. ML = „*Maximum-Likelihood*“, NJ = „*Neighbor-Joining*“, PAR = „*Maximum-Parsimony*“, k. A. = keine Auflösung. (+) = wird vom Baumberechnungsverfahren unterstützt. (-) = wird von Baumberechnungsverfahren nicht unterstützt.

Gen	<i>L. grayi</i> tiefste Verzweigung innerhalb der Gattung <i>Listeria</i>			<i>L. monocytogenes/ L. innocua</i> gruppieren in einer Linie			<i>L. welshimeri/l. seeligeri/ L. ivanovii</i> gruppieren in einer Linie		
	ML	NJ	PAR	ML	NJ	PAR	ML	NJ	PAR
<i>ldh</i>	+	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>prs</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>vclB</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>vclA</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>iap</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
16S rRNS	+	+	+	+	+	+	k. A.	k. A.	k. A.
16S rRNS	+	+	+	+	+	+	k. A.	k. A.	k. A.

Dabei konnte durch alle Baumberechnungsverfahren und verwendeten Nukleinsäuresequenzdaten nachgewiesen werden, daß *L. grayi* die tiefste Abzweigung innerhalb der Gattung *Listeria* darstellt. Im Laufe der Evolution schienen sich die übrigen fünf Arten in zwei Entwicklungslinien aufgespalten zu haben. Die erste Linie setzt sich aus *L. monocytogenes* und *L. innocua* zusammen, während in die zweite Linie *L. welshimeri*, *L. ivanovii* und *L. seeligeri* gruppieren. Dies wurde von den meisten, aber nicht von allen Berechnungsverfahren unterstützt.

L. innocua scheint im folgenden Lauf der Evolution durch ein Deletionsereignis seine Pathogenität im Vergleich zu *L. monocytogenes* verloren zu haben. Offensichtlich deletierte hier ein großes Stück des Virulenzgenclusters, das die Gene *prfA* bis einschließlich *plcB* (siehe [C.1.1.]) aus dem Chromosom von *L. innocua* entfernte. Die Fähigkeit tierpathogen zu

sein, scheint in der zweiten Linie durch Deletion der Gene *vcIC* bis *vcIX/Y* bei *L. welshimeri* verlorengegangen zu sein. *L. welshimeri* scheint nach der Zweiteilung in der Linie mit *L. seeligeri* und *L. ivanovii* die tiefste Verzweigung zu bilden. Dies wurde aber erneut nicht von allen Berechnungsverfahren unterstützt. Tabelle C.5. faßt die Ergebnisse der Baumberechnungsverfahren der Nukleinsäuresequenzdaten der verwendeten Gene zusammen.

Tabelle C.5.: Position von *L. seeligeri*, *L. ivanovii* und *L. welshimeri* nach vergleichender Analyse der verwendeten Sequenzdaten. (+) = wird vom Baumberechnungsverfahren unterstützt. (-) = wird von Baumberechnungsverfahren nicht unterstützt.

Gen	<i>L. welshimeri</i> zeigt tiefste Verzweigung			<i>L. seeligeri</i> / <i>L. ivanovii</i> gruppieren zusammen		
	ML	NJ	PAR	ML	NJ	PAR
<i>ldh</i>	-	-	-	+	-	-
<i>prs</i>	-	-	-	-	-	-
<i>vcIB</i>	-	+	-	-	+	-
<i>iap</i>	+	+	+	+	+	+

Phylogenetische Analysen basierend auf Aminosäuresequenzdaten gestalteten sich aufgrund der sehr hohen Sequenzähnlichkeiten der Gene untereinander sehr schwierig. Alle berechneten Bäume ließen zwar erneut *L. grayi* als ursprünglichste Art in der Gattung *Listeria* erkennen, jedoch war die Auflösung zu gering, um Aussagen über die Evolution des „Virulenzgenclusters“ bei den anderen Arten der Gattung *Listeria* machen zu können. Die sehr geringen Sequenzunterschiede sowohl auf Aminosäure- als auch auf Nukleinsäureebene (siehe G.1.) spiegeln die oben angesprochenen Unterschiede in der Baumtopologie bei phylogenetischen Berechnungen mit Aminosäuresequenzdaten wider.

C.3.4.: „Kombinierte“ Datensätze

Aus oben genannten Gründen wurden die Datensätze miteinander kombiniert, um so eine höhere Auflösung bei der phylogenetischen Analyse zu erzielen. Dazu wurden die jeweiligen „Alignments“ hintereinander kopiert und somit ein artifizieller Datensatz an Sequenzen geschaffen. Es wurden alle Gene, die es erlaubten Baumberechnungen auf Nukleinsäureebene und Aminosäureebene durchzuführen zusammengefaßt. Die Abbildung C.12. zeigt schematisch die neu geschaffenen zusammengesetzten Datensätze.

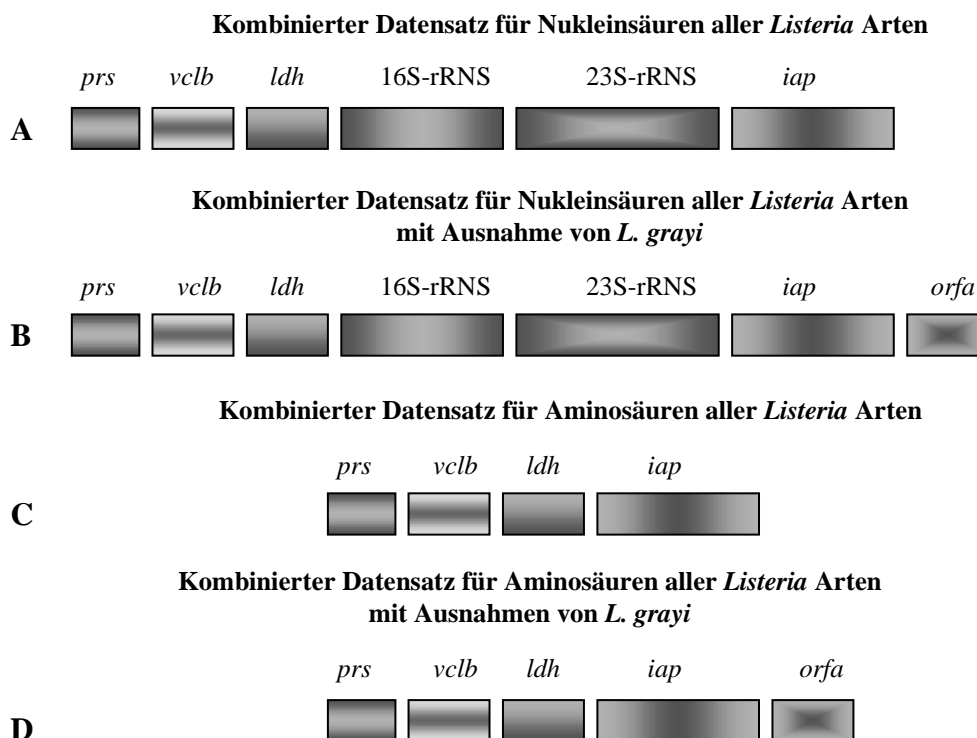


Abbildung C.12.: Verwendete „kombinierte“ Datensätze zur Untersuchung des „Virulenzgenclusters“ der *Listeria* Arten.

In Tabelle C.6. sind die Ergebnisse der Baumberechnungen mit allen verwendeten Kombinationen an Datensätzen sowohl auf Nukleinsäure-, als auch auf Aminosäureebene wiedergegeben. Aus diesen Datensätzen berechnete phylogenetische Bäume zeigten eine weitaus stabilere Topologie als die zuvor berechneten Bäume. Die mit dem oben angeführten zusammengesetzten Datensätzen berechneten Bäume lieferten mit fast allen Berechnungsverfahren das gleiche Evolutionsszenario. *L. grayi* erscheint auch hier als ursprünglichste Art der Gattung *Listeria*. Im Laufe der Evolution spalteten sich die übrigen fünf Arten in zwei Entwicklungslinien auf. In eine Linie gruppieren *L. monocytogenes* und *L. innocua*, in die andere *L. welshimeri*, *L. seeligeri* und *L. ivanovii*. In der zweiten Linie bildet *L. welshimeri* die tiefste Verzweigung.

Tabelle C.6.: Ergebnisse der Baumberechnungen mit allen in Abbildung C.12. dargestellten kombinierten Datensätzen. ML = „Maximum-Likelihood“, NJ = „Neighbor-Joining“, PAR = „Maximum-Parsimony“, FITCH = „Fitch-Margoliash“-Methode. . (+) = wird vom Baumberechnungsverfahren unterstützt. (-) = wird von Baumberechnungsverfahren nicht unterstützt.

	<i>L. grayi</i> urtümlichste Spezies im Genus <i>Listeria</i>			<i>L. innocua</i> und <i>L. monocytogenes</i> gruppieren in einer Linie			<i>L. seeligeri</i> , <i>L. welshimeri</i> und <i>L. ivanovii</i> gruppieren in einer Linie			<i>L. welshimeri</i> bildet tiefste Verzweigung			<i>L. seeligeri</i> und <i>L. ivanovii</i> gruppieren zusammen		
	ML	NJ	PAR	ML	NJ	PAR	ML	NJ	PAR	ML	NJ	PAR	ML	NJ	PAR
Datensatz A	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Datensatz B	⊗	⊗	⊗	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	ML	NJ	FITCH	ML	NJ	FITCH	ML	NJ	FITCH	ML	NJ	FITCH	ML	NJ	FITCH
Datensatz C	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+
Datensatz D	⊗	⊗	⊗	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

C.3.5.: „Konsensusbaum“ zur Evolution des „Virulenzgenclusters“ bei Listerien

Abbildung C.13. zeigt einen Konsensus Baum, berechnet mit der Datensatz-Kombination A (siehe Abb. C.12.) nach der „Maximum-Likelihood“ Methode unter Verwendung eines Sequenzfilters der alle Nukleinsäuredaten berücksichtigt, die im „Alignment“ bei allen *Listeria* Arten vorhanden waren und den Sequenzabschnitt, der die TN-„repeat“-Domäne des *iap*-Gens ausschließt. *L. grayi* zeigt sich hier erneut als die evulotorisch ursprünglichste Art der Gattung *Listeria*. Die übrigen fünf Arten trennten sich im Lauf der Evolution in zwei Entwicklungslinien auf, wobei die erste Linie die Arten *L. monocytogenes* und *L. innocua* und die zweite Linie *L. welshimeri*, *L. seeligeri* und *L. ivanovii* beinhaltet. *L. welshimeri* bildet in der zweiten Linie die tiefste Verzweigung. Folglich scheint die Fähigkeit pathogen zu sein, in der Gattung *Listeria* während der Evolution zumindest zweimal verlorengegangen zu sein.

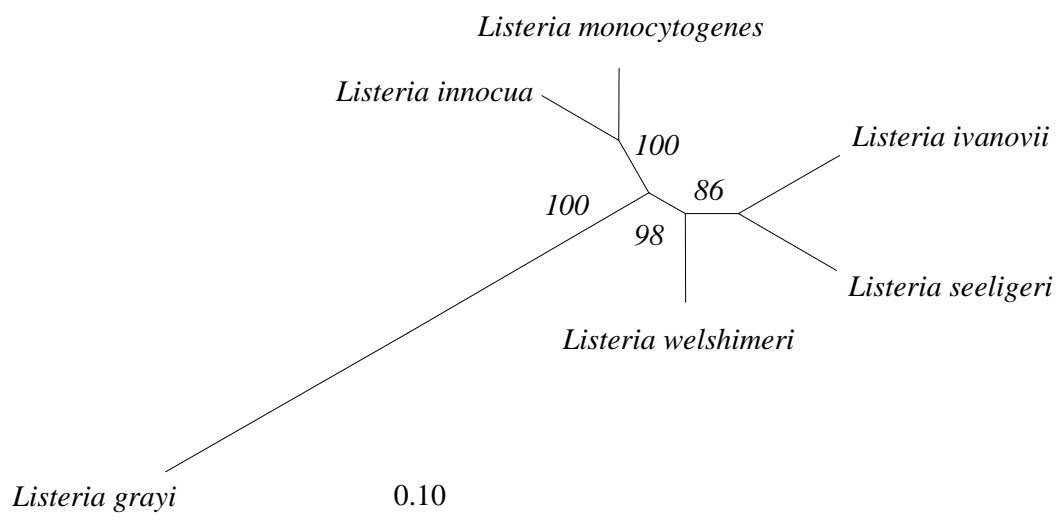


Abbildung C.13. Phylogenetischer Baum berechnet nach dem „Maximum-Likelihood“-Verfahren. Zur Berechnung wurde der zusammengesetzte Datensatz A [Abb. C.12.] verwendet. Die Zahlenwerte („bootstrap-values“) geben die Wahrscheinlichkeiten der Richtigkeit der Astverzweigung an die sich aus 1.000 facher Wiederholung der Baumberechnung nach dem „Maximum-Parsimony“-Verfahren ergaben. Der Balken gibt 10 % Sequenzdivergenz an.

C.4.: Differenzierung von Listerien und Feindifferenzierung von *L. monocytogenes*

C.4.1.: Feindifferenzierung von *L. monocytogenes* durch vergleichende Sequenzanalyse von Virulenzgenen

Listeria monocytogenes besitzt eine Vielzahl von Virulenzfaktoren, die in der Einleitung eingehend beschrieben wurden. In der Literatur findet man stellenweise Hinweise, daß sich *L. monocytogenes* Stämme in ihrer Virulenz und ihrem pathogenen Potential unterscheiden können (Wiedmann *et al.*, 1997). Deswegen wurde in dieser Arbeit versucht, durch detaillierte Sequenzanalyse von zwei Virulenzfaktoren *L. monocytogenes* näher zu differenzieren, um möglicherweise eine Aussage über die unterschiedliche Ausprägung der Virulenz geben zu können.

Zum einen wurde das *iap*-Gen gewählt, das neben seiner Funktion während der Anheftung an die Wirtszelle noch eine lebenswichtige Funktion als Mureinhydrolase erfüllt (Bubert *et al.*, 1992, 1997; Köhler *et al.*, 1990, 1991; Wünscher *et al.*, 1993), und zum anderen das *plcA*-Gen, welches ebenfalls einen essentiellen Virulenzfaktor für *L. monocytogenes* darstellt (Camilli *et al.* 1992) und für eine Phosphatidylinositol-spezifische Phospholipase C kodiert, das es *L. monocytogenes* ermöglicht, aus dem Wirtszellphagosom zu entkommen (Leitmeister-Wächter *et al.*, 1990; Mengaud *et al.*, 1991; Sun *et al.*, 1990).

C.4.1.1.: Sequenzanalyse der *iap*-Gene aller bekannten *Listeria* Arten und unterschiedlicher *L. monocytogenes* Stämme

Im Rahmen einer im Arbeitskreis angefertigten Diplomarbeit (Walcher, 1999) und der vorliegenden Arbeit wurden 94 *iap*-Gene aller bisher bekannten Arten der Gattung *Listeria* einer Sequenzanalyse unterzogen. Davon stammen 71 Sequenzen von *L. monocytogenes* Stämmen, die alle bekannten 13 Serovariationen (Farber und Peterkin, 1991; Schuchat *et al.*, 1991) von *L. monocytogenes* abdecken. Die aus bestehenden Stammsammlungen bezogenen *L. monocytogenes* Stämme wurden zur Unterdrückung von etwaigen Kontaminationen auf „OXFORD“ Medium mit Selektivsupplement [B.1.3.1.] vereinzelt und jeweils eine Kolonie in BHI Medium [B.1.3.1.] angezogen. Von diesen Zellen wurde DNS isoliert [B.1.5.1. oder B.1.5.2.] und daraus die *iap*-Gene mit dem Primerpaar *iap*-P-V und *iap*-P-R [B.1.10.2.4.] mittels PCR [B.1.10.] amplifiziert. Die erhaltenen Amplifikate wurden nach Überprüfung durch horizontaler Gelelektrophorese [B.1.6.2.] aufgereinigt [B.1.10.6.] und anschließend entweder direkt mit den Primern *iap*-V-IR und *iap*-R-IR einer nichtradioaktiven Sequenzanalyse [B.1.11.] unterzogen, oder kloniert [B.1.9.1.] und anschließend die Plasmide sequenziert. Alle erhaltenen Sequenzen wurden anhand Ihrer Übersetzung in Aminosäuren korrekturgelesen und in ein „*Alignment*“ schon vorhandener Sequenzen eingepaßt. Phylogenetische Analysen wurden mit den Berechnungsverfahren „*Maximum-Likelihood*“, „*Maximum-Parsimony*“ und „*Neighbor-Joining*“ [B.1.12.] durchgeführt. Dabei konnte gezeigt werden, daß sich die Art *L. monocytogenes* offensichtlich im Laufe der Evolution in drei Entwicklungslinien aufgetrennt hat. Abbildung C.14. zeigt einen phylogenetischen Baum berechnet aus den erhaltenen Sequenzdaten nach der „*Maximum-Likelihood*“-Methode. Für die Berechnung wurde ein Sequenzfilter verwendet, der alle Nukleinsäuredaten mit Ausnahme des Sequenzabschnitts, der für die TN-„*repeat*“-Domäne des *iap*-Gens kodiert, berücksichtigt. Es konnten 3 *L. monocytogenes* Stämme der Entwicklungslinie I und jeweils 34 *L. monocytogenes* Stämme der Entwicklungslinie II und III zugeordnet werden. Eine weitere eindeutige Unterscheidung der einzelnen *L. monocytogenes* Stämmen innerhalb der jeweiligen Entwicklungslinien war nicht mehr möglich.

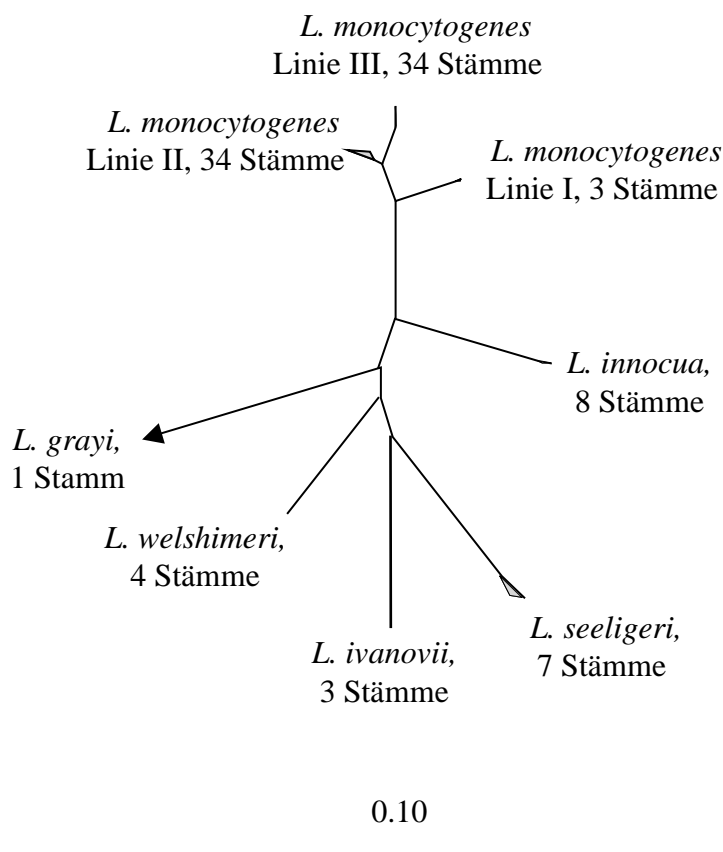


Abbildung C.14.: Phylogenetischer Baum aller in dieser Arbeit verwendeten Stämme berechnet nach der „Maximum-Likelihood“ Methode unter Verwendung eines Sequenzfilters, der die TN-„repeat“-Domäne bei den Berechnungen ausschließt. Die Zahlenwerte („bootstrap values“) geben die Wahrscheinlichkeit der Verzweigungen an, basierend auf Berechnungen nach dem „Maximum-Parsimony“-Verfahren mit 1.000 Berechnungswiederholungen.. Der Balken gibt 10 % Sequenzdivergenz an.

Aufgrund der detaillierten Sequenzanalyse konnte auch ein deutlicher Längenunterschied in der Aminosäureprimärstruktur zwischen den *iap*-Genen der analysierten *L. monocytogenes* Stämme erkannt werden. Dieser stammt vor allen aus der unterschiedlichen Ausprägung der sogenannten TN-„repeat“-Domäne des *iap*-Gens (Köhler *et al.*, 1990, Bubert *et al.*, 1992). In diesem hochvariablen Abschnitt des *iap*-Gens (Position 333 bis 488 im Aminosäurealignment der *iap*-Gen Sequenzdatenbank) zeigt sich eine Anhäufung an Wiederholungen der Aminosäuren Threonin (T) und Asparagin (N). So zeigen die 3 Vertreter der Entwicklungslinie I alle einen TN-„repeat“ mit 11 Wiederholungen. In Entwicklungslinie II finden wir 13-17 TN-Wiederholungen während wir In Entwicklungslinie III die längsten TN-„repeats“ unter den *L. monocytogenes* Stämmen mit 16 bis 24 Wiederholungen finden. In Tabelle C.7. sind alle untersuchten *Listeria* Stämme und deren Referenzen, die Anzahl an sequenzierten Basen des *iap*-Gens, die Zugehörigkeit zur jeweiligen Entwicklungslinie und die Anzahl der TN-„repeats“ zusammengefaßt

ERGEBNISSE

Tabelle C.7.: Alle in dieser Arbeit verwendeten *Listeria* Stämme von denen die *iap*-Gene sequenziert und analysiert wurden. (Nuc *iap*) = Anzahl an sequenzierten Nukleinsäurebasen des *iap*-Gens. (As *iap*) = Anzahl der zur Verfügung stehenden Aminosäuren. (TN) = Anzahl der TN-„repeats“. (Ewl) = Entwicklungslinie. (sv) = Serovariante. (n. b.) = nicht bestimmt. (-) = kein TN-„repeats“. (⊗) = wahrscheinlich falsch serotypisiert.

Arten/Stamm	Serotyp	Referenz	Nuc <i>iap</i>	As <i>iap</i>	TN	Ewl
<i>L. grayi</i>	n. b.	TUMLis1	1536	512	-	-
<i>L. innocua</i>	n. b.	IMVW127	1422	474	-	-
<i>L. innocua</i>	n. b.	IMVW128	1416	472	-	-
<i>L. innocua</i>	n. b.	IMVW129	1422	474	-	-
<i>L. innocua</i>	n. b.	IMVW620	1425	475	-	-
<i>L. innocua</i>	sv 6a	NCTC11288	1446	482	-	-
<i>L. innocua</i> "OXFORD"	n. b.	TUMLis2	1410	470	-	-
<i>L. innocua</i> "PALCAM"	n. b.	TUMLis3	1410	470	-	-
<i>L. innocua</i> V62a	n. b.	TUMLis4	1416	472	-	-
<i>L. ivanovii</i>	n. b.	ATCC19119	1575	525	-	-
<i>L. ivanovii</i>	n. b.	IMVW1656	1572	524	-	-
<i>L. ivanovii</i>	n. b.	IMVW788	1569	523	-	-
<i>L. monocytogenes</i>	sv 4a	SLCC2374	1419	473	11	I
<i>L. monocytogenes</i>	sv 4c	TUMLis5	1356	452	11	I
<i>L. monocytogenes</i>	sv 4a	TUMLis6	1338	446	11	I
<i>L. monocytogenes</i>	n. b.	IMVW1427	1437	479	17	II
<i>L. monocytogenes</i>	n. b.	IMVW1428	1437	479	17	II
<i>L. monocytogenes</i>	sv 4e	IMVW1446	1434	478	16	II
<i>L. monocytogenes</i>	sv 4d/e	IMVW1447	1434	478	16	II
<i>L. monocytogenes</i>	sv 1/2b	IMVW1464	1363	454	17	II
<i>L. monocytogenes</i>	n. b.	IMVW1517	1434	478	16	II
<i>L. monocytogenes</i>	n. b.	IMVW1577	1416	472	13	II
<i>L. monocytogenes</i>	sv 3b	IMVW1603	1440	480	17	II
<i>L. monocytogenes</i>	sv 4b	IMVW1724	1371	457	16	II
<i>L. monocytogenes</i>	sv 4b	IMVW1725	1371	457	16	II
<i>L. monocytogenes</i>	sv 1/2b	IMVW1726	1375	458	17	II
<i>L. monocytogenes</i>	sv 1/2b	IMVW1727	1374	458	17	II
<i>L. monocytogenes</i>	n. b.	IMVW2291	1416	472	13	II
<i>L. monocytogenes</i>	n. b.	IMVW2296	1434	478	16	II
<i>L. monocytogenes</i>	n. b.	IMVW2309	1434	478	16	II
<i>L. monocytogenes</i>	n. b.	IMVW2311	1434	478	16	II
<i>L. monocytogenes</i>	n. b.	IMVW2312	1434	478	16	II
<i>L. monocytogenes</i>	n. b.	IMVW2313	1434	478	16	II
<i>L. monocytogenes</i>	n. b.	IMVW2314	1434	478	16	II
<i>L. monocytogenes</i>	n. b.	IMVW478	1434	478	16	II
<i>L. monocytogenes</i>	n. b.	IMVW479	1434	478	16	II
<i>L. monocytogenes</i>	sv 4b	SLCC4013	1359	453	16	II
<i>L. monocytogenes</i>	sv 3b	TUMLis7	1322	440	17	II
<i>L. monocytogenes</i>	sv 7	TUMLis8	1361	453	17	II
<i>L. monocytogenes</i>	sv 1/2b	TUMLis9	1324	441	17	II

ERGEBNISSE

Tabelle C.7.: Fortsetzung

Arten/Stamm	Serotyp	Referenz	Nuc iap	As iap	TN	Ewl
<i>L. monocytogenes</i>	sv 4d	TUMLis10	1323	441	16	II
<i>L. monocytogenes</i>	sv 4e	TUMLis11	1356	452	16	II
<i>L. monocytogenes Iso1</i>	n. b.	TUMLis20	1416	472	16	II
<i>L. monocytogenes Iso11</i>	n. b.	TUMLis21	1434	478	13	II
<i>L. monocytogenes Iso45</i>	n. b.	TUMLis23	1434	478	16	II
<i>L. monocytogenes Iso46</i>	n. b.	TUMLis24	1434	478	16	II
<i>L. monocytogenes Iso50</i>	n. b.	TUMLis25	1326	442	17	II
<i>L. monocytogenes NV4700</i>	(sv 4a*)	TUMLis29	1434	478	16	II
<i>L. monocytogenes ScottA</i>	sv 4b	TUMLis32	1434	478	16	II
<i>L. monocytogenes</i>	n. b.	IMVW1302	1449	483	18	III
<i>L. monocytogenes</i>	sv 1/2a	IMVW1433	1341	447	19	III
<i>L. monocytogenes</i>	n. b.	IMVW1436	1443	481	17	III
<i>L. monocytogenes</i>	sv 1/2a	IMVW1449	1322	440	16	III
<i>L. monocytogenes</i>	sv 1/2a	IMVW1454	1353	451	21	III
<i>L. monocytogenes</i>	n. b.	IMVW1516	1443	481	17	III
<i>L. monocytogenes</i>	n. b.	IMVW1602	1449	483	18	III
<i>L. monocytogenes</i>	sv 3a	IMVW1630	1353	451	16	III
<i>L. monocytogenes</i>	sv 1/2a	IMVW1632	1440	480	17	III
<i>L. monocytogenes</i>	sv 1/2c	IMVW310	1361	453	19	III
<i>L. monocytogenes</i>	sv 1/2a	IMVW34564	1379	459	17	III
<i>L. monocytogenes</i>	sv 1/2a	IMVW349	1378	459	17	III
<i>L. monocytogenes</i>	sv 1/2c	IMVW351	1394	464	20	III
<i>L. monocytogenes</i>	n. b.	IMVW560	1455	273	19	III
<i>L. monocytogenes</i>	n. b.	IMVW566	1455	317	19	III
<i>L. monocytogenes</i>	n. b.	IMVW567	1455	485	19	III
<i>L. monocytogenes</i>	n. b.	IMVW568	1455	485	19	III
<i>L. monocytogenes</i>	sv 1/2a	IMVW761	1485	495	24	III
<i>L. monocytogenes</i>	sv 1/2a	TUMLis12	1341	447	19	III
<i>L. monocytogenes</i>	sv 1/2c	TUMLis13	1347	449	20	III
<i>L. monocytogenes</i>	sv 4ab	TUMLis14	1350	450	19	III
<i>L. monocytogenes</i>	sv 3c	TUMLis15	1340	446	19	III
<i>L. monocytogenes</i>	sv 3a	TUMLis16	1216	405	19	III
<i>L. monocytogenes Aachen</i>	sv 1/2a	TUMLis17	1335	445	18	III
<i>L. monocytogenes EGD</i>	sv 1/2a	TUMLis18	1455	485	19	III
<i>L. monocytogenes F-Stamm</i>	sv 3a	TUMLis19	1372	457	19	III
<i>L. monocytogenes Iso3</i>	n. b.	TUMLis22	1443	481	17	III
<i>L. monocytogenes LL141</i>	sv 1/2a	TUMLis26	1333	444	18	III
<i>L. monocytogenes LL365</i>	sv 1/2a	TUMLis27	1333	444	18	III
<i>L. monocytogenes LL93</i>	sv 1/2a	TUMLis28	1370	456	19	III
<i>L. monocytogenes R479a</i>	n. b.	TUMLis30	1449	483	18	III
<i>L. monocytogenes R62a</i>	n. b.	TUMLis31	1449	483	18	III
<i>L. monocytogenes V527a</i>	n. b.	TUMLis33	1443	481	17	III
<i>L. monocytogenes V5a</i>	n. b.	TUMLis34	1437	479	16	III
<i>L. seeligeri</i>	n. b.	IMVW783	1551	517	-	-
<i>L. seeligeri</i>	n. b.	IMVW844	1578	526	-	-
<i>L. seeligeri</i>	n. b.	IMVW860	1551	517	-	-
<i>L. seeligeri</i>	n. b.	SLCC3954	1572	524	-	-
<i>L. seeligeri</i>	n. b.	SLCC5921	1458	486	-	-
<i>L. seeligeri</i>	n. b.	SLCC7309	1426	475	-	-
<i>L. seeligeri</i>	n. b.	SLCC7329	1467	489	-	-
<i>L. welshimeri</i>	n. b.	IMVW1656	1575	525	-	-
<i>L. welshimeri</i>	n. b.	IMVW420	1575	525	-	-
<i>L. welshimeri</i>	n. b.	SLCC5828	1575	525	-	-
<i>L. welshimeri R90b</i>	n. b.	TUMLis35	1569	523	-	-

C.4.1.2.: Feindifferenzierung von *L. monocytogenes* durch vergleichende Sequenzanalyse des *plcA*-Gens

Listeria monocytogenes besitzt eine Vielzahl an Virulenzfaktoren, das es dem Keim ermöglicht, in menschliche Zellen einzudringen, sich aktiv von Zelle zu Zelle zu bewegen, um so benachbarte Zellen zu infizieren (Brehm *et al.*, 1996; Goebel *et al.*, 1993; Kreft *et al.*, 1995). Ein wichtiges Genprodukt hierfür wird vom sogenannten *plcA*-Gen kodiert, nämlich eine Phosphatidylinositol-spezifische Phospholipase C (siehe C.4.1.). Anhand von vergleichender Sequenzanalysen der *iap*-Gene verschiedener *L. monocytogenes* Stämme konnte gezeigt werden, daß sich die Art *L. monocytogenes* im Laufe der Evolution in drei Entwicklungslinien aufgetrennt hat [C.4.1.1.]. Dieses Ergebnis konnte durch vergleichende Sequenzuntersuchung des *plcA*-Gens aus verschiedenen *L. monocytogenes* bestätigt werden. Dazu wurden die *plcA*-Gene aller 13 Serovarianten von *L. monocytogenes* mit dem Primerpaar *plcA*-V und *plcA*-R [B.1.10.2.5.] mittels PCR [B.1.10.] amplifiziert, die erhaltenen ca. 850 bp große Amplifikate kloniert [B.1.9.] und einer nichtradioaktiven Sequenzanalyse [B.1.11.] unterzogen. Die erhaltenen Sequenzdaten wurden in ein „Alignment“ dreier bereits bekannter *plcA* Sequenzen von *L. monocytogenes* Stamm EGD sv 1/2a, *L. seeligeri* und *L. ivanovii* eingepaßt. Anhand der Aminosäure-sequenzdaten und der ausgedruckten Bandenmuster der Sequenziergele wurden alle Sequenzen korrektur gelesen. Phylogenetische Untersuchungen der erhaltenen Sequenzdaten nach der „Maximum-Parsimony“, „Maximum-Likelihood“ und „Neighbor-Joining“ [B.1.12.] Methode zeigten erneut eine eindeutige Aufteilung der untersuchten *L. monocytogenes* Stämme in drei evolutionäre Linien. Das in Abbildung C.15. dargestellte, nach der „Neighbor-Joining“-Methode erstellte, Dendrogramm gibt die phylogenetischen Positionen der untersuchten Stämme wieder.

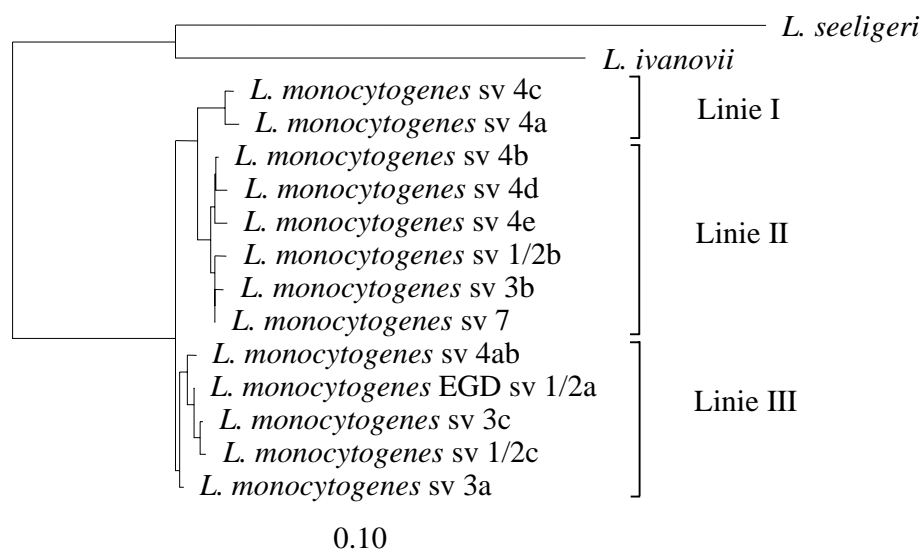


Abbildung C.15.: Phylogenetisches Dendrogramm berechnet nach der „Neighbor-Joining“-Methode mit Sequenzdaten aller 13 Serovarianten von *L. monocytogenes*. Balken indiziert 10 % Sequenzdivergenz. Für die Berechnung wurde ein Sequenzfilter verwendet, der die Sequenzdaten aller Stämme berücksichtigt die im Alignment bei allen Stämmen vorhanden waren. Der Balken gibt 10 % Sequenzdivergenz an.

In Tabelle C.8. sind die Referenzen der sequenzierten *plcA*-Gene und die Zugehörigkeit der jeweiligen *L. monocytogenes* Stämme zur jeweiligen Entwicklungslinie zusammengefaßt.

Tabelle C.8.: Verfügbare *plcA* Sequenzdaten aller untersuchten Stämme und Zugehörigkeit der einzelnen Vertreter zu den jeweiligen evolutionären Linien bei unterschiedlichen Baumberechnungsverfahren basierend auf Nukleinsäuredaten MM = „Maximum-Likelihood“, NJ = „Neighbor Joining“, PAR = „Maximum-Parsimony“. I, II, III = jeweilige evolutionäre Linie von *L. monocytogenes*

Stamm	Nukleinsäuresequenz [b]	Aminosäuresequenz [As]	MM	PAR	NJ
<i>L. seeligeri</i> SLCC3954	957	319	-	-	-
<i>L. ivanovii</i> ATCCC19119	960	320	-	-	-
<i>L. monocytogenes</i> sv 4a TUMLis6	815	271	I	I	I
<i>L. monocytogenes</i> sv 4c TUMLis5	815	271	I	I	I
<i>L. monocytogenes</i> sv 1/2b TUMLis9	815	271	II	II	II
<i>L. monocytogenes</i> sv 3b TUMLis7	815	271	II	II	II
<i>L. monocytogenes</i> sv 4b SLCC4013	815	271	II	II	II
<i>L. monocytogenes</i> sv 4d TUMLis10	815	271	II	II	II
<i>L. monocytogenes</i> sv 4e TUMLis11	815	271	II	II	II
<i>L. monocytogenes</i> sv 7 TUMLis8	815	271	II	II	II
<i>L. monocytogenes</i> EGD sv 1/2a TUMLis18	948	316	III	III	III
<i>L. monocytogenes</i> sv 1/2c TUMLis13	815	271	III	III	III
<i>L. monocytogenes</i> sv 3a TUMLis16	812	270	III	III	III
<i>L. monocytogenes</i> sv 3c TUMLis15	815	271	III	III	III
<i>L. monocytogenes</i> sv 4ab TUMLis14	815	271	III	III	III

C.4.2.: Feindifferenzierung von *L. monocytogenes* durch molekularbiologische Methoden

C.4.2.1.: Entwicklung eines PCR-gestützten Verfahrens zur Detektion der einzelnen evolutionären Linien von *L. monocytogenes*

Basierend auf den umfangreichen Datensatz an *iap*-Gen Sequenzen von etwa 130 kb konnte im Rahmen einer im Arbeitskreis angefertigten Diplomarbeit (Walcher, 1999) und der vorliegenden Arbeit ein PCR-gestütztes Nachweissystem für die jeweiligen evolutionären Linien von *L. monocytogenes* entwickelt werden. Es konnten verschiedene spezifische Bindungsstellen gefunden werden, die es erlaubten, die Entwicklungslinien-spezifischen Primerpaare *iap*-P-I-217-V/*iap*-P-I-1.047-R (spezifisch für die Linie I), *iap*-P-II-820-V/*iap*-P-II-1.047-R (spezifisch für die Linie II) und *iap*-P-III-412-V/*iap*-P-III-1.047-R (spezifisch für die Linie III) zu entwickeln [B.1.10.2.4.]. In Abbildung C.16 sind die Bindungsstellen der jeweiligen Primerpaare im *iap*-Gen, die theoretische Länge der jeweiligen Amplifikate und beispielhaft die erhaltenen Amplikons nach Auftrennung in einem Agarosegel jeweils eines Vertreters aus jeder evolutionären Linie von *L. monocytogenes* zusammengefaßt.

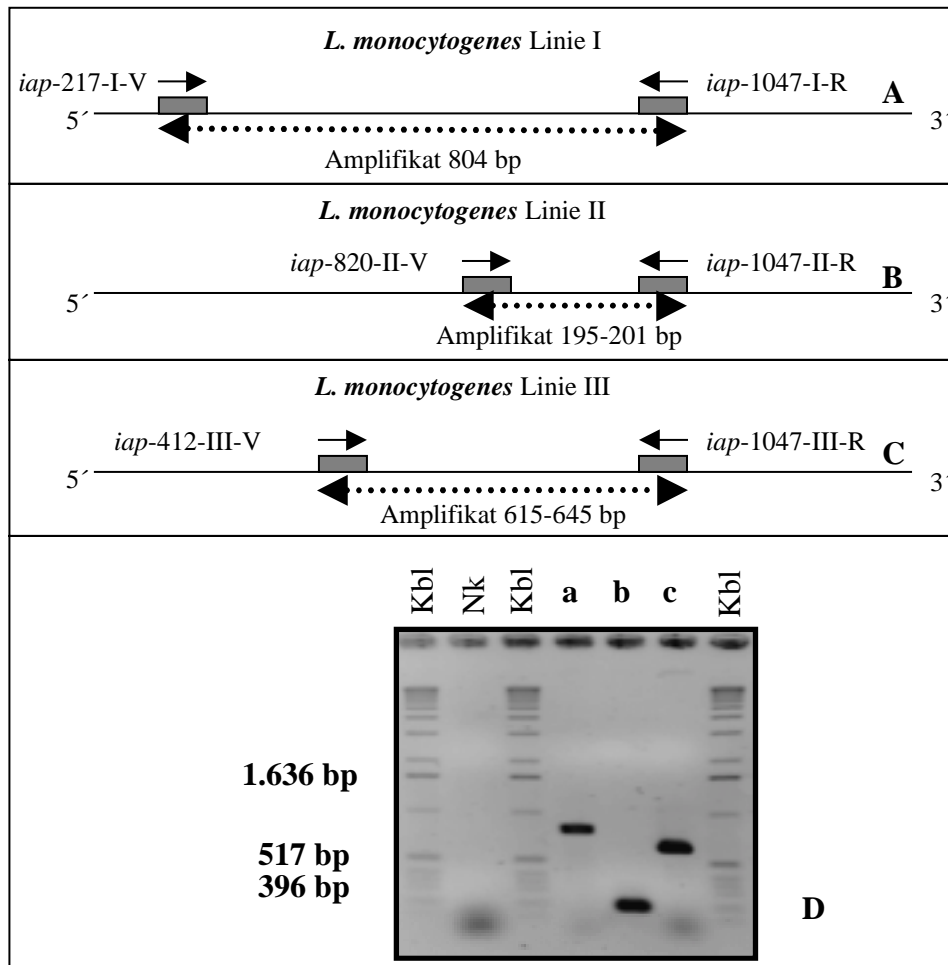


Abbildung C.16.: Schematische Übersicht über die Primerbindungsstellen für das entwickelte PCR-System zum Nachweis der 3 evolutionären Linien von *L. monocytogenes*. Angezeigt sind die Primerkombinationen und die Länge der Amplifikate für die Linie I (A), II (B) und III (C); D = Ergebnisse der spezifischen PCR für jede evolutionäre Linie von *L. monocytogenes* a = PCR spezifisch für Linie I; b = PCR spezifisch für Linie II; c = PCR spezifisch für Linie III.

C.4.2.1.1.: Überprüfung des entwickelten PCR-Systems anhand *L. monocytogenes* Stämme der 13 bekannten Serovarianten

Bis heute sind 13 Serotypen von *L. monocytogenes* bekannt, die in verschiedenen Gruppen zusammengefaßt werden (siehe Tab. B.1.). Das entwickelte PCR-System wurde zuerst auf die 13 bekannten Serovarianten von *L. monocytogenes* angewendet. Die daraus resultierenden Amplikons sind entsprechend der Stellung der einzelnen *L. monocytogenes* Stämme im phylogenetischen Dendrogramm in Abbildung C.17. wiedergegeben.

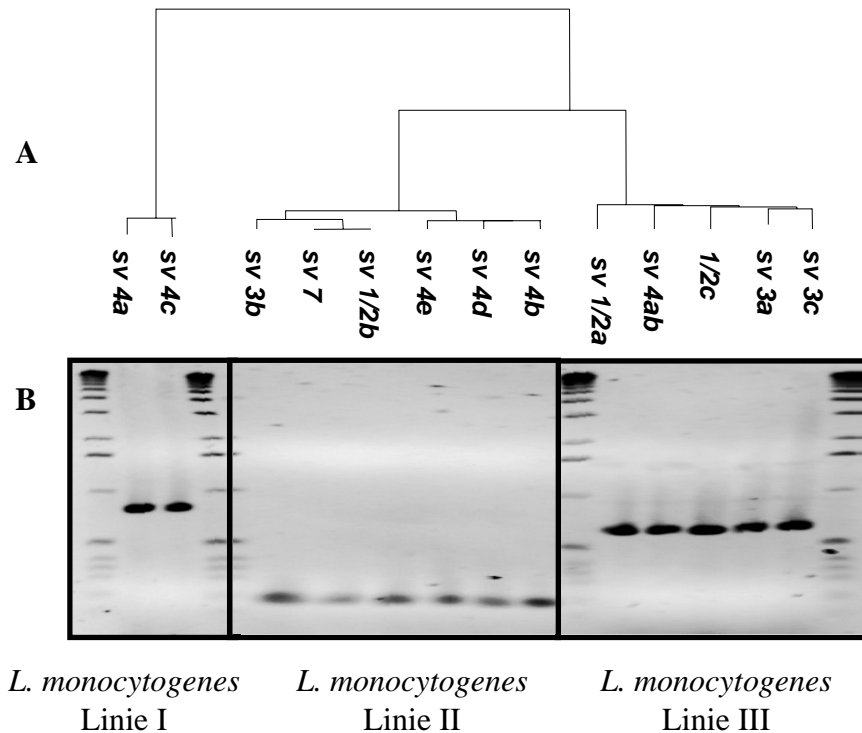


Abbildung C.17: A = Einteilung von *L. monocytogenes* Stämmen aller bekannten 13 Serovarianten in die jeweiligen evolutionären Linien. Gezeigt ist ein Dendrogramm berechnet aus den Nukleinsäuresequenzdaten des *iap*-Gens nach der „Neighbor-Joining“-Methode unter Verwendung eines Filters der alle Teile außer der TN-„repeat“ Domäne von *L. monocytogenes* berücksichtigt. Es sind nur die Serovarianten von *L. monocytogenes* angegeben. B = Spezifische PCR für jede evolutionäre Linie von *L. monocytogenes*

C.4.2.1.2.: Anwendung des entwickelten PCR-Systems auf *L. monocytogenes*-Isolate verschiedenen Ursprungs

Mit dieser PCR-gestützten Nachweismethode wurden alle aus Stammsammlungen bezogenen *L. monocytogenes* Stämme, von denen die Sequenzen der *iap*-Gene bestimmt wurden, getestet (Daten nicht gezeigt). Zur Überprüfung der Spezifität und der Zuverlässigkeit dieses Verfahrens wurden zusätzlich eigene Isolate aus unterschiedlichen Proben getestet. Dazu wurden aus verschiedenen Proben Anreicherungen nach [B.1.3.3.] angelegt und auf das Vorhandensein von Listerien hin überprüft. Von den erhaltenen Reinkulturen wurde anschließend die DNS isoliert [B.1.5.1. oder B.1.5.2.] und das entwickelte diagnostische PCR-Verfahren ausgetestet.

Um das entwickelte PCR-System auf seine Tauglichkeit in der Praxis zu testen, wurden Listerien aus verschiedenen Belebtschlämmen siehe (C.1.1.), aus Romadur-Käse und aus Räucherlachs isoliert. Zusätzlich wurden als *L. monocytogenes* typisierte klinische Isolate von fünf Patienten, die Symptome einer Gastroenteritis zeigten, untersucht. Es zeigte sich, daß in

allen Fällen das entwickelte PCR-System spezifisch für *L. monocytogenes* und den jeweiligen evolutionären Linien von *L. monocytogenes* war. Hervorzuheben ist, daß keine der konstruierten Primer zu falsch positiven Ergebnissen mit anderen *Listeria* Arten besonders nicht mit *L. innocua* führte. Bei allen Isolaten und untersuchten Stämmen wurde nach DNS-Isolierung [B.1.5.1. oder B.1.5.2.] versucht- das *iap*-Gen mit dem dafür spezifischen Primerpaar *iap*-P-V und *iap*-P-R [B.1.10.2.4.] zu amplifizieren. Anschließend wurde versucht, mit dem für *L. monocytogenes* spezifischen Primerpaar MonoA und MonoB [B.1.10.2.4.] ein Stück des *iap*-Gens zu amplifizieren. Zur näheren Subtypisierung oder Feindifferenzierung wurde anschließend das entwickelte diagnostische PCR-Verfahren angewendet. Zur Überprüfung der Ergebnisse wurden die *iap*-Gene aller Isolate einer nichtradioaktiven Sequenzanalyse [B.1.11.] unterzogen und in den vorhandenen Datensatz eingerechnet.

C.4.2.1.1.1.: Isolate aus Räucherlachs

Die Stämme V5a, V62a, V527a, R62a, R90b und R479a (Tabelle B.1) wurden aus dänischen Räucherlachs wie in [B.1.3.3.] beschrieben isoliert und als *L. monocytogenes* typisiert. Von allen Isolaten wurde die DNS isoliert und wie oben zusammengefaßt weiter-verfahren. Dabei konnte durch die *iap*-Gen Sequenzanalyse gezeigt werden, daß es sich bei allen Isolaten um Listerien handelt, nicht aber wie angenommen nur um *L. monocytogenes* Stämme (V5a, V527a, R62a und R479a), sondern auch um ein Isolat der Art *L. innocua* (V62a) und ein Isolat der Art *L. welshimeri* (R90b). Abbildung C.18. zeigt ein Dendrogramm berechnet nach der „Neighbor-Joining“-Methode unter Verwendung eines Sequenzfilters, der die TN-„repeat“-Domäne von *L. monocytogenes* bei der Berechnung ausschließt.

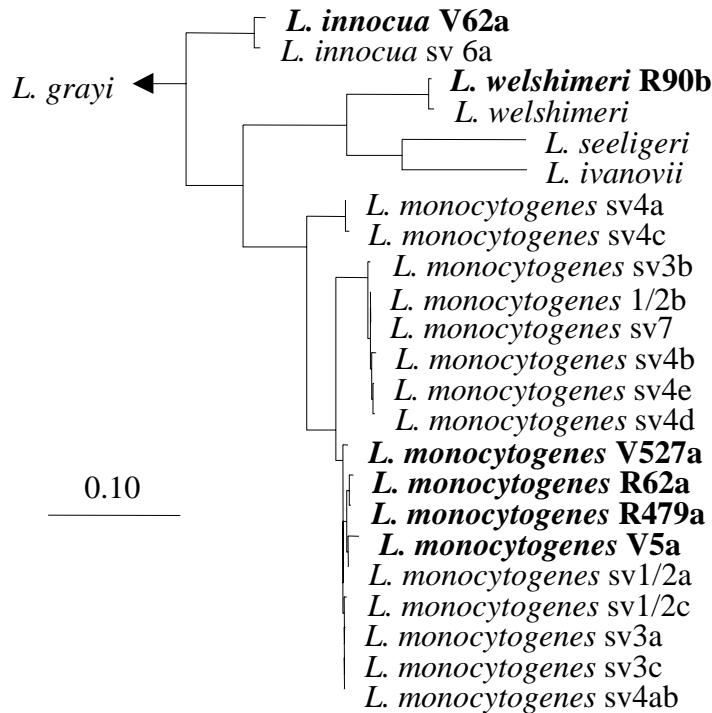


Abbildung C.18.: Phylogenetisches Dendrogramm von *iap*-Gen Sequenzen aller bekannten *Listeria* Arten, den 13 bekannten Serovarianten von *L. monocytogenes* und den Isolaten aus Räucherlachs, berechnet nach der „Neighbor-Joining“-Methode unter Verwendung eines Sequenzfilters, der die TN-„repeat“-Domäne von *L. monocytogenes* bei der Berechnung ausschließt. Der Balken gibt 10 % Sequenzdivergenz an.

Diese Isolate wurden anhand des entwickelten PCR-Systems überprüft. Dabei zeigte sich erneut, daß alle Isolate zu den Listerien zählen, aber nur 4 Isolate der Art *L. monocytogenes* zugeordnet werden konnten. Die spezifische PCR für die jeweiligen evolutionären Linien von *L. monocytogenes* zeigte ebenfalls, daß alle 4 *L. monocytogenes* Isolate der evolutionären Linie 3 angehören, da nur mit dem für diese Linie spezifischen Primerpaar *iap*-P-III-412-V/*iap*-P-III-1.047-R ein entsprechendes Amplifikat richtiger Größe erhalten werden konnte (Abb. C.19.). Mit dem für die Linien I und II spezifischen Primerpaaren konnten keine Amplifikate detektiert werden.

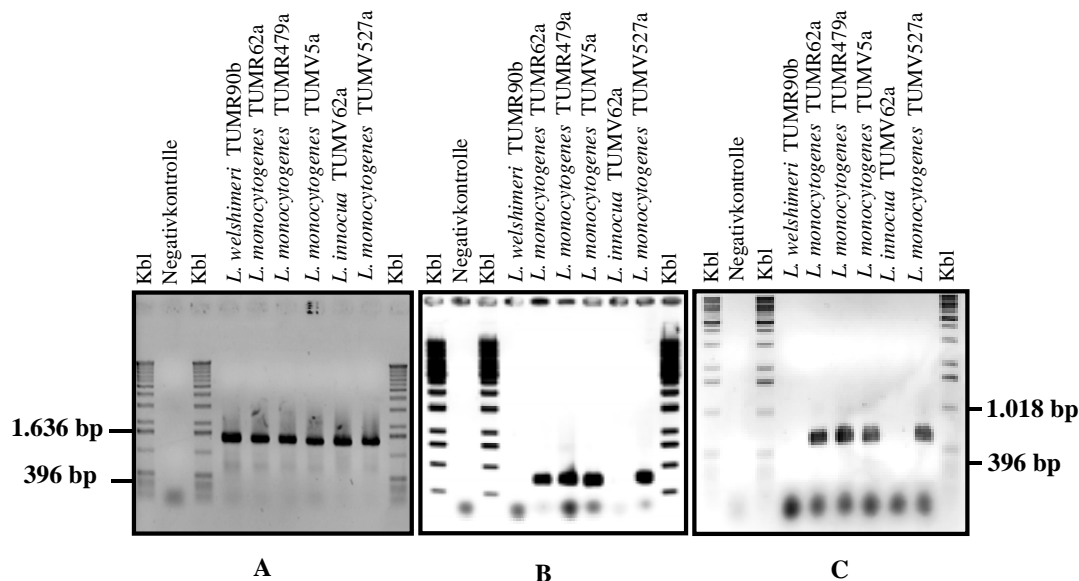


Abbildung C.19.: Ergebnisse des PCR gestützten Nachweisverfahrens für die *Listeria*-Isolate aus Räucherlachs; **A** = PCR mit dem Primerpaar *iap*-P-V/*iap*-P-R; **B** = PCR mit dem Primerpaar MonoA/MonoB, spezifisch für *L. monocytogenes*; **C** = PCR, spezifisch für die evolutionäre Linie III von *L. monocytogenes* mit dem Primerpaar *iap*-P-III-412-V/*iap*-P-III-1.047-R

C.4.2.1.1.2.: Klinische Isolate von *L. monocytogenes* aus Gastroenteritis-Patienten

Die Stämme *L. monocytogenes* sv 1/2a IMVW1724, *L. monocytogenes* sv 1/2a IMVW1725, *L. monocytogenes* sv 4b IMVW1726, *L. monocytogenes* sv 4b IMVW1727 und *L. monocytogenes* sv 1/2a IMVW34564 wurden näher untersucht, um das entwickelte PCR-Verfahren auch an klinischen Isolaten zu testen. Zunächst bestand die Annahme, daß diese Isolate Unterschiede in ihrer Virulenz aufweisen müßten, da die ersten vier oben angeführten Stämme aus erwachsenen Personen, der Stamm *L. monocytogenes* sv 1/2a IMVW34564 aber aus einem Neugeborenen isoliert wurde, bei denen das Immunsystem noch nicht voll leistungsfähig und ausgebaut ist. Mit dem entwickelten PCR-System konnten die Isolate aus den erwachsenen Patienten der evolutionären Linie II zugeordnet werden, während das Neugeborenen-Isolat in die Linie III gruppierte. Mit dem für die evolutionäre Linie I spezifischen Primerpaar durchgeführte PCR wurden keine Amplifikate erhalten (siehe Abbildung C.21). Abbildung C.20. zeigt ein Dendrogramm berechnet nach der „Neighbor-Joining“-Methode unter Verwendung eines Sequenzfilters der die TN-„repeat“-Domäne von *L. monocytogenes* bei der Berechnung ausschließt und die untersuchten klinischen *L. monocytogenes* Isolate beinhaltet.

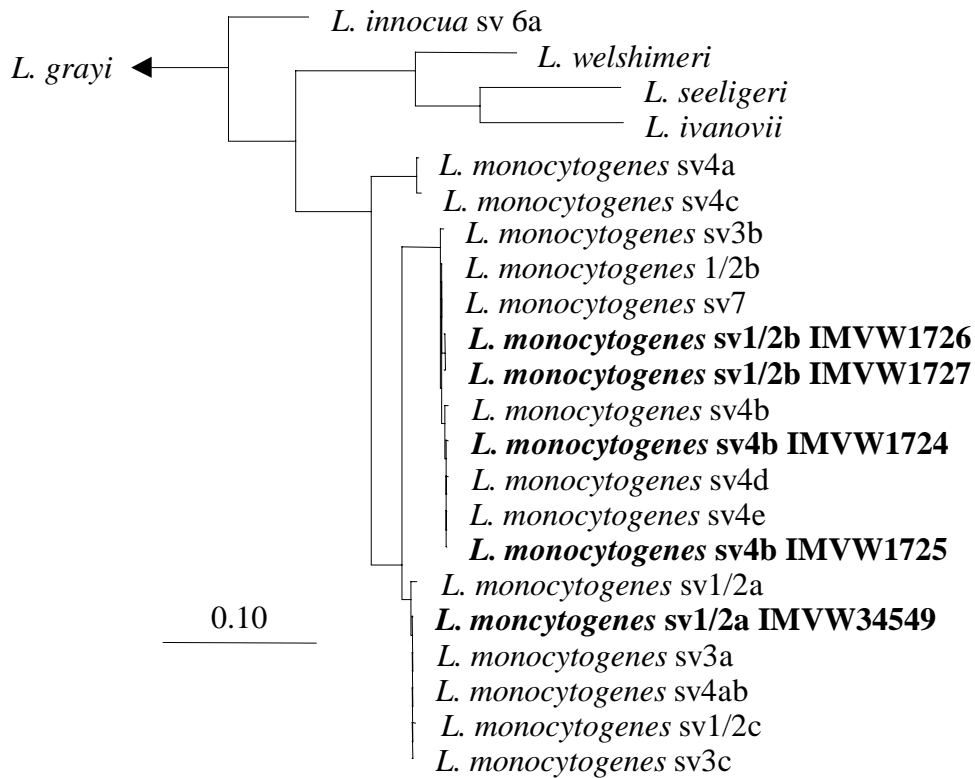
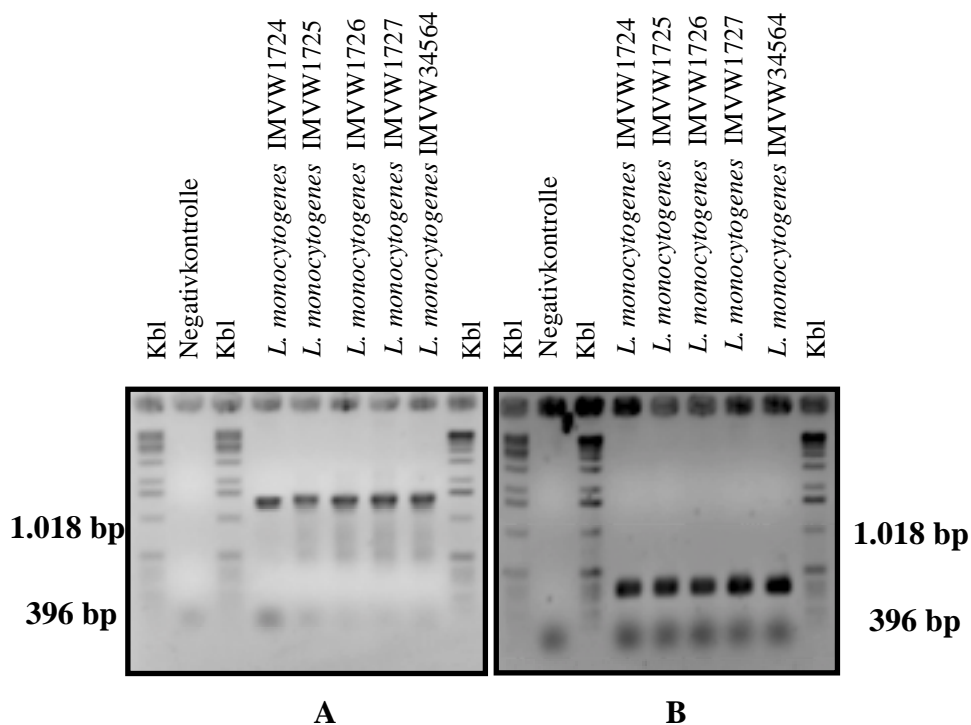


Abbildung C.20.: Phylogenetisches Dendrogramm von *iap*-Gen Sequenzen aller bekannten *Listeria* Arten, der 13 bekannten Serovarianten von *L. monocytogenes* und der fünf getesteten Isolate aus Gastroenteritis-Patienten, berechnet nach der „Neighbor-Joining“-Methode unter Verwendung eines Sequenzfilters, der die TN-„repeat“-Domäne von *L. monocytogenes* bei der Berechnung ausschließt. Der Balken gibt 10 % Sequenzdivergenz an.



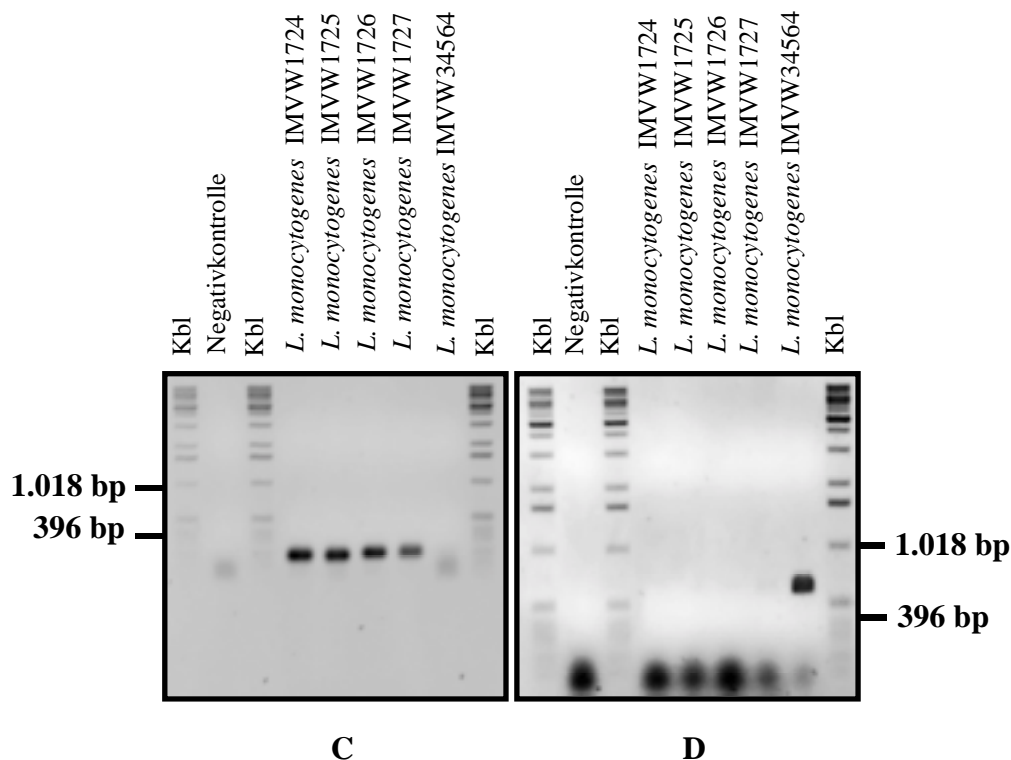


Abbildung C.21.: Ergebnisse des PCR-gestützten Nachweisverfahrens für die *Listeria*-Isolate aus Gastroenteritis-Patienten; **A** = PCR mit dem Primerpaar *iap*-P-V/*iap*-P-R; **B** = PCR mit dem Primerpaar MonoA/MonoB, spezifisch für *L. monocytogenes*; **C** = PCR, spezifisch für die evolutionäre Linie II von *L. monocytogenes* mit dem Primerpaar *iap*-P-II-820-V/*iap*-P-II-1.047-R **D** = PCR, spezifisch für die evolutionäre Linie III von *L. monocytogenes* mit dem Primerpaar *iap*-P-III-412-V/*iap*-P-III-1.047-R.

C.4.2.1.1.3.: Charakterisierung von *L. monocytogenes* verdächtigen Isolaten aus Romadur-Käse

Aus Romadur-Käse wurden wie in [B.1.3.3.] beschrieben Listerien isoliert. Zunächst bestand der Verdacht auf eine Kontamination mit *L. monocytogenes*, da die entsprechenden Medien selektiv für diesen Keim sein sollten. Es konnten sowohl auf „OXFORD“ als auch auf „PALCAM“ Selektivmedium mit Selektivsupplement [B.1.3.1.] je ein Isolat gewonnen werden, die dann anschließend mit dem entwickelten PCR-System näher untersucht wurden. Die *iap*-Sequenzanalyse zeigte, daß es sich bei beiden Isolaten nicht um wie zuerst vermutet *L. monocytogenes*, sondern um zwei Stämme von *L. innocua* handelt. Das entwickelte PCR-System lieferte übereinstimmende Ergebnisse. Das *iap*-Gen konnte erfolgreich amplifiziert werden, jedoch zeigten die durchgeführten, spezifischen PCR für *L. monocytogenes* und die jeweiligen evolutionären Linien von *L. monocytogenes* keine Amplifikationsprodukte (Abb. C.23.). Abbildung C.22. zeigt ein Dendrogramm berechnet nach der „Neighbor-Joining“-

Methode unter Verwendung eines Sequenzfilters der die TN-„repeat“-Domäne von *L. monocytogenes* bei der Berechnung ausschließt und die Romadur-Käse-Isolate beinhaltet.

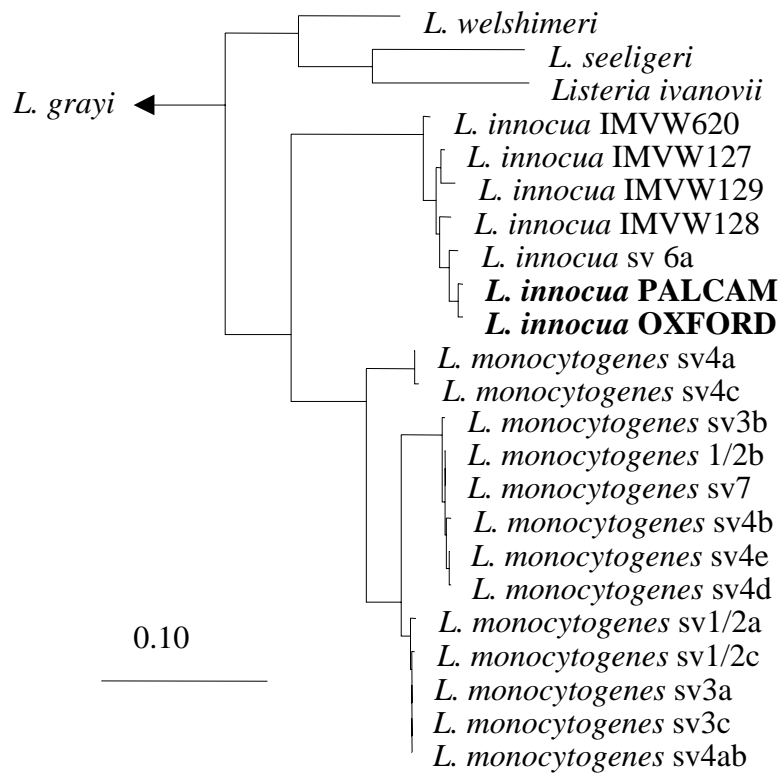


Abbildung C.22.: Phylogenetisches Dendrogramm von *iap*-Gen Sequenzen aller bekannten *Listeria* Arten, der 13 bekannten Serovarianten von *L. monocytogenes* und der beiden Isolate aus Romadur Käse. berechnet nach der „Neighbor-Joining“-Methode unter Verwendung eines Sequenzfilters der die TN-„repeat“-Domäne von *L. monocytogenes* bei der Berechnung ausschließt. Der Balken gibt 10 % Sequenzdivergenz an.

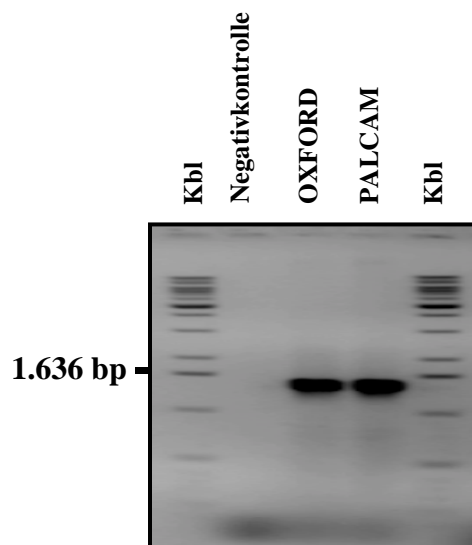


Abbildung C.23.: Ergebnisse des PCR-gestützten Nachweisverfahrens für *Listeria*-Isolate aus Romadur-Käse. PCR mit dem Primerpaar *iap*-P-V/*iap*-P-R.

C.4.2.1.1.4.: *L. monocytogenes* verdächtige Isolate aus Belebtschlamm

In dieser Arbeit wurde versucht, aus verschiedenen Belebtschlammproben Listerien zu isolieren (siehe C.1.1.) Alle Isolate wurden mit den jeweiligen PCR-Systemen wie oben beschrieben untersucht. Die Isolate konnten durch vergleichende Sequenzanalyse ihrer *iap*-Gen Sequenzen den Entwicklungslinien II (Isolat 45, 46, 1, 11 und 50) bzw. III (Isolat 3) von *L. monocytogenes* zugeordnet werden. Abbildung C.24. zeigt ein Dendrogramm berechnet nach der „Neighbor-Joining“-Methode unter Verwendung eines Sequenzfilters der die TN-„repeat“-Domäne von *L. monocytogenes* bei der Berechnung ausschließt und die Belebtschlammisolate beinhaltet.

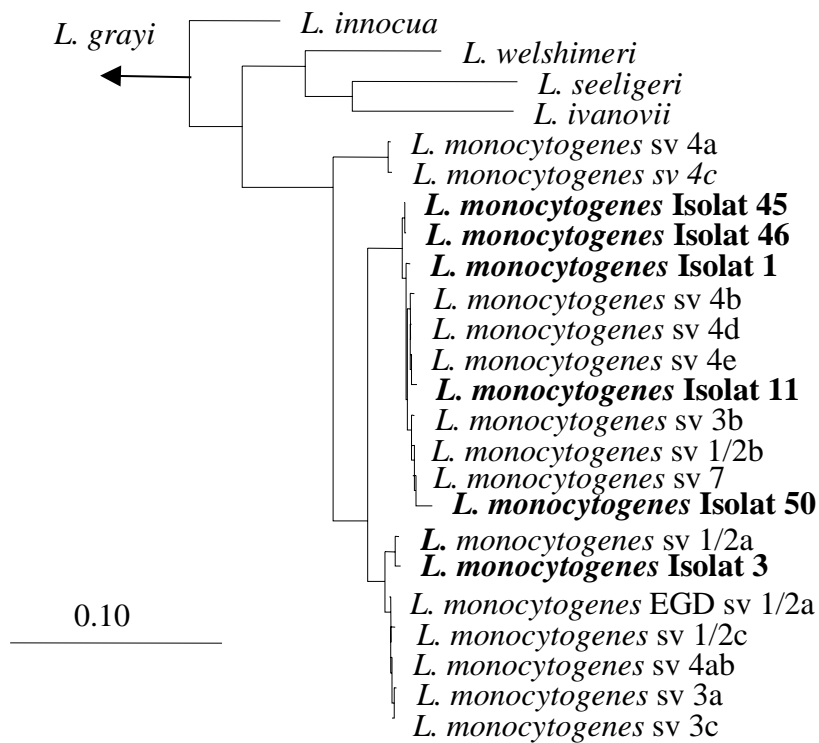


Abbildung C.24.: Phylogenetisches Dendrogramm von *iap*-Gen Sequenzen aller bekannten *Listeria* Arten, der 13 bekannten Serovarianten von *L. monocytogenes* und der Isolate aus verschiedenen Belebtschlammproben, berechnet nach der „Neighbor-Joining“-Methode unter Verwendung eines Sequenzfilters der die TN-„repeat“-Domäne von *L. monocytogenes* bei der Berechnung ausschließt. Der Balken gibt 10 % Sequenzdivergenz an.

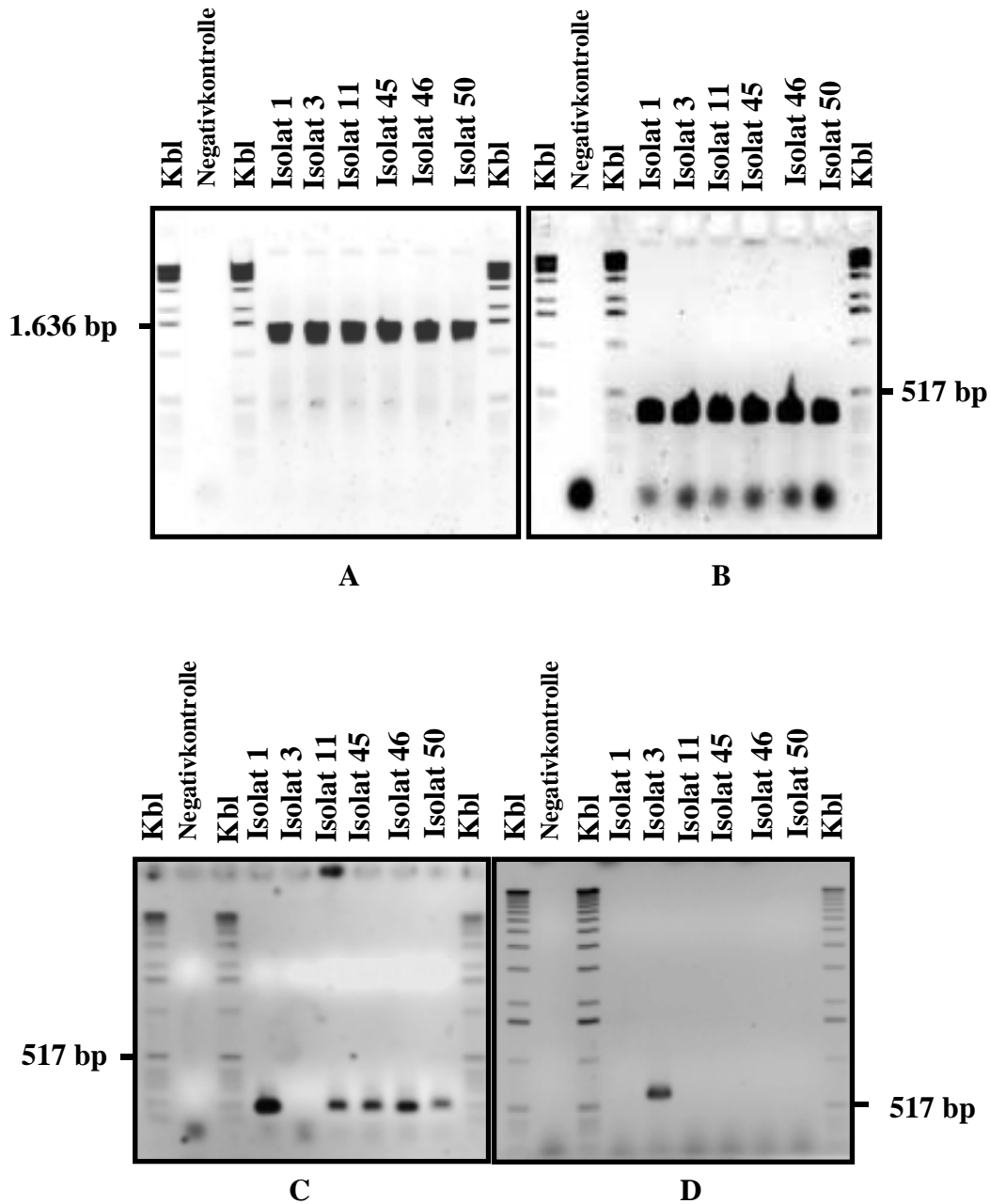
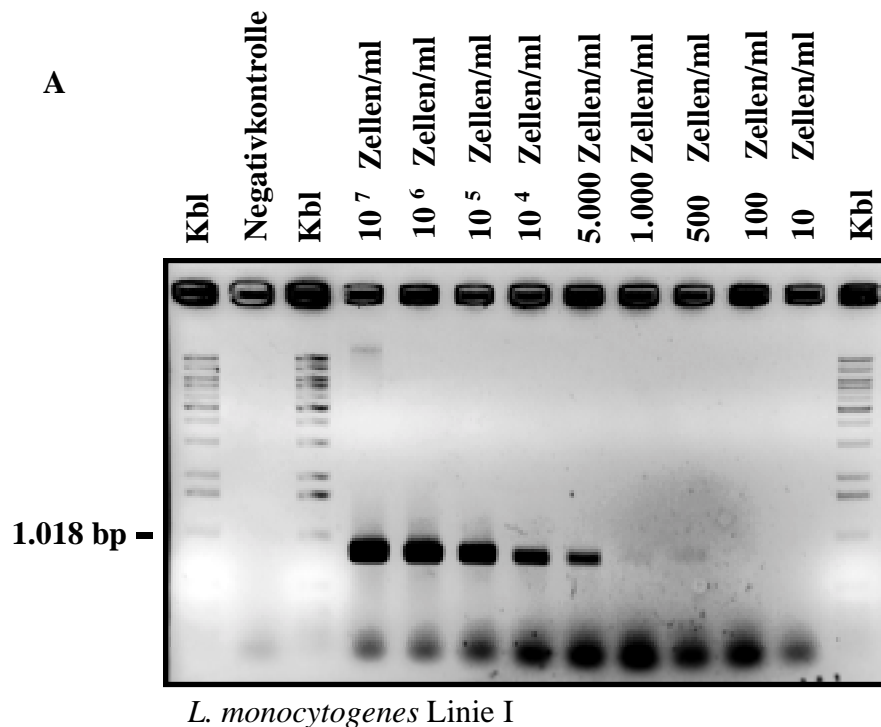


Abbildung C.25: Ergebnisse des PCR-gestützten Nachweisverfahrens für die *Listeria*-Isolate aus verschiedenen Belebtschlämmen. **A** = PCR mit dem Primerpaar *iap*-P-V/*iap*-P-R; **B** = PCR mit dem Primerpaar MonoA/MonoB, spezifisch für *L. monocytogenes*; **C** = PCR, spezifisch für die evolutionäre Linie II von *L. monocytogenes* mit dem Primerpaar *iap*-P-II-820-V/*iap*-P-II-1.047-R; **D** = PCR, spezifisch für die evolutionäre Linie III von *L. monocytogenes* mit dem Primerpaar *iap*-P-III-412-V/*iap*-P-III-1.047-R.

C.4.2.1.3.: Bestimmung des Detektionslimits des entwickelten PCR-Nachweisverfahrens für die Entwicklungslinien von *Listeria monocytogenes*

Zur Überprüfung der Detektionseffizienz bzw. des Detektionslimits des entwickelten diagnostischen PCR-Verfahrens wurde jeweils ein Vertreter jeder evolutionären Linie in 5 ml BHI Medium angezogen. Mit dieser Vorkultur wurde 50 ml steriles BHI Medium im Verhältnis 1:100 beimpft. Diese Zellen wurden bis zu einer $OD_{600} = 0,8$ angezogen und danach DNS aus 1 ml Suspension nach [B.1.5.2] isoliert. Gleichzeitig wurden zur Bestimmung der Zellzahl Plattenverdünnungsreihen in Triplikaten auf „OXFORD“ Nähragar mit Selektivsupplement [B.1.3.1.] angelegt. In die PCR wurden daraufhin äquivalente DNS-Mengen entsprechend 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 5.000, 1.000, 500, 100 und 10 Zellen eingesetzt. Das Detektionslimit lag für alle drei PCR-Primerkombinationen für die evolutionären Linien von *L. monocytogenes* bei etwa 500 Zellen/ml. Abbildung C.26. zeigt die Ergebnisse zur Überprüfung der Detektionseffizienz.



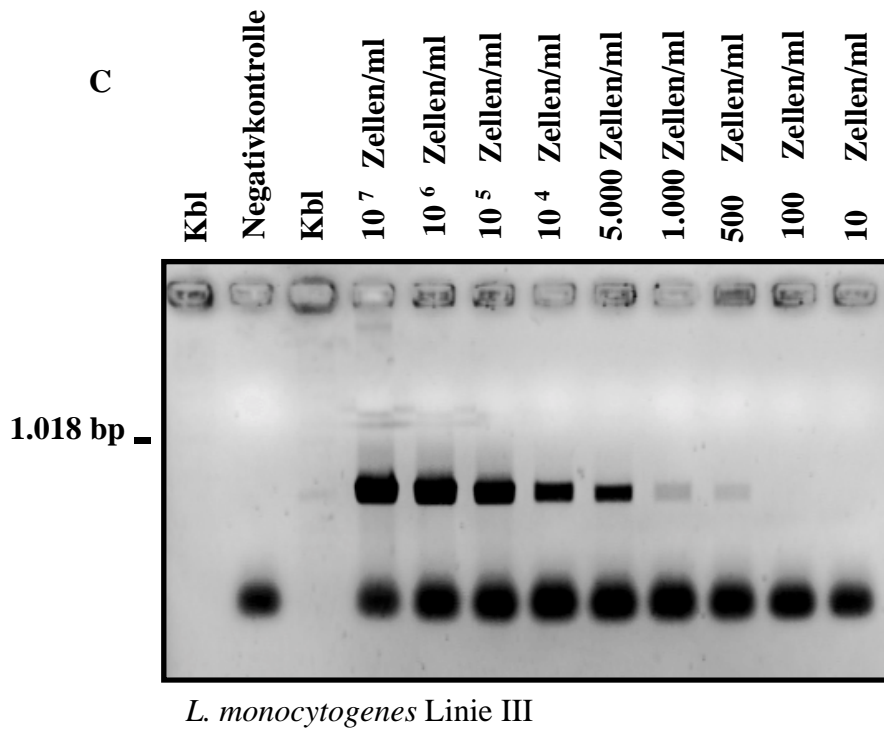
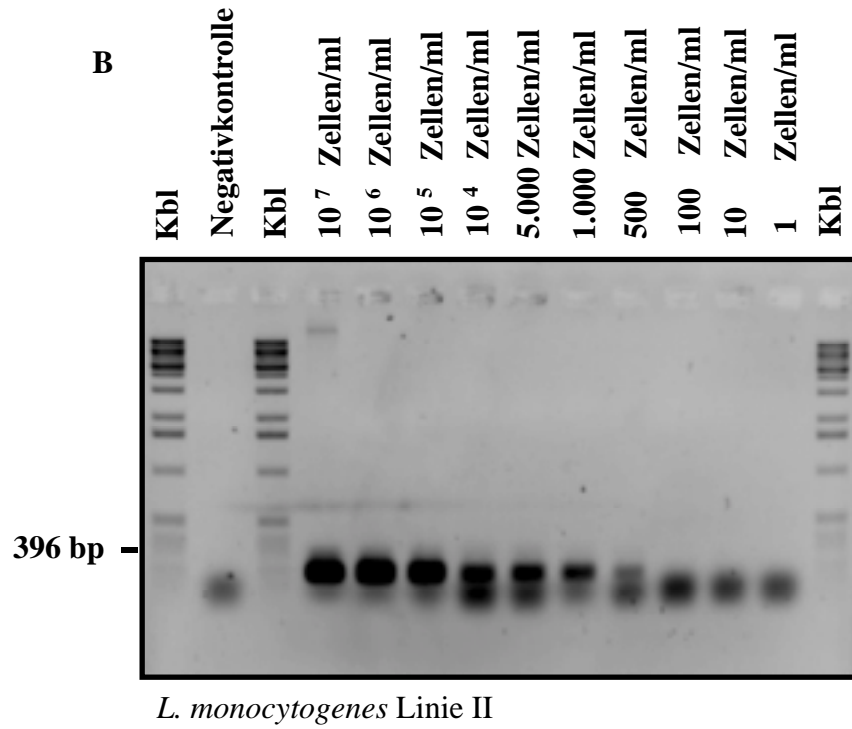


Abbildung C.26.: Ergebnisse der Überprüfung der Detektionseffizienz des entwickelten PCR-Systems. **A** = PCR, spezifisch für Linie I mit dem Primerpaar *iap*-P-I-217-V/*iap*-P-I-1.047-R; **B** = PCR, spezifisch für Linie II mit dem Primerpaar *iap*-P-II-820-V/*iap*-P-II-1.047-R; **C** = PCR, spezifisch für Linie III mit dem Primerpaar *iap*-P-III-412-V/*iap*-P-III-1.047-R. Kbl = Kilobasenleiter

C.4.2.1.4.: Verbesserung der Detektionseffizienz durch „Nested-PCR“

Zur Erhöhung der Detektionseffizienz wurden in einer „*Nested PCR*“-Variante [B.1.10.3.3.] gleichzeitig 4 Primer eingesetzt. Durch ein modifiziertes PCR-Programm wurden zuerst mit dem flankierenden Primerpaar *iap*-P-V/*iap*-P-R [B.1.10.2.4.] bei deren spezifischen „*Annealing*“-Temperatur von 50°C zuerst DNS-Stränge des gesamten *iap*-Gens innerhalb von fünf Zyklen synthetisiert. Das PCR-Programm wurde nun mit der für das interne Primerpaar *iap*-P-III-412-V/*iap*-P-III-1.047-R [B.1.10.2.4.] spezifischen „*Annealing*“-Temperatur von 54°C und der entsprechenden Elongationszeit fortgesetzt. Somit dienten die zuerst synthetisierten DNS-Stränge des gesamten *iap*-Gens wieder als Template für die spätere Vervielfältigung mit den spezifischen Primern für die evolutionäre Linie III von *L. monocytogenes*. In Abbildung C.27. ist das Ergebnis dieser PCR-Strategie zusammengefaßt. Durch diesen modifizierten Reaktionsansatz konnte das Detektionslimit bis auf 100 Zellen/ml erhöht werden.

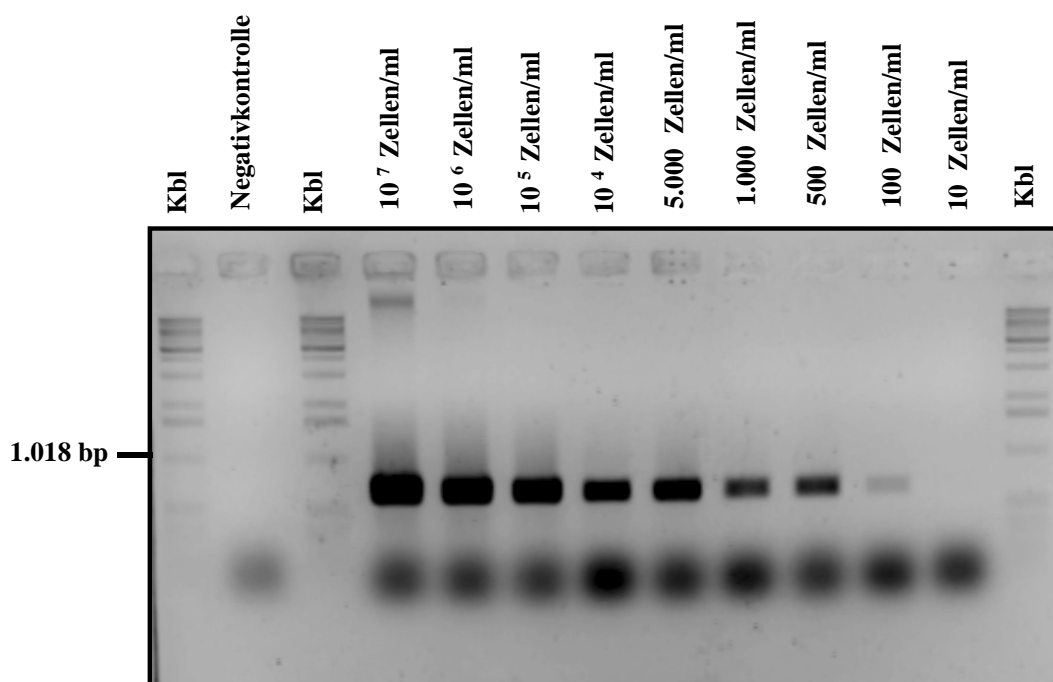


Abbildung C.27.: Verbesserung des Detektionslimits des entwickelten PCR gestützten Verfahrens zum Nachweis verschiedener evolutionärer Linien von *L. monocytogenes*. PCR mit dem Primerpaaren *iap*-P-V/*iap*-P-R und *iap*-P-III-412-V/*iap*-P-III-1.047-R.

C.4.2.1.5.: Kompetitive PCR zur Erhöhung der Spezifität

PCR mit Mischungen verschiedener *L. monocytogenes* DNS und hohen Konzentrationen an DNS zeigten zuweilen falsch positive Amplifikationsprodukte. Um dieses Problem zu unterbinden, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit und einer im Arbeitskreis angefertigten Diplomarbeit (Walcher, 1999) eine PCR-Strategie entwickelt, die neben der Verwendung gewöhnlicher Amplifikationsprimer den Einsatz von kompetitiv wirkenden PCR-Primern beinhaltet. Kompetitive Primer tragen an ihrem 3'-Terminus ein Didesoxynukleotid. Sie können daher von den DNS-Polymerasen nicht mehr verlängert werden. Diese Primer wurden so konstruiert, daß sie ohne Basenfehlpaarung zur Bindungsstelle der Nicht-Zielorganismen optimal an dessen DNS binden können. Eine Verlängerung der DNS von Nicht-Zielorganismen wird somit unterbunden. Die Primer wurden am 3'-Ende um ein Nukleotid verkürzt vom Hersteller bezogen. Das Didesoxynukleotid wurde anschließend durch das Enzym Terminale Transferase an das 3'-Ende angeknüpft [B.1.8.3.]. Abbildung C.28. zeigt die Ergebnisse dieser PCR Variante am Beispiel der PCR für die evolutionäre Linie III. Mit der Methode der kompetitiven PCR konnten so unspezifische Amplifikationsprodukte unterbunden werden.

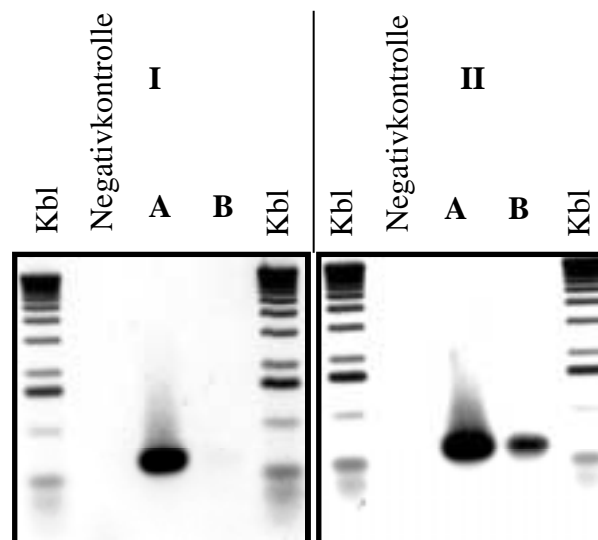


Abbildung C.28.: I = Kompetitive PCR. PCR, spezifisch für Linie III mit dem Primerpaar *iap*-P-III-412-V/*iap*-P-III-1.047-R. unter Verwendung der Kompetitoren *iap*-P-I-dd-II/III-V, *iap*-P-I-dd-III-R, *iap*-P-I-dd-II-R. II = PCR spezifisch für Linie III mit dem Primerpaar *iap*-P-III-412-V/*iap*-P-III-1.047-R. ohne Kompetitoren. A = Positivkontrolle mit DNS eines Vertreters von Linie III; B = Gemisch aus je 2 DNS aus den Linien I und II.

C.4.2.1.6.: PCR für die evolutionären Linien von *L. monocytogenes* aus DNS-Mischungen verschiedener *L. monocytogenes*-Stämmen

Die Spezifität des entwickelten PCR-Systems wurde auch mit artifiziellen DNS-Gemischen von *L. monocytogenes* überprüft. Dazu wurden jeweils PCR für die jeweiligen evolutionären Linien von *L. monocytogenes* durchgeführt und jeweils DNS-Gemische der Ziel-DNS und 4 weiteren DNS aus den beiden anderen evolutionären Linien von *L. monocytogenes* hergestellt. In die PCR wurden jeweils 100 ng DNS eingesetzt. Abbildung C.29. faßt die Ergebnisse zusammen. Mit dem entwickelten PCR-System war es auch möglich einzelne *L. monocytogenes*-Stämme spezifisch in einem Gemisch von *L. monocytogenes*-Isolaten verschiedener Entwicklungslinien zu detektieren.

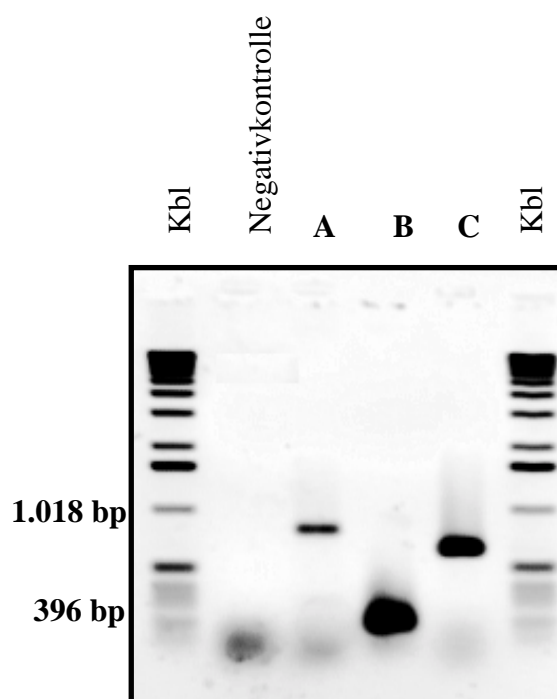


Abbildung C.29: **Spur A:** PCR spezifisch für die evolutionäre Linie I von *L. monocytogenes* mit DNS-Gemisch aus *L. monocytogenes* sv4a (Linie I), *L. monocytogenes* sv4b, *L. monocytogenes* sv1/2b (beides Linie II), *L. monocytogenes*-Stamm EGD sv1/2a und *L. monocytogenes* sv1/2a IMVW34549 (beides Linie III).. **Spur B:** PCR spezifisch für die evolutionäre Linie II von *L. monocytogenes* mit DNS Gemisch aus *L. monocytogenes* sv4a, *L. monocytogenes* sv4c (beides Linie I), *L. monocytogenes* sv4b (Linie II), *L. monocytogenes*-Stamm EGD sv1/2a und *L. monocytogenes* sv 1/2a IMVW34549 (beides Linie III). **Spur C:** PCR spezifisch für die evolutionäre Linie III von *L. monocytogenes* mit DNS Gemisch aus *L. monocytogenes* sv4a, *L. monocytogenes* sv4c (beides Linie I), *L. monocytogenes* sv4b, *L. monocytogenes* sv1/2b (beides Linie II) und *L. monocytogenes* Stamm EGD sv1/2a (Linie III)

C.4.2.1.7.: Differenzierung von *L. innocua* und *L. monocytogenes* durch „Multiplex“-PCR

Aus mit Listerien kontaminierten Lebensmitteln werden hauptsächlich nur die beiden Arten *L. innocua* und *L. monocytogenes* isoliert. Die übrigen vier Arten der Gattung *Listeria* treten weitaus weniger als Kontaminanten auf. In der vorliegenden Arbeit konnte durch einen „Multiplex“-PCR Ansatz [B.1.10.3.4.] *L. innocua* von *L. monocytogenes* differenziert werden. In die Reaktion wurden die beiden Primerpaare *iap*-P-V/*iap*-P-R [B.1.10.2.4.] und *plcA*-V/*plcA*-R [B.1.10.2.5.] gleichzeitig eingesetzt. Bei *L. monocytogenes* sollten nach erfolgreicher Amplifikation zwei Produkte auftreten, die zum einen von der Amplifikation des *iap*-Gens (ca. 1,45 kbp) und zum anderen von der Amplifikation des *plcA*-Gens (ca. 850 bp) stammen. Bei *L. innocua* hingegen sollte nur das Amplifikationsprodukt des *iap*-Gens detektierbar sein, da in *L. innocua* bisher kein *plcA* nachgewiesen werden konnte (siehe auch C.3.1.). In Abbildung C.30. sind die Ergebnisse zusammengefaßt. Bei den eingesetzten *L. monocytogenes*-Stämmen sind die beiden Amplifikationsprodukte mit richtiger Größe zu erkennen, während bei *L. innocua* nur eine Bande, die in der Größe dem *iap*-Gen Produkt entspricht, nachweisbar ist. Die Primer *plcA*-V und *plcA*-R wurden spezifisch für *L. monocytogenes* konstruiert und liefern unter stringenten Bedingungen mit DNS von *L. seeligeri* und *L. ivanovii*, die ebenfalls ein *plcA*-Gen besitzen, kein Amplifikationsprodukt (Daten nicht gezeigt).

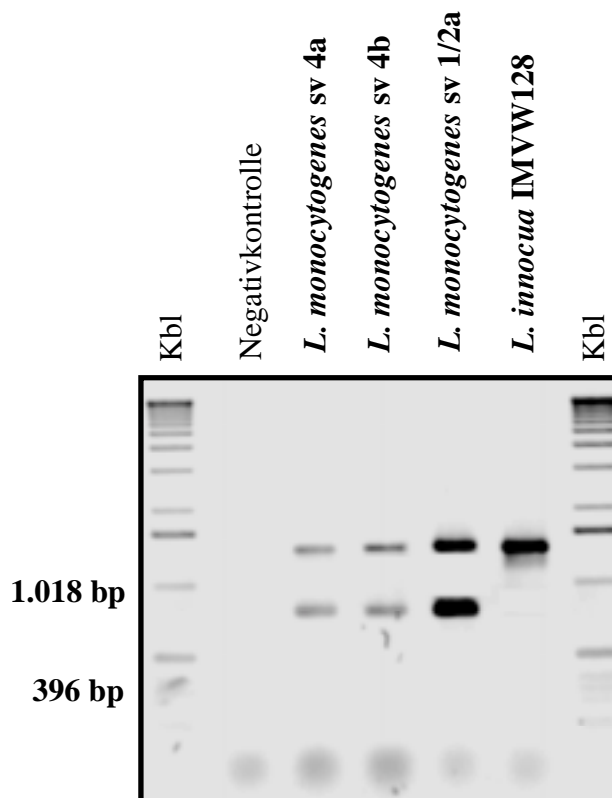


Abbildung C.30.: Ergebnisse der „Multiplex“-PCR zur Differenzierung zwischen *L. innocua* und *L. monocytogenes*.

C.4.2.2.: Schnelltypisierung von Listerien durch „Einspursequenzierung“

Sporadische Ausbrüche von Listeriose sind meistens auf die Aufnahme von kontaminierten Lebensmitteln zurückzuführen. Um den genauen Infektionsherd auszumachen, bedarf es oft der Untersuchung sehr vieler Proben unterschiedlichsten Ursprungs (z.B. aus Käseereien oder anderen rohmilchverarbeitenden Betrieben). Aber auch die routinemäßige Überprüfung von lebensmittelerzeugenden Betrieben verlangt nach schnellen und zuverlässigen Methoden, den Kontaminationsherd zu entdecken, um geeignete Maßnahmen zur Sanierung ergreifen zu können. Auch epidemiologische Untersuchungen bedürfen zuverlässiger und schneller Methoden, um *Listeria*-Stämme zu differenzieren. Die Möglichkeit eines hohen Probendurchsatzes ist dabei von großem Vorteil. Aus den oben genannten Gründen wurde in der vorliegenden Arbeit die sehr schnelle Methode der „Einspursequenzierung“ eingesetzt, um Listerien zum einen und besonders *L. monocytogenes*-Stämme näher differenzieren zu können. Dazu wurde das *iap*-Gen der jeweiligen Stämme mit dem Primerpaar *iap*-P-V und *iap*-P-R [B.1.10.2.4.] mittels PCR [B.1.10.] amplifiziert und danach direkt mit dem

Sequenzierprimer *iap*-P-V-IR [B.1.11.1.] einer Sequenzanalyse unterzogen. Hier wurden jedoch nicht alle Terminatoren, wie bei einer normalen Sequenzierreaktion [B.1.11.3.] zur Bestimmung der Nukleinsäuresequenz eingesetzt, sondern nur ein einziger. Man erhält ein Bandenmuster, das es erlauben sollte, Arten und die einzelnen Stämme zu unterscheiden.

C.4.2.2.1.: Schnelltypisierung von *L. innocua* und *L. monocytogenes* durch Einspurresequenzierung

Durch die Methode der Einspurresequenzierung konnten *L. monocytogenes* eindeutig von verschiedenen *L. innocua* Stämmen unterschieden werden. Als Terminatoren wurden ddCTP im Reaktionsansatz verwendet. Nach Auftrennung der Sequenzierreaktion konnten durch die entstandenen Bandenmuster die getesteten *L. innocua* Stämme eindeutig von *L. monocytogenes*-Stämmen jeder evolutionären Linie unterschieden werden. Abbildung C.31. zeigt exemplarisch einen Ausschnitt des erhaltenen Bandenprofils. Die Einspurresequenzierung eignete sich mit jedem der eingesetzten Terminatoren zur Differenzierung von *L. monocytogenes* und *L. innocua* (Daten nicht gezeigt).

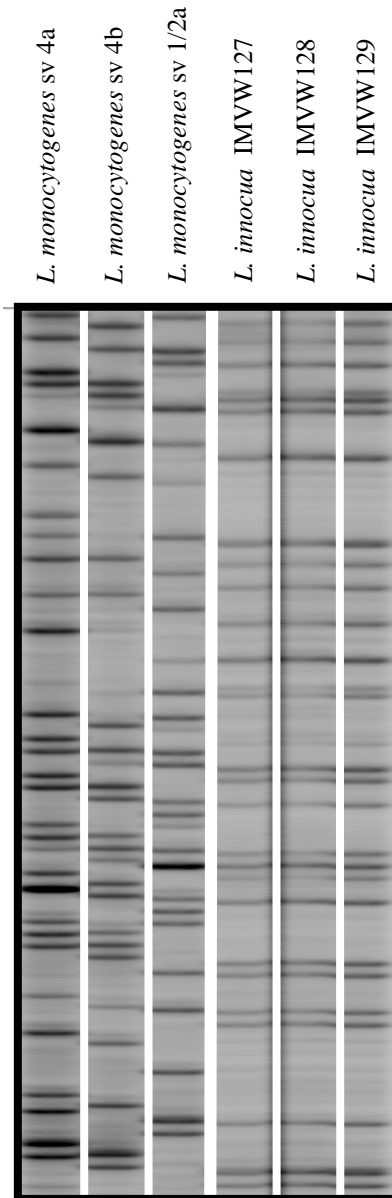


Abbildung C.31.: Ausschnitt aus dem erhaltenen Bandenmuster nach Einspurresequenzierung der *iap*-Gene von *L. monocytogenes* sv 4a TUMLis6, *L. monocytogenes* sv 4b SLCC4013, *L. monocytogenes* Stamm EGD 1/2a TUMLis18, *L. innocua* IMVW127, *L. innocua* IMVW128 und *L. innocua* IMVW129 mit dem Sequenzierprimer *iap*-V-IR unter Verwendung des ddCTP Terminationsmix.

C.4.2.2.2.: Schnelltypisierung von *L. monocytogenes* durch Einspurresequenzierung

Nicht nur die schnelle Differenzierung zwischen *L. monocytogenes* und *L. innocua* ist in der Lebensmittelhygiene und für epidemiologische Untersuchung von Bedeutung, sondern vor allem auch die Subtypisierung von *L. monocytogenes* verdächtigen Isolaten. Durch Anwendung der Einspurresequenzierung war es sehr leicht möglich, spezifische Bandenmuster für jede Entwicklungslinie von *L. monocytogenes* zu erhalten. Aus dem durch Einspurresequenzierung erhaltenen Bandenmuster ließen sich die *L. monocytogenes* Isolate eindeutig der jeweiligen evolutionären Linie zuordnen. Nach Amplifikation der *iap*-Gene der 13 verschiedenen Serovarianten von *L. monocytogenes* mit dem Primerpaar *iap*-P-V/*iap*-P-R [B.1.10.2.4.] mittels PCR [B.1.10.] wurden die erhaltenen Amplifikate einer Einspurresequenzierung unter Verwendung von ddCTP als Terminationsmix mit dem Sequenzierprimer *iap*-V-IR [B.1.11.1.] unterworfen. In Abbildung C.32. ist ein Ausschnitt aus dem erhaltenen Bandenmuster für die jeweiligen Serovarianten von *L. monocytogenes* wiedergegeben.

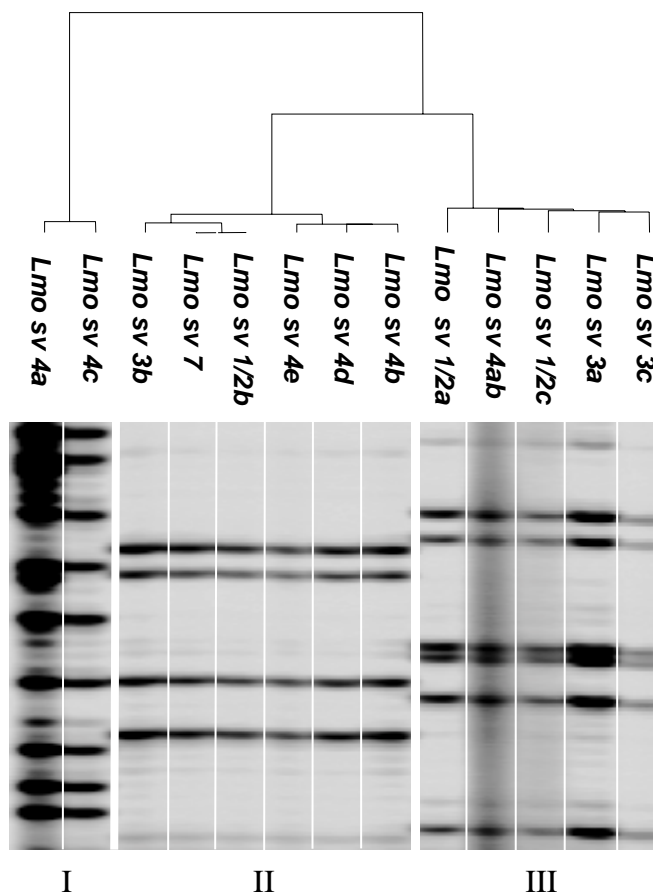


Abbildung C.32.: Ausschnitt aus dem erhaltenen Bandenmuster nach Einspursequenzierung der *iap*-Gene der 13 Serovarianten von *L. monocytogenes* mit dem Sequenzierprimer *iap*-V-IR unter Verwendung des ddCTP Terminationsmix. *Lmo* = *L. monocytogenes*. I, II, III = jeweilige evolutionäre Linie von *L. monocytogenes*.

C.4.2.3.: Stammdifferenzierung von *L. monocytogenes* durch „pulsed-field“-Gelelektrophorese (PFGE)

Die Methode der PFGE in Kombination mit RFLP [B.1.14.] ist neben der Serotypisierung (Seeliger und Höhne, 1979) und Phagentypisierung (Rocourt, *et al.*, 1985) eine Standardmethode zur Differenzierung von *L. monocytogenes* Stämmen geworden (Brosch *et al.*, 1994; Nakama *et al.*, 1998; Proctor *et al.*, 1995). Diese Methode zur Subtypisierung von Stämmen einer Art ist relativ aufwendig, zeichnet sich aber bei geeigneter Reaktionsführung und Handhabung der Keime als sehr zuverlässig und reproduzierbar aus. In der vorliegenden Arbeit wurden 13 *L. monocytogenes* Stämme, die alle bekannten Serovarianten abdecken, durch PFGE-RFLP untersucht. Für die Subtypisierung von *L. monocytogenes* mittels PFGE-RFLP wurden die Restriktionsendonukleasen *ApaI* und *AscI* verwendet. Diese beiden Enzyme werden für die Typisierung von Listerien durch PFGE-RFLP am meisten verwendet (Howard *et al.*, 1992). Die erhaltenen Bandenmuster wurden als digitalisiertes Bild mittels eines Geldokumentationssystems gespeichert und unter Verwendung von Bildverarbeitungsprogrammen dem jeweiligen Serotyp von *L. monocytogenes* im Dendrogramm zugeordnet (Abb. C.33. und C.34.).

Bei der enzymatischen Hydrolyse von DNS der 13 untersuchten *L. monocytogenes*-Stämme durch die Restriktionsendonuklease *ApaI* konnten für die Entwicklungslinien II und III von *L. monocytogenes* verschiedene Bandenmustertypen erhalten werden (Abb. C.33.). Die beiden Stämme *L. monocytogenes* sv 4a und *L. monocytogenes* sv 4c (beide Entwicklungslinie I) besaßen offensichtlich keine Schnittstelle in ihrem Genom für dieses Enzym. Auch bei mehrmaliger Wiederholung der PFGE konnten für diese beiden Stämme keine Bandenmuster bei Verwendung des Enzyms *ApaI* erhalten werden (Abb. C.34.).

ERGEBNISSE

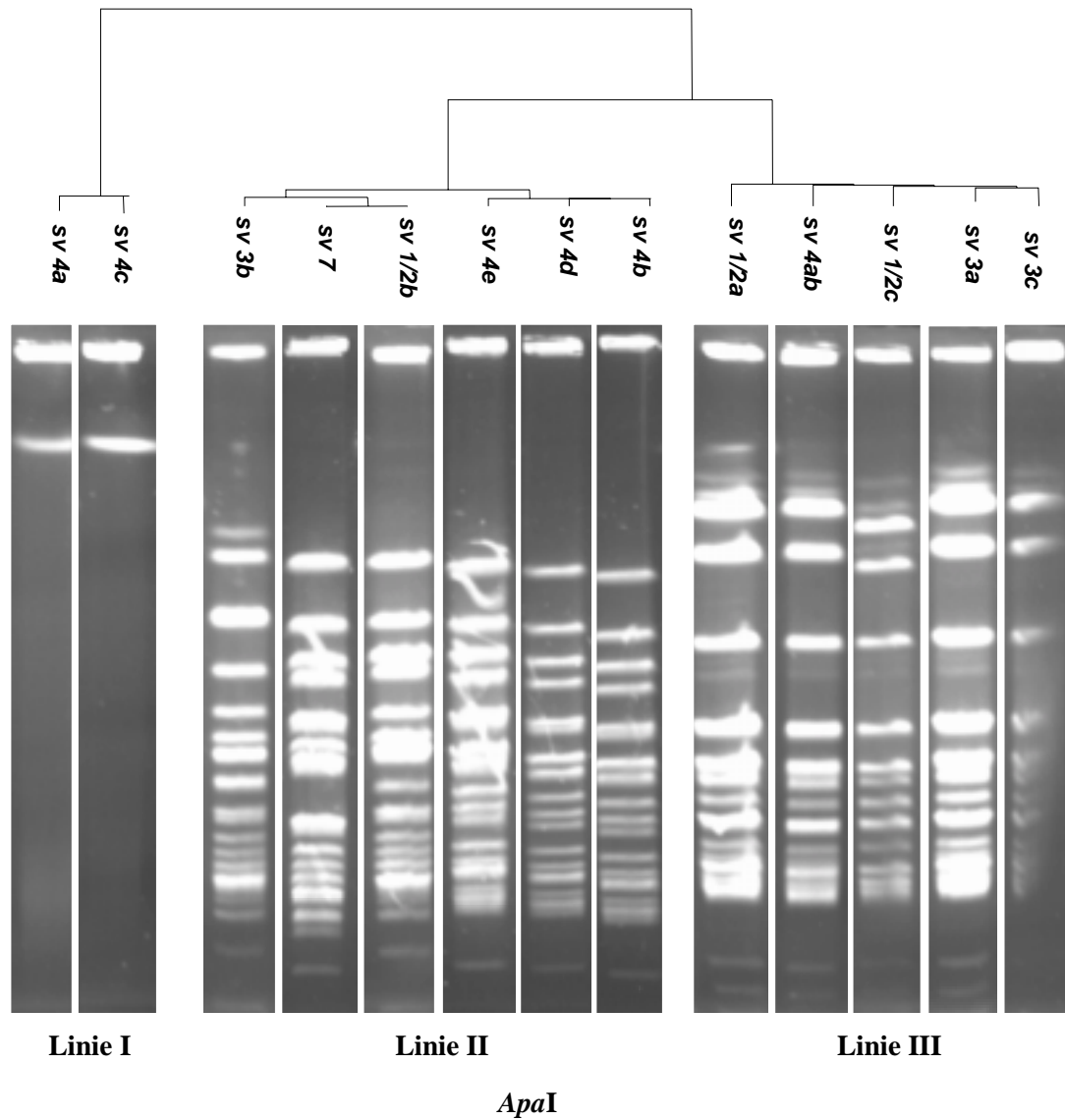


Abbildung C.33.: Erhaltene Fragmentmuster nach PFGE-RLFP Analyse mit der Restriktionsendonuklease *ApaI*. Oben dargestelltes Dendrogramm gibt die jeweilige Zuordnung der untersuchten *L. monocytogenes*-Stämme zur jeweiligen evolutionären Linie wieder.

Durch Hydrolyse der DNS mit der Restriktionsendonuklease *AscI* konnten für jede der drei Entwicklungslinien von *L. monocytogenes* unterschiedliche Typen an Bandenmuster detektiert werden. Auch die beiden untersuchten Stämme der Entwicklungslinie I besaßen Schnittstellen für das Enzym *AscI* und unterschieden sich in ihrem Bandenmuster von den *L. monocytogenes* Stämmen der anderen Entwicklungslinien, aber auch untereinander (Abb. C.34.).

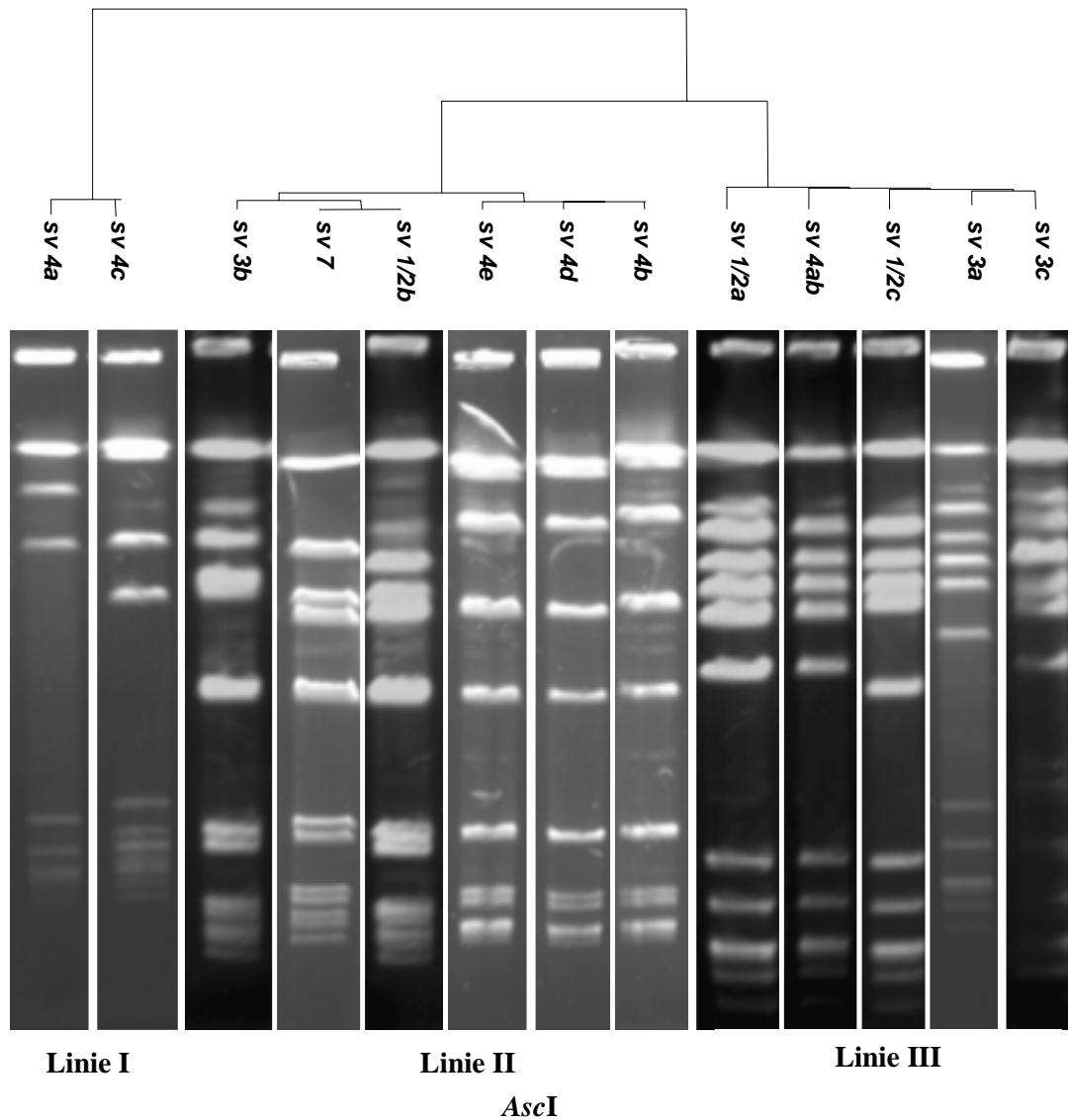


Abbildung C.34.: Erhaltene Fragmentmuster nach PFGE-RLFP-Analyse mit der Restriktionsendonuklease *AscI*.
 Oben dargestelltes Dendrogramm gibt die jeweilige Zuordnung der untersuchten *L. monocytogenes*-
 Stämme zur jeweiligen evolutionären Linie wieder.

Die 13 untersuchten Stämme von *L. monocytogenes* konnten nach PFGE-RFLP-Analyse auch innerhalb der jeweiligen Entwicklungslinien näher unterteilt werden. So konnten die sechs *L. monocytogenes* Serovarianten, die aufgrund der *iap*-Gen und *plcA*-Gen Sequenzanalyse in die Entwicklungslinie II von *L. monocytogenes* eingeordnet wurden, noch innerhalb dieser Linie unterschieden werden. Die Serovarianten 1/2b, 3b und 7 zeigten aufgrund ihrer Bandenmuster, die nach Restriktion mit *ApaI* und *AscI* erhalten wurden mehr Ähnlichkeit zueinander als gegenüber den Serotypen 4b, 4d und 4e. Auch innerhalb dieser beiden Gruppen, konnten noch Unterschiede in den Bandenmustern detektiert werden.

Auffallend war, daß die Stämme *L. monocytogenes* sv4b, *L. monocytogenes* sv 4d und *L. monocytogenes* sv 4e bei Verwendung annähernd gleiche bis identische Bandenmuster nach PFGE-RFLP-Analyse zeigten. Dies soll im Diskussionsteil näher behandelt werden.

C.4.2.4.: Differenzierung von *L. monocytogenes* durch RAPD-PCR

Eine verbreitete Methode zur Unterscheidung nah verwandter Organismen oder zur Stammdifferenzierung von Organismen einer Art, ist die sogenannte RAPD-PCR (Mazurier und Wernars, 1992) [B.1.10.3.5.]. In der vorliegenden Arbeit wurden für die Durchführung der RAPD-PCR die drei Primer HLWL-74, OPM-1, UBC-127 [B.1.10.2.6.] eingesetzt. Diese waren immer Dekamere mit einem T_D Wert von 50°C. Die PCR wurde mit einer „Annealing“-Temperatur von 37°C durchgeführt. Durch die sehr unstringenten Bedingungen kommt es durch zufällige Bindung des Primers an verschiedene, komplementäre Bereiche im Chromosom und die zyklische Amplifikation nach Auftrennung der PCR-Produkte in einer Agarosematrix zur Ausbildung eines Bandenmusters, das spezifisch für einen bestimmten Organismus oder Stamm sein kann. Es sollte herausgefunden werden, ob sich die Methode der RAPD-PCR eignet, spezifische Banden für jede der evolutionären Linien von *L. monocytogenes* zu erhalten. Abbildung C.35. zeigt die Ergebnisse nach Auftrennung der Amplifikate in einem 2 % Agarosegel und anschließender Anfärbung der Fragmente mit Ethidiumbromid. Bei Verwendung des Primers OPM-1 konnten spezifische Amplifikate für die evolutionären Linien II und III von *L. monocytogenes* erhalten werden. Die PCR lieferte ein ca. 2,1 kb großes Amplifikat für die Entwicklungslinie I von *L. monocytogenes*, das bei den anderen beiden Linien nicht auftrat. Ebenso konnte spezifisch für die Entwicklungslinie III von *L. monocytogenes* ein spezifisches Amplifikat mit etwa 2.4 kb Länge detektiert werden. Für die evolutionäre Linie I von *L. monocytogenes* konnte bei Verwendung des Primers OPM-1 kein spezifisches Amplifikat detektiert werden. Anders bei Verwendung des Primers UBC-127 in der RAPD-PCR. Hier konnte ein spezifisches Amplifikat mit etwa 1.8 kb Größe, das spezifisch für die Entwicklungslinie I von *L. monocytogenes* scheint detektiert werden. Dieses war bei den anderen beiden Entwicklungslinien nicht zu detektieren. Spezifische Amplifikate für die evolutionären Linien II und III konnten jedoch nicht detektiert werden. Somit eignet sich die Methode der RAPD-PCR nur bedingt zur Einteilung von *L. monocytogenes* in die jeweiligen evolutionären Linien. Der Einsatz des Primers HLWL-74 erbrachte vergleichbare Resultate (Daten nicht gezeigt).

Eine Differenzierung zwischen *L. innocua* und *L. monocytogenes* war aber durch RAPD-PCR bei allen drei Primern möglich (Daten nicht gezeigt).

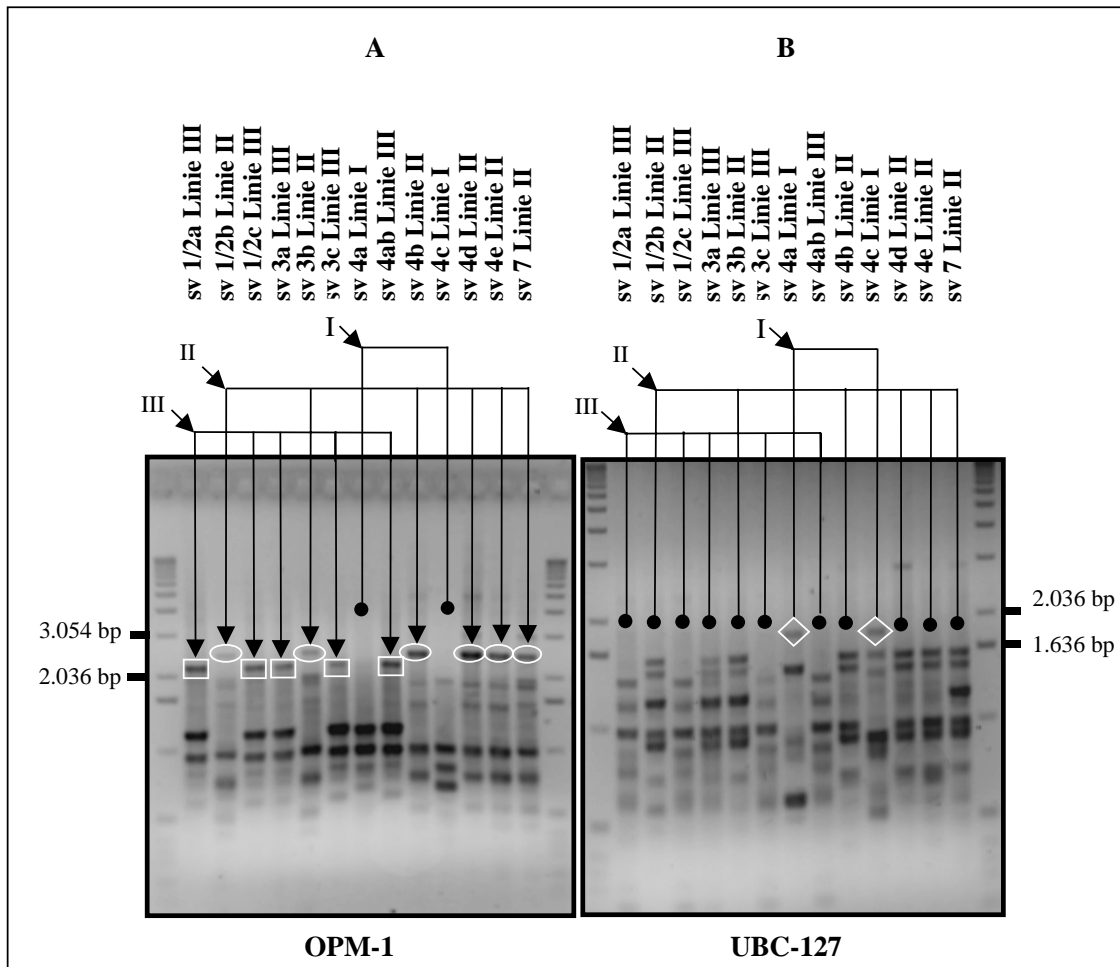


Abbildung C.35.: Ergebnisse der RAPD-PCR mit DNS aus allen 13 Serovarianten von *L. monocytogenes*. **A** Resultierendes Bandenmuster bei Einsatz des Primers OPM-1 in die RAPD-PCR, **rechteckige Umrandung** = spezifisches Amplifikat für die Entwicklungslinie III von *L. monocytogenes*, **ovale Umrandung** = spezifisches Amplifikat für die Entwicklungslinie I von *L. monocytogenes* **B** Resultierendes Bandenmuster bei Einsatz des Primers UBC-127 in die RAPD-PCR, **rautenförmige Umrandung** = spezifisches Amplifikat für die Entwicklungslinie I von *L. monocytogenes*.

C.5.: Infektionsstudien mit *L. monocytogenes*

Durch detaillierte vergleichende Sequenzanalyse zweier Virulenzfaktoren von *L. monocytogenes* konnte gezeigt werden, daß sich im Laufe der Evolution *L. monocytogenes* in drei Entwicklungslinien aufgetrennt hat [siehe C.4.1.1. und C.4.1.2.]. In der Literatur als fast nicht virulent beschriebene Stämme von *L. monocytogenes*, die den Serovarianten sv 4a und sv 4c angehören, gruppieren in die Entwicklungslinie I. Dagegen gruppieren alle untersuchten *L. monocytogenes*-Stämme, die den Serovarianten 4b und 1/2b angehören in die Linie II und alle Stämme die den Serotyp 1/2a angehören in Entwicklungslinie III. Diese drei letztgenannten Serotypen stellen die dominanten Serotypen der Isolate von Listeriose-Ausbrüchen dar. Diese Beobachtungen sprechen dafür, daß es Unterschiede an Virulenz und Adhärenz zwischen den einzelnen evolutionären Linien von *L. monocytogenes* gibt. Aus den oben genannten Gründen wurden Infektionsversuche von Zellkulturen mit verschiedenen *L. monocytogenes* Stämmen durchgeführt. Es wurden sowohl *L. monocytogenes*-Stämme als auch mit „grün-fluoreszierenden-Protein“ (im folgenden GFP)-markierte *L. monocytogenes* Stämmen verwendet.

C.5.1.: Infektion mit nativen *L. monocytogenes*-Stämmen

Für Infektionsstudien wurden die Stämme *L. monocytogenes* sv 4a, sv 4b SLCC4013 (Entwicklungslinie II), Stamm EGD sv 1/2a TUMLi18 und der Stamm „Aachen“ sv 1/2a TUMLi17 (beide Entwicklungslinie III) verwendet. Als Zelllinien standen Darmepithelzellen (CaCo-2), Hepatozyten (Tib-73) und eine Makrophagenzelllinie (P-388) zur Verfügung [B.2.1.]. Die Infektionen wurden wie in [B.2.7.] beschrieben durchgeführt. Im Medium befindliche *Listeria*-Zellen, die Wirtszellen nicht infiziert haben, wurden durch Einsatz des Antibiotikums Gentamycin im Zellkulturmedium abgetötet. Demnach sollten nur *L. monocytogenes* Zellen lebensfähig sein, welche die Wirtszelle bereits infiziert haben. Die erhaltenen Infektionswerte nach 1 h und 20 h Infektionsdauer zeigten ein offensichtlich unterschiedliches Infektionsverhalten der verwendeten Stämme. Tabelle C.9. faßt die erhaltenen Werte zusammen. Der Stamm *L. monocytogenes* sv 4a TUMLi6 aus der Entwicklungslinie I scheint demnach weniger infektiös zu sein, wie die verwendeten Stämme aus den beiden anderen Entwicklungslinien von *L. monocytogenes*.

Tabelle C.9.: Infektion der verwendeten Zelllinien mit nativen *L. monocytogenes*-Stämmen. Gezeigt sind die Infektionswerte nach 1h und 20 h. Lmo = *L. monocytogenes*.

Zelllinie	Infektionszeit [h]	Lmo sv 4a	Lmo sv 4b	Lmo EGD sv 1/2a	Lmo Aachen
Tib-73	1	$6,0 \times 10^2$	$2,4 \times 10^4$	$4,0 \times 10^4$	$9,2 \times 10^4$
	20	$1,2 \times 10^4$	$2,3 \times 10^5$	$1,1 \times 10^5$	$4,5 \times 10^5$
P-388	1	$4,4 \times 10^4$	$1,0 \times 10^5$	$2,6 \times 10^5$	$2,4 \times 10^5$
	20	$2,4 \times 10^5$	$4,0 \times 10^5$	$5,8 \times 10^5$	$2,8 \times 10^6$
CaCo-2	1	$9,8 \times 10^2$	$1,8 \times 10^5$	$4,4 \times 10^4$	$1,6 \times 10^5$
	20	$4,4 \times 10^4$	$5,2 \times 10^6$	$1,3 \times 10^6$	$1,1 \times 10^7$

C.5.2.: Markierung von *L. monocytogenes*-Stämmen mit dem grün-fluoreszierenden Protein

Die in C.5.a. erwähnten *L. monocytogenes*-Stämme wurden mit GFP markiert. Das *gfp*-Gen befand sich auf Plasmiden, die zudem als Selektionsmarker das Gen für die Tetracyclinresistenz trugen (Bubert *et al.*, 1999). Die *L. monocytogenes*-Stämme wurden wie in [B.1.9.2.] beschrieben mit den GFP-Plasmiden transformiert. Dabei wurden zwei verschiedene Plasmide verwendet. Beim Plasmid *psod*-GFP stand die Expression des GFP unter der Kontrolle des konstitutiv exprimierten Promotors der Superoxiddismutase aus *L. monocytogenes* [B.1.2.]. Mit diesem Plasmid markierte *L. monocytogenes*-Stämme zeigen bei Anregung mit UV Licht geeigneter Wellenlänge immer grüne Fluoreszenz. Beim Plasmid *pactA*-GFP [B.1.2.] stand die Expression des GFP unter der Kontrolle des *actA*-Promotors. Dieser Promotor ist nur im Wirtszellzytosol aktiv (Dietrich, *et al.*, 1998). Mit diesem Plasmid markierte *L. monocytogenes*-Stämme zeigen nur grüne Fluoreszenz wenn die *L. monocytogenes* Zellen sich im Wirtszellzytosol befinden, das heißt sie müssen die Zellen infiziert und das Phagosom schon verlassen haben. In Abbildung C.36. sind Ausstriche der beiden Stämme *L. monocytogenes*^{*psod*-GFP} sv 4b und *L. monocytogenes*^{*pactA*-GFP} sv 4b auf BHI^{Tet} 7,5 gezeigt. Abbildung C.36. C und D zeigen die Expression des GFP beim Stamm *L. monocytogenes*^{*psod*-GFP} sv 4b auf Einzelzellebene. Die Überprüfung der mit dem Plasmid *pactA*-GFP transformierten *L. monocytogenes*-Stämme erfolgte durch einfache Infektion von Zelllinien mit den nach der Transformation erhaltenen Klone. Zeigten die Klone grüne Fluoreszenz wurden diese weiter verwendet. Klone die nach Infektion keine Fluoreszenz zeigten, wurden verworfen. Die Überprüfung der Markierung mit dem Plasmid *psod*-GFP erfolgte durch mikroskopische Betrachtung unter UV-Anregung.

C.5.3.: Infektion mit GFP-markierten *L. monocytogenes*-Stämmen

Die Infektion der drei verwendeten Zelllinien wurde wie in [B.2.8.] beschrieben durchgeführt. Die Infektionsraten wurden anschließend durch Messung an einem Durchflußcytometer ermittelt. Zur Auswertung standen vier Kanäle („*gates*“) zur Verfügung. Durch Zugabe von Propidiumiodid zu den abgelösten Zellen konnte zwischen lebenden und toten eukaryotischen Zellen, durch das GFP zwischen infizierten und nicht infizierten Zellen unterscheiden werden. In Kanal 1 wurden lebend-infizierte, in Kanal 2 tote, nicht-infizierte, in Kanal 3 lebende, nicht-infizierte Zellen und in Kanal 4 tote nicht-infizierte Zellen detektiert. Für jedes Experiment wurden 10.000 Zellen vermessen.

Die durch Durchflußzytometrie detektierten Infektionsraten waren nicht so reproduzierbar wie die bei Infektionen mit nativen *L. monocytogenes* Stämmen. Die folgenden Tabellen fassen die Ergebnisse nach 1 h und 20 h Infektion am Beispiel von Tib-73 Hepatozyten (Tabelle C.10.) und P-388 Makrophagen (Tabelle C.11.) mit den Stämmen *L. monocytogenes*^{psod-GFP} sv 4a, *L. monocytogenes*^{psod-GFP} sv 4b, *L. monocytogenes*^{psod-GFP} EGD sv 1/2a und *L. monocytogenes*^{psod-GFP} Aachen sv 1/2a zusammen. Der *L. monocytogenes* Stamm der Serovariante 4a (Entwicklungslinie I) zeigte nach 1 und 20 Stunden Infektion niedrigere Infektionsraten als die Stämme des Serotyps 4b (Entwicklungslinie II) und des Serotyps sv 1/2a (Entwicklungslinie III). Auffallend war, daß der Stamm Aachen des Serotyps 1/2a (Entwicklungslinie III) sich durch extrem niedrige Infektionsraten deutlich unterschiedlicher verhielt als bei den Infektionsstudien mit nativen *L. monocytogenes* Stämmen. Dies soll im Diskussionsteil weiter behandelt werden.

Tabelle C.10.: Infektionsstudien an Tib-73 Hepatozyten mit *psod*-GFP-markierten *L. monocytogenes*-Stämmen und Auswertung an einem Durchflußzytometer. Lmo = *L. monocytogenes*

Tib73 1 h	Kanal 1 [%]	Kanal 2 [%]	Kanal 3 [%]	Kanal 4 [%]
<i>Lmo 4a-sod</i>	4,3	9,7	65,6	20,5
<i>Lmo-4b-sod</i>	7,6	7,9	70,8	13,7
<i>Lmo-Aachen-1/2a-sod</i>	1,6	5,5	72,9	20,4
<i>Lmo-EGD-1/2a-sod</i>	6,3	4,4	76,5	12,8

Tib73 20 h	Kanal 1 [%]	Kanal 2 [%]	Kanal 3 [%]	Kanal 4 [%]
<i>Lmo 4a-sod</i>	4,9	2,1	80,2	12,8
<i>Lmo-4b-sod</i>	7,0	2,0	65,5	25,4
<i>Lmo-Aachen-1/2a-sod</i>	1,3	0,2	71,1	26,8
<i>Lmo-EGD-1/2a-sod</i>	7,3	4,7	53,2	34,8

Tabelle C.10.: Infektionsstudien an P-388 Makrophagen mit *psod*-gfp markierten *L. monocytogenes* Stämmen und Auswertung an einem Durchflußzytometer. Lmo = *L. monocytogenes*

P-388 1 h	Kanal 1 [%]	Kanal 2 [%]	Kanal 3 [%]	Kanal 4 [%]
<i>Lmo 4a-sod</i>	1,0	0,4	75,9	22,7
<i>Lmo-4b-sod</i>	4,7	0,7	78,3	18,3
<i>Lmo-Aachen-1/2a-sod</i>	0,9	0,3	73,4	25,4
<i>Lmo-EGD-1/2a-sod</i>	10,9	2,3	71,9	14,9

P-388 20 h	Kanal 1 [%]	Kanal 2 [%]	Kanal 3 [%]	Kanal 4 [%]
<i>Lmo 4a-sod</i>	10,6	3,4	59	26,9
<i>Lmo-4b-sod</i>	12,5	2,8	58,9	25,9
<i>Lmo-Aachen-1/2a-sod</i>	1,2	0,7	60,0	38,2
<i>Lmo-EGD-1/2a-sod</i>	11,1	55,9	10,2	22,8

C.5.4.: Adhärenztests mit GFP-markierten *L. monocytogenes* Stämmen

Da das p60 Protein am Anheftungsprozeß von *L. monocytogenes* an die Wirtszelle beteiligt ist und durch umfassende vergleichende Analyse der *iap*-Gen Sequenzdaten *L. monocytogenes* Stämme mit bekannt niedrigem Virulenzvermögen in andere Entwicklungslinien gruppierten als Stämme mit hoher Virulenzvermögen wurden Untersuchungen zur Adhärenz mit den im vorangegangenen Kapitel eingesetzten GFP-markierten *L. monocytogenes* Stämmen durchgeführt. Stämme eingesetzt. Die Adhäsionstests wurden wie in [B.2.9.] durchgeführt

und am Durchflußzytometer vermessen. Mit der hier verwendeten Methode konnten jedoch keine signifikanten Unterschiede im Adhärenzverhalten unter den verwendeten *L. monocytogenes* Stämmen detektiert werden. Die Gründe hierfür werden kurz in C.5.5. besprochen, sollen aber näher im Diskussionsteil erörtert werden.

C.5.5.: Infektion von Zelllinien mit GFP-markierten *L. monocytogenes* Stämmen und anschließender mikroskopischer Auswertung

Die Infektionen von verschiedenen Zelllinien wurden wie in [B.2.10] beschrieben durchgeführt und unter dem Mikroskop [B.18.1.] ausgewertet. Dabei wurden die Zellen noch zusätzlich mit den Fluoreszenzfarbstoffen Propidiumiodid und Hoechst-33342 angefärbt [B.2.1.]. Durch die Kombination dieser beiden Fluoreszenzfarbstoffe und des GFP können Infektionen „online“ und mit lebenden Zellen verfolgt werden. Propidiumiodid kann nur nicht intakte Zellmembranen passieren. Dieser Farbstoff eignet sich somit zur Unterscheidung zwischen toten und lebenden Zellen. In ähnlicher Weise wurde der Farbstoff wie bei C.5.3. beschrieben zur durchflußzytometrischen Auswertung der Infektionsstudien verwendet. Der Fluoreszenzfarbstoff Höchst-33342 färbt eukaryotische Zellkerne an. Da die am Mikroskop angeschlossene CCD-Kamera nur die Fluoreszenzsignale in Grauwerten detektieren kann, wurden den Signalen des Farbstoff Propidiumiodid die Farbe rot, den Signalen von Höchst 33342 die Farbe blau und den vom stammenden GFP-Signalen die Farbe grün zugeordnet.

Abbildungen C.36. E und F zeigen P-388 Makrophagen nach 1 h Infektion mit dem Stamm *L. monocytogenes*^{pSOD-GFP} sv 4b E zeigt das Phasenkontrastbild und die Überlagerung der Fluoreszenzsignale von Propidiumiodid und dem GFP, F zeigt das Phasenkontrastbild und die Überlagerung der Fluoreszenzsignale von Höchst 33342 und dem GFP.

Bei der mikroskopische Auswertung konnten ungewöhnliche Effekte beobachtet werden. So schwammen bei Infektion mit dem Stamm *L. monocytogenes*^{pSOD-GFP} Stamm Aachen sv 1/2a oft abgelöste Zellen in der Nährlösung, die massiv mit Listerien infiziert waren und starke grüne Fluoreszenz zeigten. Das könnte die stark abfallenden Werte dieses Stammes bei durchflußzytometrischen Analysen erklären, da diese Zellen natürlich abgewaschen werden und nicht mehr Vermessen werden. Dies soll aber weiter im Diskussionsteil behandelt werden.

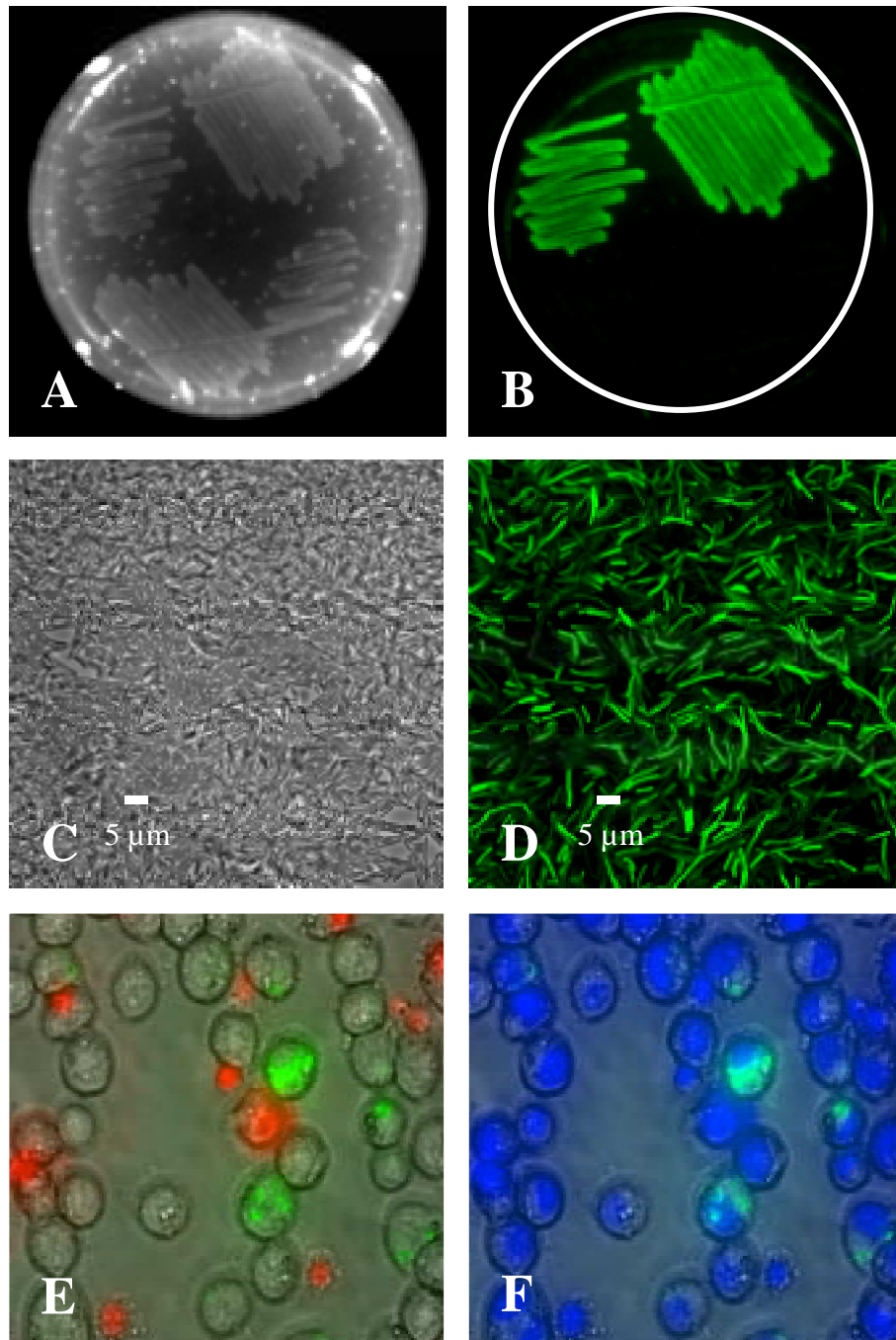


Abbildung C.36.: **A, B** = Ausstrich der beiden Stämme *L. monocytogenes*^{pSOD-GFP} sv 4b SLCC4013 (jeweils oben) und *L. monocytogenes*^{pactA-GFP} sv 4b SLCC4013 (jeweils unten) auf BHI^{tet} 7,5 Platten. **C, D** = Phasenkontrastbild und Epifluoreszenzbild (D) des gleichen Bildausschnittes wie bei C des Stammes *L. monocytogenes*^{pSOD-GFP} sv 4b. SLCC4013 **E** und **F** = Infektion von Makrophagen (P-388) mit dem Stamm *L. monocytogenes*^{pSOD-GFP} sv 4b SLCC4013 nach 1 h Infektion. **E** = Überlagerung von Phasenkontrastbild und der Fluoreszenzsignale von Propidiumiodid und GFP;. **F** Überlagerung von Phasenkontrastbild und Fluoreszenzsignalen von Höchst-33342 und GFP.

D: Diskussion

D.1.: Detektion von Salmonellen, Listerien und *Campylobacter* mit rRNS-gerichteten Gensonden

D.1.1.: *In situ*-Detektion von Salmonellen

D.1.1.1.: Spezifität der Sonde Salm-63

Eine für *Salmonella enterica* spezifische gegen die 16S-rRNS gerichtete Gensonde konnte aufgrund der sehr hohen Sequenzähnlichkeit von Salmonellen zu anderen Vertretern der Familie *Enterobacteriaceae* nicht gefunden werden. So zeigen in Bezug auf die 16S-rRNS *Salmonella rissen* zu *Citrobacter freundii* 97 % bzw. *Salmonella bareilly* zu *Escherichia coli* 99 % Sequenzähnlichkeit. Zur *in situ* Detektion von *Salmonella enterica* Unterarten wurde die gegen die 23S-rRNS gerichtete Oligonukleotidsonde Salm-63 [siehe C.2.1.1.] verwendet. Die Spezifität der Sonde Salm-63 wurde durch Hybridisierungen von Ziel- und Nicht-Zielorganismen ermittelt. Die ermittelten Fluoreszenzintensitätswerte bei Hybridisierungen der Nicht-Zielorganismen waren mit den Autofluoreszenzwerten vergleichbar. Sogar bei 0 % Formamid im Hybridisierungspuffer konnten die verwendeten Nicht-Zielorganismen *Citrobacter freundii*, *Escherichia coli* und *Enterobacter cloacae* gegenüber den Zielorganismen diskriminiert werden. Dies ist auf die zentrale Basenfehlstelle der Nicht-Zielorganismen in ihrer Bindungsstelle auf der 23S-rRNS zur Sonde Salm-63 zurückzuführen. Diese starke Basenfehlpaarung führt bei Hybridisierung der Nicht-Zielorganismen mit der Sonde Salm-63 zur Ausbildung von zwei Schmelzdomänen, was offensichtlich ausreicht, die Nicht-Zielorganismen gegenüber den Zielorganismen zu diskriminieren. Somit ist es nicht erforderlich, eine Kompetitorsonde für den *in situ* Nachweis von *Salmonella enterica* zur Unterdrückung der Sondenbindung an Nicht-Zielorganismen, einzusetzen.

Dagegen werden die verwendeten Referenzorganismen *Salmonella typhimurium* LT2 TUMSal8, *Salmonella choleraesuis* ssp. *choleraesuis* DSM10062 (vormals *Salmonella senftenberg*) und alle sieben *Salmonella enterica* Unterarten, I *enterica*, II *salamae*, IIIa *arizonae*, IIIb *diarizonae*, IV *houtenae*, V *bongori*, VI *indica* (Anonymous, 1985 und 1987; Le Minor und Popoff, 1987) von der Sonde Salm-63 erfaßt. Ebenfalls konnten die in der vorliegenden Arbeit und in einer im Arbeitskreis angefertigten Diplomarbeit (Adamczyk,

2000) aus Stammsammlungen bezogenen und teilweise selbst isolierten *Salmonella enterica* Serovarianten (*Typhimurium* DT 104H, *Thompson*, *Isangi*, *Infantis*, *Livingstone* und *Rissen*) [siehe C.1.2.] stets mit starken fluoreszierenden Signalen detektiert werden. Die Spezifität der Sonde Salm-63 sollte jedoch wegen der zum jetzigen Zeitpunkt geringen Anzahl an verfügbaren 23S-rRNS Sequenzen laufend überprüft werden.

Bei der Überprüfung der 23S-rRNS Sequenzen im Datensatz zeigte der Organismus *Plesiomonas shigelloides* in seiner Bindungsregion auf der 23S-rRNS keine Basenfehlpaarungen zur Sonde Salm-63. Das bedeutet, daß nicht nur alle *Salmonella enterica* Subspezies sondern auch *Plesiomonas shigelloides* von der Sonde detektiert werden. Morphologisch lassen sich die beiden Keime nicht unterscheiden. Jedoch stellt dies letztlich kein großes Problem dar, da dieser Organismus zum einen ebenfalls pathogen für Menschen ist und somit auch dessen Abwesenheit bei hygienischen Kontrollen gewünscht ist. Zum anderen tritt dieser Organismus im europäischen Raum kaum auf. Hauptverbreitungsgebiet von *Plesiomonas shigelloides* ist der asiatische Raum. Über die Virulenz von *Plesiomonas shigelloides* ist relativ wenig bekannt. Sporadisch findet man Fälle in tropischen Regionen Südostasiens an Gastroenteritiden, die auf eine Infektion mit *Plesiomonas shigelloides* zurückzuführen sind. (Medema und Schets, 1993; Schubert und Holz-Bremer, 1999; Jonnson *et al.*, 1997; Santos *et al.*, 1999). Sehr selten treten Infektionen mit *Plesiomonas shigelloides* in den gemäßigten Breiten und dort nur nach Verzehr von rohem, kontaminierten Fisch (Medema und Schets, 1993; Jonsson *et al.*, 1997) auf. Neben Gastroenteritiden treten sehr selten durch *Plesiomonas shigelloides* hervorgerufene Erkrankungen der Haut bei äußeren Verletzungen auf (Jonnson *et al.*, 1997).

D.1.1.2.: *In situ* Detektion von Salmonellen in Bioabfallvergärungsanlagen

Die anaerobe Vergärung von organischem Müll, Speiseresten etc. in Bioabfallvergärungsanlagen ist eine moderne Methode, dem Problem der zunehmenden Müllmengen entgegenzutreten. Während des Vergärungsprozesses wird Biogas gewonnen, daß in Blockkraftwerken zu Strom umgewandelt wird. Der Gärrückstand wird meist aerob kompostiert und das Endprodukt als Gartenerde oder Düngemittel in privaten Haushalten oder in der Landwirtschaft verwendet. Jedoch treten wegen der hohen Keimbelastung oft hygienische Probleme bei der aeroben Nachrotte der jeweiligen Gärrückstände auf. So kommen z.B. Keimzahlen von bis zu 10^6 Salmonellen/ml vor. Deswegen muß der Behandlungsprozeß von organischen Abfällen in Bioabfallvergärungsanlagen so gesteuert

werden, daß seuchenhygienisch unbedenkliche Produkte entstehen. Daher schreibt der Gesetzgeber den Bertreibern der jeweiligen Anlagen hygienische Richtlinien für die Behandlung und Weiterverarbeitung von Bioabfall vor (LAGA M10; Müllhandbuch 6856; DIN 38414; DEV S13) vor. So darf in 25 g Endprodukt aus einer Bioabfallvergärungsanlage keine *Salmonella enterica* Zelle mehr nachweisbar sein.

Diese Kontrollen stützen sich in der Regel auf klassische mikrobiologische Anreicherungs- und anschließende biochemische Differenzierungsverfahren. Die Anreicherung auf nicht-selektiven und die spätere selektive Vereinzelnung der Isolate [siehe B.1.2.], anschließende biochemische Differenzierung nach physiologischen Merkmalen und die abschließende Serotypisierung der „*Salmonella*-verdächtigen“ Isolate in Spezial- und Referenzlabors nimmt ungefähr 2-3 Wochen in Anspruch. Die Notwendigkeit der Entwicklung und Etablierung schnellerer und gleichzeitig zuverlässiger Methoden zur Detektion von Salmonellen ist offensichtlich.

Die Methode der Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH) hat sich in den letzten Jahren zu einem höchst effektiven Werkzeug zur *in situ* Detektion von Mikroorganismen entwickelt (Amann *et al.*, 1993, 1996; Wagner *et al.*, 1994, 1995). Diese Methode zeigt ihre Leistungsfähigkeit in der Detektion auch bisher nicht kultivierbarer Mikroorganismen (Schleifer *et al.*, 1998) und bakterieller Endocytobionten von Eukaryoten (Fritsche *et al.*, 1999; Horn *et al.*, 1999). Durch die FISH-Methode in Kombination mit konfokaler Lasercanning-Mikroskopie lassen sich ebenfalls Aussagen über die räumliche Verteilung und Abundanz bestimmter Organismengruppen machen (Juretschko *et al.*, 1998; Kühn *et al.*, 1998). Die Nachweisgrenze dieser Methode liegt bei etwa 10^4 Mikroorganismen pro ml. Die relativ hohe Zellzahl, die für die *in situ* Detektion der Mikroorganismen benötigt wird, kann z.B. durch Aufkonzentrierung wie Filtration oder Anreicherungstechniken erreicht werden. Da Umweltproben oft einen hohen Anteil an nicht filtrierbarem Material aufweisen, sind hier Anreicherungstechniken den physikalischen Konzentrationsverfahren vorzuziehen. Zudem beweist die Anreicherungstechnik, daß im Ausgangsmaterial vermehrungsfähige Mikroorganismen vorhanden gewesen sein müssen.

Durch Kombination von nicht-selektiver Voranreicherung und der FISH-Technik konnte in der vorliegenden Arbeit eine Kontamination mit einer angeimpften *Salmonella*-Zelle in 25 g Gartenerde nach 18 h nachgewiesen werden [siehe C.2.2.2.]. Dies stellt natürlich einen „*theoretischen Optimalwert*“ dar, da z.B. subletal geschädigte Salmonellen längere Zeit benötigen, um die gewünschte Mindestzellzahl zu erreichen, als frische Kulturen. Jedoch zeigte dieser Versuch die prinzipielle Tauglichkeit und die hohe Zeitersparnis bei der

Kombination von nicht selektiver Voranreicherung und fluoreszierender *in situ* Hybridisierung auf.

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Kompostverwerter beprobt. In den jeweiligen Originalproben konnten keine Salmonellen direkt und ohne Voranreicherung nachgewiesen werden. Entweder war hier die Ausgangszellzahl an Salmonellen zu niedrig oder die Salmonellen befanden sich in einer Hungerphase in der nicht ausreichend Ribosomen und somit rRNS-Kopien vorhanden waren, die für einen erfolgreichen Nachweis durch Fluoreszenzfarbstoff markierte Oligonukleotidsonden nötig sind. Jedoch war es möglich, Salmonellen nach Voranreicherung in allen Stufen der Prozeßführung mit der FISH-Technik nachzuweisen. Durch diesen Anreicherungsschritt erreichen höchstwahrscheinlich Zellen, die sich im „*viable but not culturable*“-Zustand befinden (Byrd *et al.*, 1991; Turpin *et al.*, 1993; Munro *et al.* 1995; Kell *et al.*, 1998; Barer *et al.*, 1999) wieder ihre volle Stoffwechselaktivität und vermehren sich wieder, so daß genügend Zielmoleküle für die Detektion vorhanden waren. Das Vorhandensein von Salmonellen wurde auch durch Isolation mit klassisch-mikrobiologischen Verfahren bestätigt. Teilweise wurden Salmonellen aus Bereichen isoliert, die sich betriebstechnisch hinter der Hygienisierungsstufe befanden. In diesem Abschnitt der Prozeßführung werden Bioabfall, Speisereste usw. mit 70°C heißem Wasser vermischt und so „hygienisiert“, bevor sie dem Gärreaktor zugeführt werden. Die Ergebnisse zeigen aber, daß offensichtlich die Hygienisierungsmaßnahmen nicht verlässlich greifen. Dies kann beispielsweise an verschiedenen Parametern während der Durchmischung mit heißem Prozeßwasser liegen. Offensichtlich existieren Bereiche, in denen die geforderte Hygienisierungstemperatur nicht erreicht wird. Somit werden Salmonellen und vielleicht sogar andere pathogene Keime wie andere *Enterobacteriaceae* (z.B. *Yersinia*) nicht abgetötet, sondern nur so weit geschädigt, daß sie in Anreicherungsmedien wieder anwachsen können.

D.1.1.3.: Vergleich der FISH-Technik mit anderen Detektionsverfahren für Salmonellen.

Neben den erwähnten klassischen Kultivierungsverfahren zum Nachweis von Salmonellen werden hauptsächlich immunologische, kombiniert immunologisch-biochemische und PCR-gestützte Nachweissysteme für Salmonellen verwendet. Die Kultivierungstechniken zählen in der heutigen *Salmonella* Diagnostik zu den meist verwendeten Nachweisverfahren. Seit ca. 80 Jahren werden dafür diagnostische Medien entwickelt, die laufend verändert, modifiziert und verbessert werden (Kauffmann, 1930, 1935; Rappaport *et al.*, 1956). Im Jahr 1984 beschrieb

Fricker ein optimiertes Kultivierungsverfahren für Salmonellen, das, leicht abgewandelt, heute standardmäßig zur Isolierung von Salmonellen angewendet wird [siehe C.1.2.]. Diese kultivierungsabhängigen Nachweisverfahren haben den großen Vorteil, nur lebensfähige Keime nachzuweisen. Dem gegenüber stehen z.B. PCR-gestützte Nachweisverfahren für Salmonellen (Soumet *et al.*, 1999). Hier können nicht nur DNS-Abschnitte von lebenden, sondern auch von toten Organismen, ja sogar extrazellulär vorliegende DNS zu Amplifikationsprodukten richtiger Größe führen. Vor allem in komplexen Umweltproben können inhibierende Stoffe vorhanden sein, die eine erfolgreiche Amplifikation der gewünschten DNS-Abschnitte unterbinden (Widjoatmodjo *et al.*, 1992; Fluit *et al.*, 1993; Bäumlner *et al.*, 1997). Ein weiterer Vorteil der klassischen Kultivierungstechniken ist das geringe Inokulum, das zum positiven Nachweis nötig ist. Theoretisch würde das Vorhandensein einer Zelle in der Probe zu einem positiven Nachweis führen. Diese hohe Sensitivität zur Detektion lebender Keime ist von anderen Nachweismethoden unerreicht. Auch subletal geschädigte Zellen erhalten durch die relativ langen Inkubationszeiten die Möglichkeit zur Rekonvaleszenz. Darum beinhalten auch moderne molekularbiologische Nachweisverfahren oft einen selektiven oder nicht-selektiven Voranreicherungsschritt. Die häufigsten eingesetzten Medien in der *Salmonella*-Diagnostik sind der BPLS-(Brillantgrün-Phenolrot-Lactose-Saccharose) und XLD Xylose-Lysin-Deoxycholat)-Nährboden [siehe B.1.3.1.]. Beim BPLS-Nährboden werden Salmonellen als rote Kolonien auf rotem Hintergrund identifiziert, da sie Saccharose und Lactose nicht verwerten und somit das Medium nicht ansäuern, aber hohe Konzentrationen an Brillantgrün tolerieren. *Proteus* ssp. bzw. *Citrobacter* ssp. können jedoch zu falsch positiven Ergebnissen führen. Im Gegensatz dazu beruht die Identifizierung von Salmonellen durch XLD-Nährböden auf der Fähigkeit von Salmonellen, bis zu 1g/l Deoxycholat zu tolerieren. Die Xylose-Verwertung, Lysin-Decarboxylierung sowie die Hydrogensulfid-Bildung aus Thiosulfat, und die resultierende Ausfällung von Eisensulfid führen zur Schwarzfärbung der *Salmonella*-Kolonien. Jedoch zeigen *Pseudomonas* ssp., *Proteus* ssp., sowie *Citrobacter* ssp. oft falsch positive Resultate mit diesem Nährboden. Ein entscheidender Nachteil dieser beiden Nährböden liegt daran, daß *Salmonella typhi* nicht detektiert wird. Dieser hochpathogene Organismus ist H₂S negativ, führt also auf XLD-Agar nicht zur Schwarzfärbung der Kolonie. Auf BPLS-Agar zeigt *Salmonella typhi* ebenfalls keine positive Reaktion. Immunologische Verfahren, die auf die Detektion der O-, H-, und Vi Antigene von Salmonellen durch Antikörper beruhen wie ELISA oder „sandwich“-ELISA Systeme, zeichnen sich vor allem durch ihre leichte Automatisierbarkeit und die Durchführung der Reaktionen in Mikrotiterplatten aus. Jedoch

liegt bei dieser immunologischen Methode das Detektionslimit bei 10^5 bis 10^6 Zellen/ml (Ng *et al.*, 1996; Hanai *et al.*, 1997; Peplow *et al.*, 1999). Dies setzt entweder sehr hohe Zellzahlen in der Probe oder abermals einen primären Anreicherungsschritt voraus. Aufgrund der über 2.500 *Salmonella* Serovarianten können nur Spezial- und Referenzlabors eine präzise Salmonellen Diagnostik durchführen. Diese aufwendige Diagnostik ist jedoch nur bei klinischen oder epidemiologische Untersuchungen gerechtfertigt, während im Rahmen der vorliegenden Arbeit nur die Ab- bzw. Anwesenheit von Salmonellen, unabhängig von ihrem Serotyp, nachgewiesen werden sollte.

Die oben angesprochenen Nachteile von PCR-gestützten Detektionsverfahren und von immunologischen sowie kultivierungsabhängigen Nachweisverfahren für Salmonellen können durch fluoreszierende *in situ* Hybridisierung mit der Sonde Salm-63 weitgehend unterbunden werden, so detektiert z.B. die Sonde auch *Salmonella typhi*. Eine Kombination aus nicht-selektiver Primäranreicherung und der FISH-Technik scheint ein optimales Verfahren für die in der vorliegenden Arbeit gegebenen Problemstellung zu sein. Durch die Anreicherung kann theoretisch ein Inokulum von einer Zelle, selbst wenn diese subletal geschädigt war, wieder zur Vermehrung angeregt werden und durch die Sondentechnik auch jene Salmonellen erfaßt werden, die durch die gebräuchlichen Medien nicht detektiert werden können. Ein wirtschaftlich bedeutender Vorteil ist die Zeitersparnis, die man bei der Detektion von Mikroorganismen mit FISH gegenüber den Isolierungs- und anderen molekularbiologischen Nachweistechiken hat. Sollen Proben nur auf die Anwesenheit von Salmonellen untersucht werden, ist die FISH-Technik in Kombination mit einer Primäranreicherung am sinnvollsten. Sind genauere Subtypisierungen verlangt, besitzen die oben erwähnten immunologischen Techniken und auf PCR basierende Nachweisverfahren einen Vorteil gegenüber der Gensondentechnik.

D.1.2.: *In situ* Detektion von Listerien

D.1.2.1.: Spezifität der Sonden Lis-1255 und Lis-637

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei gegen die 16S-rRNS gerichtete Gensonden (Lis-1255 und Lis-637) konstruiert, die es erlauben, die Gattung *Listeria* unter Einsatz der Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung spezifisch zu detektieren. Die Sonde Lis-1255 erfaßt, nach Datenbankrecherche, neben den 6 bisher bekannten Arten der Gattung *Listeria* noch die beiden Nicht-Zielorganismen *Brochotrix thermosphacta* und *Brochotrix campestris*. Die

Gattung *Brochotrix* beinhaltet bis heute nur die beiden oben genannten Arten (Sneath und Jones, 1976). Die Gattungen *Listeria* und *Brochotrix* sind, basierend auf vergleichenden Untersuchungen der 16S-rRNS phylogenetisch sehr eng verwandt (Ludwig *et al.*, 1984) und werden den Gram-positiven Organismen mit niedrigem G+C Gehalt zugeordnet (Stackebrandt und Woese, 1981). Auch *Brochotrix* läßt sich, ähnlich wie *Listeria*, aus Erde, Gras, Heu, Fäces, aber auch aus verschiedenen Lebensmitteln wie Milch, Sahne oder Hüttenkäse isolieren (Gardner, 1981; Talon *et al.*, 1988). Aus klinischen Proben wurde *Brochotrix* allerdings bisher noch nicht isoliert. Eine Doppel-Hybridisierung mit beiden Sonden (Lis-1255 und Lis-637) erlaubt es die Listerien sicher zu detektieren. Von der Sonde Lis-1255 werden neben den Listerien beide Arten von *Brochotrix* detektiert, während von der Sonde Lis-637 alle Listerien mit Ausnahme von *L. grayi* erfaßt werden. *Listeria grayi* ist nicht pathogen für Mensch und Tier und wurde nur sehr selten aus Umwelt- oder Lebensmittelproben isoliert. Die beiden Arten von *Brochotrix* besitzen keine zur Sonde Lis-637 komplementäre Bindungsstelle auf ihrer ribosomalen-RNS. Die beiden gegen die Sonde Lis-637 getesteten Nicht-Zielorganismen *Enterococcus gallinarum* und *Enterococcus casseliflavus* zeigten unter stringenten Hybridisierungsbedingungen keine detektierbaren Signale. Die sehr schwachen Signale, die bei *Shewanella alga* nach Hybridisierung mit der Sonde Lis-1255 zu detektieren waren, sind auf die nicht zentral gelegene Basenfehlpaarung der Bindungsregion zu Sonde Lis-1255 zurückzuführen. Jedoch weisen die Vertreter der Gattung *Shewanella* ein anderes natürliches Verbreitungsgebiet als Listerien auf. *Shewanella* Arten sind Bewohner aquatischer und mariner Habitate.

D.1.2.2.: Detektion von Listerien *in situ* in Umweltproben

Die klassische mikrobiologische Isolierung von Listerien aus Umweltproben stützt sich auf den Einsatz selektiver Medien. Aufgrund der hohen Nährstoffansprüche der Listerien ist es nötig, eine vierstufige, selektive Anreicherung durchzuführen, um den Listerien anderen Mikroorganismen gegenüber einen Wachstumsvorteil zu ermöglichen und die Begleitflora zu unterdrücken. Allein diese 4 Medien enthalten 7 verschiedene Antibiotika (siehe B.1.3.1. oder B.1.3.6.). Diese Selektivmedien wurden bereits soweit perfektioniert, daß nach einer negativen Reaktion des „Fraser-Anreicherungsmediums“ mit Selektivsupplement (siehe B.1.3.1.) das Vorhandensein von Listerien ausgeschlossen werden kann (Curtis *et al.*, 1989; Fraser *et al.*, 1988). Dies bedeutet zwar eine gewisse Zeitersparnis, da man sich die Vereinzelung der Isolate auf „OXFORD“ und „PALCAM“-Nährböden erspart, aber das

Verfahren nimmt dennoch bis zu 8 Tage in Anspruch, um die Abwesenheit von Listerien garantieren zu können. Werden dagegen „*Listeria*-verdächtige“ Isolate erhalten, so kann sich aufgrund der nachfolgenden biochemischen Differenzierung und eventuellen Serotypisierung die *Listeria* Diagnostik auf bis zu 3 Wochen ausdehnen.

In der vorliegenden Arbeit konnten Listerien unter Verwendung fluoreszenzmarkierter Gensonden *in situ* in Rohmilch bereits nach zwei Tagen Selektivanreicherung nachgewiesen werden. Ein direkter Nachweis in fixierter Rohmilch gelang nicht. Dies lag wahrscheinlich an der zu geringen Zellzahl, oder an dem Vorhandensein subletal geschädigten Organismen, wie es in C.1.1.2. bereits für den *in situ* Nachweis von Salmonellen diskutiert wurde. Jedoch war eine Anreicherung über zwei Tage offensichtlich ausreichend die Keimzahl an Listerien derart zu erhöhen, daß sie *in situ* detektiert werden konnten. Die Zellen scheinen in dieser Zeit genug Ribosomen und damit Zielmoleküle an ribosomaler RNS für die Detektion *in situ* ausgebildet zu haben. Die Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung Gram-positiver Organismen bedarf oft enzymatischer Vorbehandlungsschritte, um die Zellhülle permeabel für Gensonden zu machen (Roller *et al.*, 1994; Schmid, 1997; Wagner *et al.*, 1998). Listerien allerdings bedürfen in der logarithmischen Wachstumsphase keiner enzymatischen Vorbehandlungsschritte, um ihre Zellwand für den Durchtritt der Gensonden zu permeabilisieren (Schmid, 1997). Bei der Rohmilchanreicherung wurde vor der Hybridisierung nicht enzymatisch vorbehandelt, so daß die Zellen in der Originalprobe nicht stark geschädigt gewesen sein dürften.

Die FISH-Technik kombiniert mit der klassischen Anreicherung bietet ähnlich wie in D.1.1.3. diskutiert, erhebliche Zeitersparnis. Eine Gensonde für den spezifischen Nachweis von *L. monocytogenes* konnte allerdings aufgrund der sehr hohen Sequenzähnlichkeit der Listerien auf der 16S- und 23S-rRNS nicht konstruiert werden. Jedoch wird in der Routineuntersuchung bereits der Nachweis von Listerien als Hinweis auf eine mögliche Kontamination mit *L. monocytogenes* gewertet (Wagner und Lehner, persönliche Mitteilung). Mit den in der vorliegenden Arbeit entwickelten Gensonden kann ein schneller und zuverlässiger Nachweis von Listerien in einer Probe geführt werden. Negative Proben müssen daraufhin nicht mehr weiter unter hohem Zeitaufwand bearbeitet werden.

D.1.2.2.: Vergleich der FISH-Technik mit anderen Detektionsverfahren zum Nachweis für Listerien

Neben den klassischen mikrobiologischen Techniken zum Nachweis von Listerien werden auch in zunehmenden Maße molekularbiologische Methoden entwickelt, um Listerien und dabei vor allem *L. monocytogenes* und *L. ivanovii* als pathogene Vertreter der Gattung zu detektieren. Dies liegt unter anderem auch daran, daß sich zahlreiche Arbeitsgruppen mit *L. monocytogenes* nicht nur als Lebensmittelkontaminante, sondern vor allem auch als genetischen Modellorganismus beschäftigen, um die Lebensweise fakultativ intrazellulärer Mikroorganismen besser studieren und verstehen zu können (Goebel, 1993; Cossart und Kocks 1994; Cossart *et al.*, 1989; Vasquez-Boland *et al.*, 1992). So versucht ein Verbund an spanischen, französischen und deutschen Arbeitsgruppen derzeit, das Genom von *L. monocytogenes* und *L. innocua* zu entschlüsseln.

Eine bereits traditionelle Typisierungsmethode für Listerien stellt die Serotypisierung dar (Seeliger, 1979). Daneben erweist sich auch die Phagentypisierung (Rocourt, *et al.* 1985) als hochsensitive Methode zur Differenzierung verschiedener Stämme von *L. monocytogenes*. Sie hat aber den Nachteil, daß nicht alle *Listeria* Stämme typisierbar sind. Zudem kann die routinemäßige Subtypisierung von Listerien mit Phagen nur in speziell eingerichteten Laboratorien durchgeführt werden (Rocourt *et al.*, 1985; Espaze *et al.*, 1989).

Daneben werden aber auch zunehmend Techniken entwickelt und eingesetzt, die es erlauben, Listerien auf genotypischer Ebene zu differenzieren. Diese Methoden zeigen oft eine höhere Reproduzierbarkeit als phänotypische Untersuchungen, da sie nicht von Umwelteinflüssen wie z.B. Wachstumsbedingungen abhängig oder beeinflußt werden. Dazu zählen Methoden wie die Hydrolyse von DNS mittels Restriktionsendonukleasen und anschließender elektrophoretischer Auftrennung der DNS Fragmente (Ericsson *et al.*, 1996), Plasmid-Profiltypisierung, PFGE-„*fingerprint*“-Analysen (Nakama *et al.*, 1998) oder PCR-gestützte Verfahren (Bubert *et al.*, 1999; Klein *et al.*, 1997). Die Anwendung der meisten dieser Methoden setzt allerdings eine isolierte Reinkultur als Probenmaterial voraus. Aus lebensmittelhygienischer Sicht erweist sich die FISH-Technik als besonders gut geeignet, das Vorhandensein von Listerien zu prüfen. Lassen sich nach Anreicherung keine Listerien nachweisen, kann bereits sehr rasch eine Kontamination mit Listerien ausgeschlossen werden. Dies würde einen erheblichen Zeitvorteil gegenüber den oben besprochenen Techniken, sowie einen Schutz der Konsumenten und nicht zuletzt finanzielle Einsparungen bei den Lebensmittelherstellern bedeuten. Wenn z.B. Listerien in Käse oder anderen Lebensmitteln

detektiert werden, müssen oft ganze Chargen aus dem Handel entfernt werden. Für epidemiologische Untersuchungen zeigen sich jedoch die etablierten Verfahren wie Serotypisierung und PFGE-„fingerprint“-Analysen am geeignetsten.

D.1.3.: *In situ* Detektion von *Campylobacter*

D.1.2.1.: Spezifität der Sonden Camp-635 und Cajeco-1427

Zur Detektion von *Campylobacter in situ* wurden zwei Sonden verwendet. Ziel war es eine Region auf der ribosomalen RNS zu finden, die es erlaubt, die gesamte Gattung *Campylobacter* zu detektieren (Camp-653, gegen die 16S-rRNS gerichtet) sowie eine Bindungsregion zu finden, die es erlaubte, die thermotoleranten Vertreter der Gattung *Campylobacter* zu detektieren (Cajeco-1427, gegen die 23S-rRNS gerichtet) und diese gegenüber den nicht-thermotoleranten *Campylobacter* Arten zu diskriminieren. Infektionen, hervorgerufen durch thermotolerante *Campylobacter* Arten, machen ca. 95 % aller *Campylobacteriosen* aus. Nicht völlig durchgegarne Fleischwaren, die mit diesen thermotoleranten *Campylobacter* Arten kontaminiert sind, sind oft der Ausgang einer Infektion. Die Sonde Camp-653 zeigte keine Basenfehlpaarung zu dem im Datensatz der ribosomalen Datenbank der TUM (ARB, Ludwig) befindlichen Sequenzen von Vertretern der Gattung *Campylobacter*. Die Spezifität der Sonde wurde wiederum durch Hybridisierung von Ziel- und Nicht-Zielorganismen mit aufsteigenden Formamidkonzentrationen im Hybridisierungspuffer ermittelt. Die klinischen Isolate von *Helicobacter pylori* Stämme zeigten unter stringenten Bedingungen sehr schwache bis keine Fluoreszenzsignale während die eingesetzten *Campylobacter* Referenzstämme stets starke fluoreszierende Signale ergaben. Die Oligonukleotidsonde Cajeco-1427 konnte alle im 23S-rRNS Datensatz (ARB-Datenbank, Ludwig, TUM) vorhandenen thermotoleranten Arten von *Campylobacter* detektieren. Auch die von Alderton beschriebene Art *Campylobacter hyoilei* (1995) wird ebenfalls von der Sonde Cajeco-1427 detektiert. *Campylobacter hyoilei* wurde aber 1997 reklassifiziert und der Art *Campylobacter coli* zugeordnet (Vandamme, 1973). Somit konnten alle nicht thermotoleranten *Campylobacter* Arten mit der Sonde Cajeco-1427 von den thermotoleranten Arten diskriminiert werden.

D.1.2.2.: In situ Detektion von *Campylobacter* in Hühnerleber

Infektionen, die von Vertretern der Gattung *Campylobacter* verursacht werden, werden in den USA als hauptsächlichster Auslöser von Durchfallerkrankungen und Gastroenteritiden beim Menschen betrachtet (Blaser *et al.*, 1979, 1984). Man spricht sogar von einer weltweiten Dominanz der durch *Campylobacter* ausgelösten Enteritiden (Skirrow und Blaser, 1992). Am häufigsten werden diese Campylobakteriosen von den beiden Arten *Campylobacter jejuni* und *Campylobacter coli* ausgelöst (Skirrow und Blaser, 1992). Menschen werden vor allem durch den Verzehr von Geflügelfleisch mit *Campylobacter* infiziert (Stern, 1992; Tauxe, 1992). Der Konsum von Rohmilch kann ebenfalls zu einer Infektion mit *Campylobacter* führen (Hopkins *et al.*, 1984; Schmid *et al.*, 1987). Die Infektionen mit Vertretern der Gattung *Campylobacter* verlaufen in Geflügel symptomlos. Jedoch finden vor allem thermotolerante *Campylobacter* Arten gute Lebensbedingungen in Enten und Hühnern vor, da deren Körpertemperatur 41-42°C beträgt. Thermotolerante Vertreter der Gattung *Campylobacter* können sich in der Geflügelleber manifestieren und werden durch Ausscheidungen auf die Artgenossen übertragen. Die beengte Lebensweise von domestiziertem Geflügel hat einen sehr hohen Durchseuchungsgrad zur Folge. So sind die meisten Hühner bereits im Alter von 4 Wochen mit *Campylobacter* infiziert (Humphrey *et al.*, 1993; Kapperud *et al.*, 1993). In der vorliegenden Arbeit konnten thermotolerante Vertreter der Gattung *Campylobacter* durch die FISH-Technik direkt in homogenisierter und fixierter Hühnerleber nachgewiesen werden. Ein Anreicherungsschritt war nicht nötig. Dies spricht für eine signifikant hohe Keimbelastung der untersuchten Proben von ca. 10^4 - 10^5 *Campylobacter* pro g Leber. Sporadische Ausbrüche von Campylobakteriose treten oft nach Genuß von nicht-durchgegartem Hühnerfleischprodukten (Kapperud *et al.*, 1992; Oosterom *et al.*, 1984; Hopkins *et al.*, 1984; Harris *et al.*, 1986; Deming *et al.*, 1987) und durch nicht sachgemäße Handhabung von rohem Geflügel auf (Norkrans und Svedhem 1982; Hopkins, 1983). Die Methode der FISH-Technik eignet sich in diesem Zusammenhang dazu, z.B. stichprobenartig Hühnerfarmen zu beproben, um eventuelle Sanierungsmaßnahmen, wie die Gabe von Antibiotika einzuleiten.

D.1.2.2.: Vergleich FISH-Technik mit anderen Detektionsverfahren zum Nachweis für *Campylobacter*

Für die Detektion von *Campylobacter* Arten stehen noch keine standardisierten Methoden zur Verfügung. Dies liegt unter anderem daran, daß *Campylobacter* von einem belgischen medizinischen Mikrobiologen aus Stuhlproben erstmals 1972 isoliert wurde (Kist, 1985) und daher die Erfahrung mit dem Umgang und der Isolierung dieser Keime noch nicht ausreichend ist. Erst seit den 70er Jahren stehen Medien zur Isolierung von *Campylobacter* Arten zur Verfügung. Die Isolation und Anzucht von *Campylobacter* Arten gestaltet sich aufgrund der mikroaerophilen Lebensweise und den komplexen Nährstoffansprüchen als schwierig. So läßt sich *Campylobacter* Zellen nur auf defibrierten Schafs- oder Pferdeblut-Nährböden kultivieren. Diese komplizierten Nährböden sind natürlich auch eine ideale Grundlage für andere Organismen, die eventuell *Campylobacter* überwachsen können oder es nicht gelingen lassen, Reinkulturen zu isolieren, um durch anschließende physiologische Tests *Campylobacter* näher differenzieren zu können. Immunologische Techniken zur Detektion von *Campylobacter* wurden erst in den 80er Jahren entwickelt. So finden zwei serologische Methoden Anwendung, die hitzestabile somatische O-Antigene (Penner *et al.*, 1983) und hitzelabile Antigene (Lior *et al.*, 1982) nachweisen. Moderne molekularbiologische Methoden wie PCR-gestützte Nachweisverfahren oder genomische Analysen durch PFGE-„fingerprint“-Analysen (Chang und Taylor, 1990; Gibson *et al.*, 1997) oder AFLP-„fingerprint“-Analysen (Duim *et al.*, 1999; Kokotovic und On, 1999) erweitern nach und nach das diagnostische Repertoire der Detektion von *Campylobacter*. Die FISH-Technik zeigt auch hier ihre Vorteile der Zeitersparnis und Einfachheit der Durchführung gegenüber anderen Methoden.

D.2.: Die Evolution des „Virulenzgenclusters“ von Listerien

Die drei *Listeria* Arten *L. monocytogenes*, *L. ivanovii* und *L. seeligeri* besitzen in direkter Nachbarschaft auf dem Chromosom eine Anhäufung von Virulenzgenen, die von den lebenswichtigen Genen *ldh* (kodiert für eine Lactatdehydrogenase) und *prs* (kodiert für eine Ribosephosphat-Pyrophosphokinase) flankiert werden (siehe C.3.1.). Dieser Bereich wird bei den drei Arten als das „Virulenzgencluster“ bezeichnet (Brehm *et al.*, 1996). Während *L. monocytogenes* pathogen für Menschen und Tiere ist, zeigt *L. ivanovii* seine Pathogenität nur gegenüber Tieren. Bei *L. seeligeri* ist die Bedeutung dieses „Virulenzgenclusters“ noch

unverstanden. *Listeria seeligeri* besitzt nicht nur die Gene, die *L. monocytogenes* in seinem „Virulenzgencluster“ aufweist, sondern zusätzlich noch fünf weitere, deren Funktion zum Teil noch nicht geklärt ist. Bis heute ist nur ein einziger Fall beschrieben und dokumentiert, in dem eine Infektion mit *L. seeligeri* mit einer Meningitis bei Menschen assoziiert war (Rocourt *et al.*, 1986). Die anderen drei *Listeria* Arten, *L. innocua*, *L. welshimeri* und *L. grayi*, besitzen ebenfalls eine Anhäufung an Genen, die von den Genen *ldh* und *prs* flankiert werden, aber keine Virulenzgene sind. Diese drei Arten sind apathogen für Mensch und Tier.

In der vorliegenden Arbeit wurden von vielen Genen vergleichende Sequenzanalysen durchgeführt, um eine Aussage über die Evolution des „Virulenzgenclusters“ aller bisher bekannten *Listeria* Arten treffen zu können. Dazu zählen neben den oben erwähnten Genen *ldh* und *prs* noch die im „Virulenzgencluster“ befindlichen Gene *vclB* und *vclA*, die Gene die für die 16S- und 23S-rRNS und das *iap*-Gen, das für das p60 Protein kodiert. Durch detaillierte vergleichende phylogenetische Sequenzanalysen der verschiedenen Gene konnte ein Szenario zur Evolution der Virulenz von Listerien aufgestellt werden. So zeigt *L. grayi* die tiefste Abzweigung innerhalb der Gattung *Listeria* und bildet somit die ursprünglichste Art. Im Laufe der Evolution trennten sich *L. monocytogenes* und *L. innocua* in eine eigene und *L. seeligeri*, *L. ivanovii* und *L. welshimeri* in eine zweite Entwicklungslinie auf, wobei *L. welshimeri* in dieser Entwicklungslinie die tiefste Verzweigung zeigt. Bemerkenswert ist, daß die pathogenen Eigenschaften demnach zum einen bei *L. innocua* und zum anderen bei *L. welshimeri* mindestens zweimal im Laufe der Evolution durch unabhängige Deletionsereignisse verlorengegangen zu sein scheint.

Eine Gruppierung von *L. monocytogenes*, *L. ivanovii* und *L. seeligeri* in eine gemeinsame Entwicklungslinie war bei keiner der umfangreichen Analysen zu erkennen. Die Untersuchungen deuten daher eher darauf hin, daß der phylogenetische Vorgänger von Listerien - außer *L. grayi* - das „Virulenzgencluster“ als „Virulenzkassette“ oder „Virulenzinsel“ aufgenommen hat und später die pathogenen Eigenschaften nach Auftrennung in die beiden Entwicklungslinien durch zweimalige unabhängige Deletion von Teilen dieses „Virulenzgenclusters“ die Pathogenität verlorengegangen ist. Eine einmalige Aufnahme einer „Virulenzkassette“ bei dem Vorfahren von *L. seeligeri*, *L. ivanovii* und *L. monocytogenes* und der einmalige Verlust der Virulenz im Laufe der Evolution bei *L. seeligeri* erscheint daher als eher unwahrscheinlich.

Die natürlichen ökologischen Nischen der einzelnen *Listeria* Arten überlappen sich und sind hauptsächlich von Umweltfaktoren abhängig. Alle Arten der Gattung *Listeria* lassen sich in

Erde, verrottendem Gemüse, Abwasser usw. finden. Alle Arten der Gattung *Listeria* lassen sich aber auch im Intestinaltrakt von gesunden Trägern nachweisen. Daneben werden *L. monocytogenes*, *L. innocua* und *L. ivanovii* oft im Stuhl von ansonsten gesunden Personen nachgewiesen (Farber und Peterkin, 1991; Rocourt *et al.*, 1985). Da Listerien sich oft dieselben Habitate teilen, scheint ein genetischer Austausch z.B. der oben erwähnten „Virulenzkassetten“ oder „Virulenzinseln“ unter den *Listeria* Arten theoretisch möglich zu sein. Die Häufigkeit dieser Vorgänge sind jedoch nicht bekannt.

Die ähnliche Struktur des „Virulenzgenclusters“ von *L. ivanovii* und *L. monocytogenes* spiegelt wahrscheinlich deren Adaptation zu Säugetier-Wirtsorganismen wider, während das „Virulenzgencluster“ von *L. seeligeri* mit seinen fünf zusätzlichen Genen im Vergleich zu *L. monocytogenes* möglicherweise das Ergebnis einer Adaptation an einen noch unbekanntem Wirtsorganismus ist. In der Literatur wird beschrieben, daß *L. monocytogenes* und *L. seeligeri* unter Laborbedingungen in Protozoen wie *Acanthamoeba castellanii* und *Tetrahymena pyriformis* überleben und aus diesen räuberischen Organismen auch wieder entkommen können (Ly *et al.* 1990). Die mögliche Assoziation von Listerien mit Protozoen eröffnet die Möglichkeit, daß das „Virulenzgencluster“ als eine Art Abwehr- oder Verteidigungsmechanismus gegen räuberische Protozoen im Laufe der Evolution gebildet wurde.

Listeria monocytogenes und *L. ivanovii* sind fakultativ intrazelluläre pathogene Mikroorganismen. Sie werden am häufigsten durch den Verzehr kontaminierter Nahrungsmittel verbreitet. Obwohl oft gesunde Menschen und Tiere als Träger der beiden Organismen fungieren, sind Infektionen mit *L. monocytogenes* und *L. ivanovii* oft assoziiert mit verschiedenen Infektionskrankheiten wie Sepsis oder Meningoencephalitis in Föten, Kleinkindern, älteren oder immunsupprimierten Personen assoziiert (Jones, 1992). Das Virulenzverhalten von *L. seeligeri* ist wie bereits erwähnt weitgehend unverstanden. *Listeria seeligeri* kann die Virulenzgene unter Laborbedingungen nicht exprimieren. Das von *L. seeligeri* stammende Listeriolysin-Gen ist aber z.B. funktionell wenn das *prfA* Gen von *L. monocytogenes* durch genetische Manipulation in *L. seeligeri* eingeführt wird (Karunasagar *et al.*, 1997). Dieses veranschaulicht das lückenhafte Verständnis, unter welchen Bedingungen *L. seeligeri* seine Virulenzgene exprimiert und vor allem gegen welchen Wirtsorganismus *L. seeligeri* sein potentiell pathogenes Potential richtet.

Die Infektionsdosis, um an einer Listeriose zu erkranken, wird auf 10^7 bis 10^9 Organismen in gesunden Erwachsenen geschätzt (Farber *et al.*, 1996). Im Gegensatz dazu wird bei einigen

Salmonella enterica-Stämmen von einer Infektionsdosis von weniger als 10^3 Mikroorganismen, bei *Vibrio cholerae* von etwa 10^3 Keimen (Blaser *et al.* 1982; Cash *et al.* 1974; Colwell 1996) und bei *Shigella flexneri* sogar von nur 10 bis 100 Bakterien (DuPont *et al.* 1989) ausgegangen. Im Vergleich zu diesen „effektiveren“ Krankheitserregern, die auch wie *L. monocytogenes* den Gastrointestinaltrakt von Menschen und andere Säuger befallen, scheint *L. monocytogenes* ein relativ schlecht adaptierter Organismus in Bezug auf sein pathogenes Potential für Menschen zu sein. Die hohe Infektionsdosis spricht eher dafür, daß der dominierende Lebensstil von Listerien nicht parasitär ist.

D.3.: Vergleichende phylogenetische Analysen von Sequenzdaten der Gene *plcA* und *iap*

Unterschiede im Virulenzverhalten und Wirtsspektrum wurden bisher nicht nur für Stämme von *L. monocytogenes* (Piffaretti *et al.*, 1989; Farber und Peterkin, 1991), sondern auch für andere humanpathogene Keime beschrieben (Quentin *et al.*, 1995). Zum Beispiel können Stämme von *L. monocytogenes* in Tieren vier klar abgegrenzte Infektionskrankheiten auslösen. Eine Infektion mit *L. monocytogenes* kann zur Ausbildung von Encephalitis, einer Sepsis oder zum Abort eines Fötus führen. Daneben kann eine Entzündung der mittleren Augenhaut (Uveitis) auftreten. Während eines Listeriose-Ausbruchs wird in einem Tier immer nur einer dieser Erkrankungskomplexe diagnostiziert. Dies deutet darauf hin, daß Unterschiede im Virulenzverhalten zwischen Stämme von *L. monocytogenes* bestehen, da die Stämme jeweils nur eine Erkrankung auslösen, aber nie mehrere gleichzeitig (Wiedmann *et al.*, 1997).

Daher sollten in der vorliegenden Arbeit detaillierte vergleichende Sequenzanalysen durchgeführt werden, um zum einen mögliche Unterschiede im Virulenzverhalten von *L. monocytogenes* erkennen zu können und zum anderen einen Beitrag zur Evolution von Stämmen von *L. monocytogenes* zu liefern. In der Gattung *Listeria* sind die üblicherweise für phylogenetische Analysen verwendeten Gene der 16S- und 23S-rRNS mit Ausnahme von *L. grayi* überaus stark konserviert (98,7-99,6 % 16S-rRNS und 99,5-99,7 % 23S-rRNS Sequenzähnlichkeit) und sind für eine weitere Untergliederung daher nicht geeignet.

In der vorliegenden Arbeit wurden die beiden Virulenzgene *iap* und *plcA* für die phylogenetische Analyse ausgewählt. Das *iap*-Gen konnte bei allen bisher bekannten sechs Arten der Gattung *Listeria* nachgewiesen werden und trägt mit seinem Genprodukt, dem sogenannten p60-Protein, dazu bei, daß Zellen von *L. monocytogenes* unter Mitwirkung von Internalin-A (Gaillard *et al.*, 1991) sich erfolgreich an die Wirtszellmembran anheften

können. Neben dieser für die Adhärenz an die Zielzelle wichtigen Funktion erfüllt das p60-Protein außerdem noch die lebenswichtige Funktion als Mureinhydrolase in der letzten Phase der Zellteilung bei der Trennung der Querwände. Daneben wurde das *plcA*-Gen für eine vergleichende phylogenetische Sequenzanalyse herangezogen. Das Genprodukt verhilft *L. monocytogenes* durch seine Phospholipase-Aktivität gemeinsam mit dem Hly-Protein aus dem Wirtszellphagosom zu entkommen und ins Zytosol der Wirtszelle zu gelangen.

Durch detaillierte Sequenzanalyse können Stämme von *L. monocytogenes* in drei Entwicklungslinie unterteilt werden. Die Berechnung der Nuklein- und Aminosäuresequenzdaten erwies eine stabile Zuordnung in die einzelnen Linien (siehe Tabelle G.1. im Anhang). Dabei wurden Sequenzfilter verwendet, die die TN-„repeat“-Domäne bei der Berechnung ausschließen. In diesem hochvariablen Abschnitt des *iap*-Gens zeigt sich eine Anhäufung an Wiederholungen der Aminosäuren Threonin (T) und Asparagin (N). Die Anzahl dieser Wiederholungen variiert unter den Stämmen von *L. monocytogenes* (Bubert *et al.*, 1992). Diese Domäne wird durch Deletions- und Insertionsereignisse gebildet. Sie könnte z.B. durch eine „Tandem-Multiplikation“ der Repetitionseinheit -ACAAAT- gebildet worden sein (Köhler *et al.*, 1990). Demnach sollte dieser Bereich für phylogenetische Analysen ausgeschlossen werden, denn in diesem Zusammenhang sollten Mutationsereignisse und nicht der Austausch ganzer Sequenzkassetten zur Phylogenie beitragen. Die Literatur zeigt, daß dennoch auch dieser Bereich für phylogenetische Analysen herangezogen wurde (Rasmussen *et al.*, 1995). In dieser Publikation wurden ebenfalls drei evolutionäre Linien von *L. monocytogenes* postuliert. Diese wurden mit dem Auftreten von drei Sequenztypen bei den untersuchten *L. monocytogenes*-Stämmen begründet. Die drei Sequenztypen unterschieden sich aber nur durch 10 Basenaustausche voneinander, die jedoch zu keinem einzigen Aminosäureaustausch führten.

Rasmussen beobachtete aber auch drei unterschiedliche Längenausprägungen an TN-Wiederholungen innerhalb der TN-„repeat“-Domäne. In der von ihm vorgeschlagenen Entwicklungslinie I waren *L. monocytogenes*-Stämme mit 17, in Entwicklungslinie II mit 16-17 und in Entwicklungslinie III mit 16-20 TN Wiederholungen zugeordnet. In der vorliegenden Arbeit wurden ebenfalls drei evolutionäre Linien postuliert. In dem hochvariablen Abschnitt des *iap*-Gens (Position 333 bis 488 im Aminosäurealignment der *iap*-Gen Sequenzdatenbank) konnten ebenfalls drei unterschiedliche Längengruppen an TN-„repeats“ (siehe C.4.1.1.) den Entwicklungslinien von *L. monocytogenes* zugeordnet werden. In der vorliegenden Arbeit postulierten Entwicklungslinie I befindet sich *L. monocytogenes*-Stämme mit Wiederholungen von 11 TN-Einheiten. Dagegen finden wir in der

Entwicklungslinie III den längsten TN-„repeat“ mit 15-24 Wiederholungen. In die Entwicklungslinie II lassen sich *L. monocytogenes* Stämme zuordnen, die einen TN-„repeat“ von 13-17 Wiederholungen zeigen.

Die Sequenzanalyse der *iap*-Gene, zeigte eine weitaus bessere Auflösung innerhalb der *Listeria* Arten, besonders innerhalb der *L. monocytogenes* Stämme, als es die 16S- und 23S-rRNS-Sequenzen erlauben.

Die einzelnen Entwicklungslinien weisen folgende Sequenzähnlichkeiten zueinander auf.

Entwicklungslinie I zu Entwicklungslinie II	93,5-94,4 %
Entwicklungslinie I zu Entwicklungslinie III	93,7-96,1 %
Entwicklungslinie II zu Entwicklungslinie III	95,6-97,5 %

Innerhalb der einzelnen Entwicklungslinien war durch die Sequenzanalyse keine weitere aussagekräftige Auflösung mehr zu erkennen. So zeigten die *L. monocytogenes* Stämme

innerhalb der Entwicklungslinie I	99,4-99,7 %
innerhalb der Entwicklungslinie II	98,3-100 %
und innerhalb der Entwicklungslinie III	96,7-100 %

Sequenzähnlichkeit zueinander.

Bei der umfangreichen Sequenzanalyse der *iap*-Gene von *L. monocytogenes* wurden viele Stämme vom gleichen Serotyp (siehe B.1.2.) untersucht. Alle identischen Serotypen von *L. monocytogenes* wurden nach phylogenetischer Analyse in dieselbe Entwicklungslinie gruppiert. Alle *L. monocytogenes* Stämme der Serotypen 4a und 4c wurden in die Entwicklungslinie I, alle Stämme des Serotyps 1/2b, 3b, 4b, 4d, 4e und 7 in die Entwicklungslinie II und alle Stämme des Serotyps 1/2a, 1/2c, 3a, 3c und 4ab in die Entwicklungslinie III eingeordnet. Lediglich ein Stamm (*L. monocytogenes* NV4700) wurde der Entwicklungslinie II zugeordnet, obwohl er vom Serotyp 4a war. Die Länge des TN-„repeats“ von 16 Wiederholungen und nicht 11 Wiederholungen, wie es für die Entwicklungslinie I typisch wäre, und publizierte Fehler bei der Serotypisierung (Rocourt *et al.*, 1985) sprechen eher dafür, daß dieser Stamm falsch serotypisiert wurde, als daß die

Konstanz der Serotypen in den jeweiligen Entwicklungslinien von *L. monocytogenes* nicht stabil wäre.

Listeria monocytogenes-Stämme vom Serotyp 4a und 4c sind sogenannte „exotische“ Stämme, die sehr selten isoliert werden. Beim Menschen treten sie nur als Koinfektion mit anderen *L. monocytogenes* Stämmen auf. Dies spricht dafür, daß *L. monocytogenes*-Stämme vom Serotyp 4a und 4c im Laufe der Evolution Teile ihres Virulenzvermögens verloren haben oder sie haben sich, wie im Fall von *L. seeligeri* in D.2. diskutiert, an einen anderen noch unbekanntem Wirt besser angepaßt als es z.B. für die *L. monocytogenes* Stämme vom Serotyp 4b 1/2b oder 1/2a zutrifft. Diese Serotypen sind beim Menschen die dominanten Isolate nach einer Infektion mit *L. monocytogenes*.

Durch vergleichende phylogenetische Analyse der *plcA* Sequenzen sollten die oben erhaltenen Ergebnisse bestätigt werden. Die Analyse ergab für *L. monocytogenes* ebenfalls eine Aufspaltung in drei Entwicklungslinien. Stellt man die Dendrogramme von *iap*- und *plcA*-Sequenzdaten gegenüber, so erkennt man nicht nur eine übereinstimmende Gruppierung der Serovarianten, sondern auch eine starke Übereinstimmung in der Topologie der Dendrogramme (Abbildung D.1.).

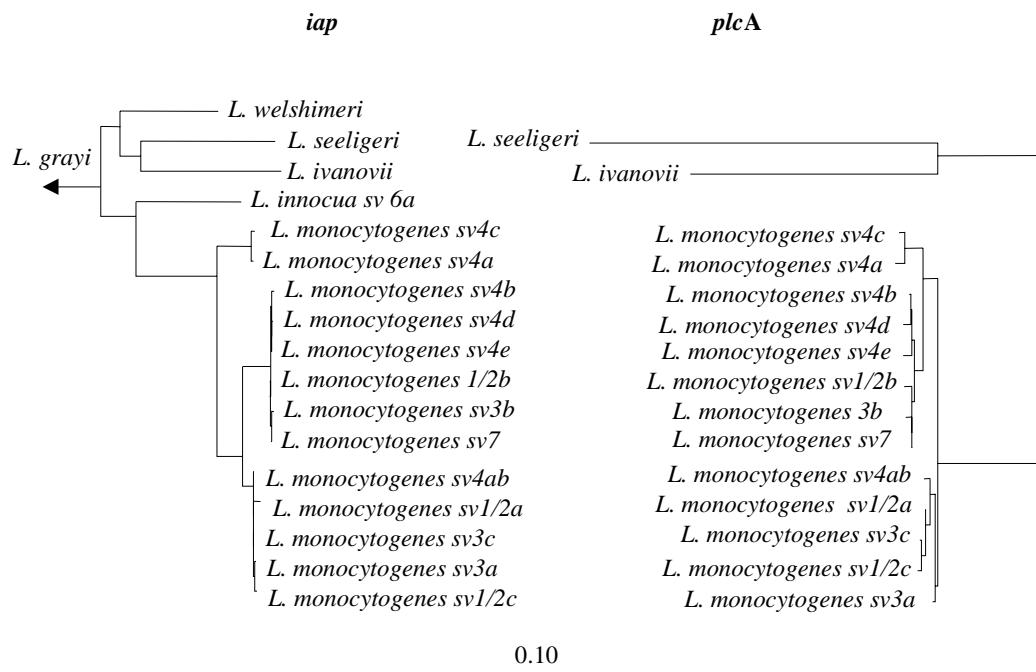


Abbildung D.1.: Phylogenetische Dendrogramme basierend auf *iap*-Gen Sequenzdaten (links) aller *Listeria* Arten sowie aller 13 Serovarianten von *L. monocytogenes* und *plcA*-Gen Sequenzdaten von *L. ivanovii*, *L. seeligeri* und aller 13 Serovarianten von *L. monocytogenes* berechnet nach dem „Neighbor-Joining“-Verfahren. Bei der *iap*-Gen-Analyse wurde ein Sequenzfilter verwendet, der die TN-„repeat“-Domäne bei der Berechnung ausschließt.

DISKUSSION

Zum Nachweis von *L. monocytogenes* werden kommerziell unter anderem immunologische Testsysteme wie ELISA Tests, die Antikörper gegen p60 Proteine enthalten, angeboten. Ein System verwendet gegen das p60-Protein gerichtete Antikörper. Dies stellt eine sehr elegante Methode zur Detektion von *L. monocytogenes* dar, da das p60 Protein hauptsächlich im Kulturüberstand zu finden ist und somit nicht direkt mit infektiösem Material gearbeitet werden muß. In der vorliegenden Arbeit wurden zunächst die beiden *L. monocytogenes* Stämme „Aachen“ und „F-Stamm“, die keine Reaktion mit diesem Antikörper zeigten (Bubert, persönliche Mitteilung), einer Sequenzanalyse unterzogen. Anhand der Aminosäuresequenzdaten konnte sehr leicht eine Mutation im Epitop der Antikörperbindungsstelle festgestellt werden. Durch eine Mutation von A (Ala = Alanin) nach T (Thr = Threonin) an Position 298 wurde die Erkennungsstelle des Antikörpers verändert. In Abbildung D.2. ist ein Ausschnitt aus dem „Alignment“ der Aminosäuresequenzdaten dargestellt. Im Epitop des Antikörpers (QQQTAPKAPTE) ist die Mutation zu erkennen.

	288	298	305
<i>L. monocytogenes</i> Stamm EGD sv 1/2a			
	TAT	QQQTAPKAPTE	AAKP
<i>L. monocytogenes</i> r62a		.T.	
<i>L. monocytogenes</i> r479A		.T.	
<i>L. monocytogenes</i> Stamm Aachen		.T.	
<i>L. monocytogenes</i> IMVW761		.T.	
<i>L. monocytogenes</i> IMVW1454		.T.	
<i>L. monocytogenes</i> Stamm-F		.T.	
<i>L. monocytogenes</i> IMVW567		.T.	
<i>L. monocytogenes</i> IMVW568		.T.	
<i>L. monocytogenes</i> IMVW566		.T.	
<i>L. monocytogenes</i> IMVW560		.T.	

Abbildung D.2.: Ausschnitt aus dem Aminosäurealignment von Position 288 bis 305 der Stämme, die eine Mutation im Epitop des „spezifischen“ Antikörpers zur ELISA-Detektion von *L. monocytogenes* aufweisen.

Erstaunlicherweise trat diese Mutation, die als extrem selten beschrieben wird (Bubert, persönliche Mitteilung) und bisher nur bei exotischen, katalase-negativen *L. monocytogenes* Stämmen beobachtet wurde (Bubert *et al.*, 1997), bei 10 von 34 untersuchten *L. monocytogenes* Stämmen auf, die der evolutionären Linie III zugeordnet wurden. Dies bedeutet, daß ungefähr 30 % der *L. monocytogenes* Stämme der Entwicklungslinie III nicht mit dem ELISA detektiert werden können.

D.4.: Subtypisierung von *L. monocytogenes* durch PFGE-RLFP-Analyse

Eine sehr häufig angewendete Methode, Listerien und vor allem *L. monocytogenes* auf genomischer Ebene durch „fingerprint“-Analyse zu differenzieren, ist die „pulsed-field“-Gelelektrophorese (PFGE). Sie wird als hoch auflösende Methode, in einigen Artikeln sogar als die am besten geeignete Methode zur Feindifferenzierung von *L. monocytogenes* beschrieben (Brosch *et al.*, 1991; Buchrieser *et al.*, 1991; Buchrieser *et al.*, 1993; Carriere *et al.*, 1991; Howard *et al.*, 1992).

In der vorliegenden Arbeit wurden 13 *L. monocytogenes* Stämme, die alle bekannten Serovarianten abdecken, einer Analyse durch PFGE-RLFP [B.1.14.] unterzogen (siehe C.4.2.3.). Dabei konnten unter Verwendung der Restriktionsendonukleasen *ApaI* und *AscI*, mit Einschränkungen, verschiedene Bandenmustergruppen (im folgenden als PFGE-*ApaI*-Gruppe oder PFGE-*AscI*-Gruppe bezeichnet) detektiert werden. Sie zeigen übereinstimmend zu den vergleichenden phylogenetischen Untersuchungen an Virulenzfaktoren, daß sich *L. monocytogenes* im Laufe der Evolution offensichtlich in drei Entwicklungslinien aufgespalten hat. Dadurch konnten die durch vergleichende Sequenzanalyse von zwei wichtigen Virulenzfaktoren für *L. monocytogenes* erhaltenen Daten (siehe C.4.1.1. und C.4.1.2.) auch auf genomischer Ebene bestätigt werden.

Durch Einsatz der Restriktionsendonuklease *ApaI* bei der PFGE-RLFP-Analyse konnten für die auf der Basis der *iap*- und *plcA*-Gen-Sequenzen postulierten Entwicklungslinien II und III von *L. monocytogenes* zwei Bandenmustergruppen gefunden werden. Für die beiden *L. monocytogenes* Serovarianten 4a und 4c (Entwicklungslinie I) konnten trotz mehrmaliger Wiederholung der PFGE-Experimente keine Bandenmuster detektiert werden. Offensichtlich besitzen diese beiden als exotische *L. monocytogenes* Stämme bezeichneten Serovarianten auf ihrem Chromosom keine Erkennungsstelle für die Restriktionsendonuklease *ApaI*. Eine eher unwahrscheinliche Erklärung wäre, daß diese beiden Serotypen von *L. monocytogenes* zusätzliche Schnittstellen im Vergleich zu den übrigen *L. monocytogenes* Serotypen für das Restriktionsenzym *ApaI* besitzen und die dadurch resultierenden niedrig-molekularen Bandenfragmente durch die PFGE nicht mehr detektiert werden können. Dieses Phänomen wurde schon früher beschrieben (Brosch *et al.*, 1994). Ein in dieser Publikation untersuchter *L. monocytogenes*-Stamm, der vom Serotyp 4c war, besaß auch keine Schnittstelle für *ApaI*. Folgende Serovarianten wurden den jeweiligen Restriktionsmustergruppen zugeordnet.

DISKUSSION

PFGE- <i>ApaI</i> -Gruppe I	4a, 4c
PFGE- <i>ApaI</i> -Gruppe II	1/2b, 3b, 4b, 4d, 4e, 7
PFGE- <i>ApaI</i> -Gruppe III	1/2a, 1/2c, 3a, 3c, 4ab

Diese Ergebnisse korrelieren sehr gut mit den nach vergleichender Sequenzanalyse postulierten Entwicklungslinien von *L. monocytogenes*. Auch in früheren Untersuchungen wurden die Serotypen 1/2b, 3b, 4b, 4d und 4e, die die Flagellen (H) Antigene vom Typ ABC präsentieren (Seeliger und Höhne, 1979), nach PFGE-Analyse in einer Gruppe zusammengefaßt. Ein *L. monocytogenes*-Stamm vom Serotyp 7 wurde jedoch nicht untersucht. Die Serotypen die der PFGE-*ApaI*-Gruppe II zugeordnet wurden, konnten weiterhin noch in zwei Untergruppen eingeordnet werden, in denen sich die Serotypen 1/2b, 3b, 7 bzw. 4b, 4d, 4e befanden. Die Serotypen 1/2a, 1/2c, 3a, 3v, 4ab, die die Flagellen (H) Antigene vom AB und BD Typ präsentieren (Seeliger und Höhne, 1979), konnten der PFGE-*ApaI*-Gruppe III zugeordnet werden.

Bei der Analyse der Bandenmuster der PFGE-*ApaI*-Gruppe II waren die nahezu identischen Muster, die bei Restriktion der *L. monocytogenes* Stämme der Serotypen 4b, 4d und 4e entstanden, auffällig. Dies könnte entweder an einer Verwechslung der *L. monocytogenes* Stämme bei der PFGE-Analyse liegen, oder die Methode der PFGE ist nicht auflösend genug, diese 3 Serotypen voneinander zu diskriminieren. Eine ähnliche Beobachtung wurde bereits von Brosch (1994) gemacht. Auch hier zeigte ein *L. monocytogenes* Stamm der von Serotyp 4d war, ein identisches Bandenmuster zu einem *L. monocytogenes* Stamm vom Serotyp 4b. Die Restriktionsanalyse mit *ApaI* (18–23 Fragmente) wird gewöhnlich als höher auflösend als mit *AscI* (8-14 Fragmente) beschrieben, da durch *ApaI* in der Regel mehr Fragmente erhalten werden und somit auch mehr Bandenmuster entstehen können.

Bei PFGE-Analyse mit der Restriktionsendonuklease *AscI* konnten die untersuchten *L. monocytogenes* Stämme ebenfalls in drei Gruppen eingeteilt werden. Die Zugehörigkeit der Serotypen zu den einzelnen Bandenmustergruppen ist analog zu der Einteilung nach PFGE-Analyse mit dem Enzym *ApaI* und den drei Entwicklungslinien von *L. monocytogenes*, die nach vergleichender Sequenzanalyse der *iap*- und *plcA*-Gene postuliert wurden. Folgende Serotypen von *L. monocytogenes* wurden den jeweiligen Bandenmustergruppen zugeordnet.

PFGE- <i>AscI</i> -Gruppe I	4a, 4c
PFGE- <i>AscI</i> -Gruppe II	1/2b, 3b, 4b, 4d, 4e und 7
PFGE- <i>AscI</i> -Gruppe III	1/2a, 1/2c, 3a, 3c, 4ab

Durch PFGE-Analyse mit der Restriktionsendonuklease *AscI* konnte für beide *L. monocytogenes* Stämme von Serotyp 4a und 4c Bandenmuster erhalten werden, die sich sehr von den Mustern der PFGE-*AscI*-Gruppe II und III unterschieden. Auch hier zeigten nach Restriktion der DNS, die *L. monocytogenes*-Stämme vom Serotyp 4b, 4d und 4e die nahezu identischen Muster. Die Serotypen 1/2b, 3b, 7 bzw. 4b, 4d, 4e konnten ebenfalls wieder in zwei Untergruppen in der Entwicklungslinie II von *L. monocytogenes* unterteilt werden.

D.5.: Entwicklung PCR-gestützter Verfahren zur Diskriminierung von *L. innocua* und *L. monocytogenes* und zur Feintypisierung von *L. monocytogenes*

Neben den in D.1.2.1. und D.1.2.2. diskutierten *in situ* Detektionsverfahren für Listerien mit rRNS-gerichteten Sonden wurden auch PCR gestützte Verfahren für die spezifische Detektion von *L. monocytogenes* und *L. innocua* entwickelt. So wurde ein „Multiplex-PCR“-System entwickelt (siehe C.4.2.1.7.), das es erlaubt, die beiden wichtigen *Listeria* Arten *L. innocua* und *L. monocytogenes* voneinander zu diskriminieren. Das ebenfalls entwickelte PCR-System, das spezifisch für die einzelnen Entwicklungslinien von *L. monocytogenes* ist (siehe C.4.2.1.), könnte in Kombination mit dem „Multiplex-PCR“-Verfahren und aufgrund der oben erwähnten stabilen Serotyp-Entwicklungslinien-Assoziation zur Voruntersuchung zahlreicher Stämme verwendet werden. Dies könnte bei epidemiologischen Studien nach einem Listeriose-Ausbruch von Nutzen sein. Die PCR gestützte Identifikation der *Listeria* Arten und die PCR-gestützte Zuordnung in die jeweiligen Entwicklungslinien von *L. monocytogenes* Isolaten könnte die anschließende, aufwendige Serotypisierung entlasten. Ebenso könnte die entwickelte Methode der Einspursequenzierung zu einer Vorab-Untersuchung vieler Isolate und zur Diskriminierung von *L. innocua* und *L. monocytogenes* verwendet werden. Durch den einfachen Vergleich der Bandenmuster könnten mit dem in der vorliegenden Arbeit verwendeten Sequenzierautomaten ca. 250 *Listeria*-Stämme an einem Tag untersucht werden. Die Methode der „kompetitiven“-PCR wurde in dieser Arbeit zur Spezifitätserhöhung des PCR-gestützten Nachweissystems für die Entwicklungslinien von *L. monocytogenes* entwickelt. Sie kann natürlich auch für die Amplifikation jedes anderen gewünschten DNS-Abschnittes verwendet werden, bei dem sonst oft unspezifische Amplifikate auftreten. Durch die Verwendung der nicht „verlängerbaren“, kompetitiv

wirkenden Primer kommt es zu einer Diskriminierung nicht gewollter Amplifikationsprodukte.

D.6.: Infektionsstudien mit *L. monocytogenes*

In der vorliegenden Arbeit wurden Zelllinien mit verschiedenen *L. monocytogenes* Stämmen infiziert, um die Vermutung bestätigen zu können, daß sich Vertreter der einzelnen Entwicklungslinien von *L. monocytogenes* hinsichtlich ihres Infektions- Adhärenz- und Virulenzverhaltens unterscheiden. Dies konnte durch Infektionen mit nativen *L. monocytogenes* Stämmen teilweise bestätigt werden (siehe C.5.1.). Ähnliche Resultate wurden bereits von Wiedmann und Mitarbeitern beobachtet (1997). Hier zeigten auch *L. monocytogenes* Stämme die vom Serotyp 4a waren in „*in vitro*-Zytophagenitätsstudien“ kleinere Plaques als *L. monocytogenes* Stämme, denen ein höheres Virulenzpotential zugesprochen wird wie Stämme des Serotyps 4b. Auch die Auswertung an einem Durchflußzytometer erbrachte teilweise vergleichbare Ergebnisse. Jedoch zeigte der Stamm *L. monocytogenes* Aachen sv 1/2a signifikant niedrigere Infektionswerte nach 1 und 20 h Infektion, als die drei anderen Stämme von *L. monocytogenes* (siehe C.5.3.). Die Analyse durch Durchflußzytometrie zeigte auch andere Probleme auf. Durch das Trypsinisieren oder Abschaben der Zellen nach der Infektion kann es bei einigen Zellen zur Lyse kommen (Simm, persönliche Mitteilung). Diese Zelllysate verklumpen und führen zum Verstopfen der Düsen des Durchflußzytometers. Dies führte mehrmals zum Abbruch der Meßreihen. Eine andere Begründung für die stark schwankenden Werte, zeigte die mikroskopische Untersuchung auf. Hier konnten teilweise eher ungewöhnliche zytopatische Effekte verfolgt werden (Bubert, persönliche Mitteilung). So zeigten sich bei Infektion mit dem Stamm *L. monocytogenes* Aachen oft abgelöste Zellen, die sich vom Schalenboden gelöst haben und an der Zelloberfläche schwammen. Diese waren mit grün fluoreszierenden *L. monocytogenes* Zellen angefüllt. Durch die Waschvorgänge vor der Vermessung der Zellen im Durchflußzytometer werden natürlich die von Kulturschalenboden abgelösten Zellen entfernt und stehen somit nicht mehr der Messung zur Verfügung. Ein weiterer Grund der schwankenden Werte könnte das Alter der verwendeten Zellkulturen sein. Die verwendeten Krebszelllinien sind zwar potentiell unsterblich, sie zeigen jedoch im Alter und nach häufiger Passage optisch morphologische Unterschiede zu frischen Kulturen. Gegen Ende der Experimente waren z.B. die CaCo-2 Epithelzellen fast nicht mehr zur Konfluenz zu bringen.

Zusammenfassend sollten für die Adhärenz-, Infektions- und Virulenzuntersuchungen mit standardisierten vielleicht sogar synchronisierten Zelllinien, die sich in der gleichen Zellphase befinden, gearbeitet werden (Simm, persönliche Mitteilung). Da durch die häufigen Wachsschritte infizierte und nicht infizierte Zellen verloren gehen und Zellen durch abschaben oder trypsinisieren zum Teil zerstört werden, empfiehlt sich zur Auswertung z.B. ein Laserscanning-Zytometer. Damit können die Infektionsschälchen direkt nach Infektion mit den jeweiligen GFP-markierten *L. monocytogenes* Stämmen „online“, betrachtet und ausgewertet werden.

E: Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden schnelle und zuverlässige Methoden zum Nachweis der drei bedeutenden humanpathogenen Lebensmittel-Kontaminanten *Listeria*, *Campylobacter* und *Salmonella* basierend auf der Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH) sowie der diagnostischen PCR, entwickelt. Dafür wurden spezifische rRNS-gerichtete Sonden konstruiert und die FISH-Technik dahingehend optimiert, die Verderbsorganismen direkt in der zu untersuchenden Probe oder nach Anreicherung nachzuweisen.

Für die *in situ* Detektion von Listerien wurden zwei gegen die 16S-rRNS gerichtete Sonden konstruiert, die es erlaubten, alle Vertreter dieser Gattung nachzuweisen. So konnten nach einem selektiven Anreicherungsschritt Listerien bereits nach zwei Tagen in Rohmilch detektiert werden. Diese Methode zeichnet sich durch eine erhebliche Zeitersparnis gegenüber klassischen mikrobiologischen Anreicherungstechniken zum Nachweis von Listerien aus, die mindestens 8 Tage in Anspruch nehmen.

Vertreter der Gattung *Campylobacter* konnten mit einer Gattung-spezifischen 16S-rRNS-gerichteten Sonde detektiert werden. Die thermotoleranten Vertreter dieser Gattung konnten von den anderen Arten der Gattung *Campylobacter* durch den Einsatz einer 23S-rRNS-gerichteten Sonde diskriminiert werden und auf diese Weise direkt und ohne Anreicherung in homogenisierter Hühnerleber nachgewiesen werden.

Eine gegen die 23S-rRNS gerichtete Sonde, die alle Unterarten von *Salmonella enterica* erfaßt, wurde für die *in situ* Detektion von Salmonellen eingesetzt. Nach 18 h nicht-selektiver Voranreicherung konnte durch die FISH-Technik eine Zelle der Gattung *Salmonella* in 25 g Ausgangsmaterial einer Bioabfallvergärungsanlage nachgewiesen werden. Diese Methode zeichnet sich ebenfalls durch ihre Schnelligkeit gegenüber den klassischen Verfahren aus, die Isolierung, biochemische Differenzierung und anschließende Serotypisierung beinhalten und ungefähr 2-3 Wochen in Anspruch nehmen.

Ein Schwerpunkt dieser Arbeit bildeten detaillierte vergleichende Sequenzanalysen zur Evolution des „Virulenzclusters“ von Listerien sowie zur Feindifferenzierung von *L. monocytogenes*. Diese Untersuchungen lassen vermuten, daß *L. grayi* die tiefste Abzweigung innerhalb der Gattung *Listeria* bildet. Die anderen fünf Arten scheinen sich im Laufe der Evolution in zwei Entwicklungslinien aufgespalten zu haben. Eine Entwicklungslinie umfaßt die Arten *L. innocua* und *L. monocytogenes*, während der zweiten

Entwicklungslinie *L. ivanovii*, *L. welshimeri* und *L. seeligeri* zugeordnet werden können. Innerhalb dieser zweiten Linie bildet *L. welshimeri* die tiefste Verzweigung. Folglich ging die Fähigkeit der Pathogenität mindestens zweimal im Laufe der Evolution in der Gattung *Listeria* verloren. *L. innocua* und *L. welshimeri* scheinen durch zwei unabhängige Deletionsereignisse wichtige Gene des „Virulenzgenclusters“ und somit gegenüber *L. monocytogenes* bzw. *L. ivanovii* ihre pathogenen Eigenschaften verloren zu haben.

Ferner konnte durch umfangreiche vergleichende Sequenzanalysen zweier Virulenzgene von *L. monocytogenes* gezeigt werden, daß sich die Art *L. monocytogenes* im Laufe der Evolution in drei Entwicklungslinien aufgespalten hat. Dies konnte auf genomischer Ebene auch durch PFGE-RFLP-Analysen bestätigt werden. Offensichtlich haben *L. monocytogenes*-Stämme, die der Entwicklungslinie I zugeordnet wurden, ein sehr viel niedrigeres „Virulenzpotential“ als die Vertreter der beiden anderen Entwicklungslinien. Dies konnte auch durch Infektionsversuche von Zellkulturen mit *L. monocytogenes*-Stämmen der entsprechenden Entwicklungslinien bestätigt werden. Basierend auf den Sequenzdaten des *iap*-Gens wurde ein PCR-gestütztes, hoch-spezifisches und zuverlässiges diagnostisches Verfahren zur Detektion der einzelnen evolutionären Linien von *L. monocytogenes* erarbeitet. Dieses Verfahren der "kompetitiven PCR" wurde an verschiedenen Isolaten von *L. monocytogenes* aus Lebensmitteln und klinischen Ursprungs erfolgreich getestet.

Die in der vorliegenden Arbeit entwickelten Verfahren erwiesen sich als wesentlich schneller und spezifischer als die bisherigen klassischen mikrobiologischen Diagnostikverfahren zum Nachweis humanpathogener Mikroorganismen.

F: LITERATURVERZEICHNIS

- Adamczyk J. (2000).** Entwicklung der quantitativen MPN-FISH-Methode zur Detektion von Salmonellen in Umweltproben, Diplomarbeit am Lehrstuhl für Mikrobiologie, TU-München
- Alderton M. R., Korolik V., Coloe P. J., Dewhirst F. E. and Paster B. J. (1995).** *Campylobacter hyoilei* sp. nov., associated with porcine proliferative enteritis. Int. J. Syst. Bacteriol., **45**:61-66
- Amann R. I., Krumholz L. and Stahl D. A. (1990).** Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic and environmental studies in microbiology. J. Bacteriol. **172**:762-770
- Amann, R. I., W. Ludwig, W. Manz, S. Spring, N. Springer, M. Wagner, and K.H. Schleifer. (1993).** *In situ* identification of nonculturable *bacteria* with rRNA-targeted nucleic acid probes, p. 515-520. In: Trends in Microbial Ecology. R. Guerrero & C. Pedros-Alio (Eds.), Spanish Society for Microbiology, Barcelona, Spain.
- Amann, R., J. Snaidr, M. Wagner, W. Ludwig and K.-H. Schleifer. (1996).** *In situ* visualization of high genetic diversity in a natural microbial community. J. Bacteriol. **178**:3496-3500
- Ames I AQ. (1999).** Foodborne pathogens: risk and consequences: Council of agricultural science and technology
- Anonymous: International Journal of Systematic Bacteriology. (1985).** Validation of the publication of new names and new combinations previously effectively published outside the IJSB. List no. 18. Int. J. Syst. Bacteriol. **35**:375-376
- Anonymous: International Journal of Systematic Bacteriology. (1987).** Validation of the publication of new names and new combinations previously effectively published outside the IJSB. List no. 23. Int. J. Syst. Bacteriol. **35**:179-180
- Arber W. (1978).** Restriktionsendonukleasen. Angew. Chemie **90**:79-85
- Archer D. L., Kvenberg J. E. (1985).** Incidence and cost of foodborne diarrheal disease in the United States. J. Food. Protect. **48**:887-894
- Barer M. R. and Harwood C. R. (1999).** Bacterial viability and cultureability. Adv. Microb. Physiol. **41**:93-137
- Bäumler A. J., Heffron F., Reissbrodt R. (1997).** Rapid detection of *Salmonella enterica* with primers specific for *iroB*. J. Clin. Microbiol. **35**(5):1224-1230

- Bennett J., Holmberg S., Rogers M., Solomon S. (1987).** Infectious and parasitic diseases. In: Amler R, Dull H. editors. Closing the gap: the burden of unnecessary illness. New York: Oxford Univ. Press. 102-114
- Blaser M. J. and Reller L. B. (1981).** *Campylobacter* enteritis. New Eng. J. Med. **305**:1444.
- Blaser M. J., Berkowitz I. D., Laforce M., Cravens J., Relier L. B., Wang W. I. (1979).** *Campylobacter enteritis*: Clinical and epidemiologic features. Ann. Intern. Med. **91**:179-185
- Blaser M. J., Hopkins A., Vasil M. L. (1984).** *Campylobacter enteritis*. N. Engl. J. Med. **305**:1444-1452
- Blaser, M. J., and L. S. Newman. (1982).** A review of human salmonellosis: I. Infective dose. Rev Infect Dis. **4(6)**:1096-106.
- Blaser, M.J. (1980).** *Campylobacter* subspecies *jejuni*: The need for surveillance. J. Infect. Dis. **141**:670
- Bohne J., Kestler H., Uebele C., Sokolovic Z. and Goebel W. (1994).** Transcriptional regulation of the virulence genes of *L. monocytogenes* by the transcriptional activator *prfA*. Mol. Microbiol. **20**:1189-1198
- Brehm K., Kreft J., Ripio M.-T., Vazquez-Boland J. A. (1996).** Regulation of virulence gene expression in pathogenic *Listeria*. Microbiologia Sem **12**:219-236
- Brosch R., Buchrieser C., J. Rocourt. (1991).** Subtyping of *Listeria monocytogenes* serovar 4b by use of low frequency cleavage restriction endonucleases and pulsed-field gel electrophoresis. Res. Microbiol. **142**:667-675
- Brosch R., Chen J. and Luchansky J. B. (1994).** Pulsed-field fingerprinting of *Listeriae*: identification of genomic divisions for *Listeria monocytogenes* and their correlation with serovar. Appl. Environ. Microbiol. **60**:2584-2592
- Brosius J., Dull T.L., Sleeter D. D., Noller H. F. (1981).** Gene organization of primary structure of a ribosomal operon from *Escherichia coli*. J. Mol. Biol. **148**:107-127
- Bryan F. L. (1982).** Diseases transmitted by food. Atlanta: Centers for disease control
- Bubert A., Hein I., Rauch M., Lehner A., Yoon B., Goebel W., Wagner M. (1999).** Detection and differentiation of *Listeria* spp. by a single reaction based on multiplex PCR. Appl. Environ. Microbiol. **65**:1250-1255
- Bubert A., Köhler S. and Goebel W. (1992).** The homologous and heterologous regions within in the *iap* gene allow genus- and species-specific identification of *Listeria* spp. by polymerase chain reaction. Appl. Environ. Microbiol. **58**:2625-2632

- Bubert A., Kuhn M., Goebel W. and Köhler S. (1992).** Structural and functional properties of the p60 proteins from different *Listeria* species. *J. Bacteriol.* **174**:8166-8171
- Bubert A., Riebe J., Schnitzler N., Schönberg A., Goebel W. and Schubert P. (1997).** Isolation of catalase-negative *Listeria monocytogenes* strains from listeriosis patients and their rapid detection by anti p60 antibodies and/or PCR- *J. Clin. Microbiol.* **35**:179-183
- Bubert A., Sokolovic Z., Chun S.-K., Papatheodorou L., Simm A. and Goebel W. (1999).** Differential expression of *Listeria monocytogenes* virulence genes in mammalian host cells. *Mol. Gen. Genet.* **261**:323-336
- Buchrieser C., Brosch R., Catimel B., J. Rocourt. (1991).** Use of pulsed-field gel electrophoresis to compare large DNA-restriction fragments of *Listeria monocytogenes* strains belonging to serogroups 1/2a and 3. *Int. J. Food. Microbiol.* **14**:1351-1355
- Buchrieser C., Brosch R., Catimel B., J. Rocourt. (1993).** Pulsed-field gel electrophoresis applied for comparing *Listeria monocytogenes* strains involved in outbreaks. *Can. J. Microbiol.* **39**:395-401
- Byrd J. J., Xu H., Colwell R. R. (1991).** Viable but noncultureable *bacteria* in drinking water. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**(3):875-878
- Camilli A. H., Goldfine H and Portnoy D. A. (1991).** *Listeria monocytogenes* mutants lacking phosphatidylinositol-specific phospholipase C are avirulent. *J. Exp. Med.* **173**:751-754
- Carriere C., Allardet-Servent A., Bourg G., Audurier A. and M. Ramuz. (1991).** DNA polymorphism in strains in *Listeria monocytogenes*. *J. Clin. Microbiol.* **29**:1351-1355
- Cash, R. A., S. I. Music, J. P. Libonati, M. J. J. Snyder, R. P. Wenzel, and R. B. Hornick. (1974).** Response of man to infection with *Vibrio cholerae*. I. Clinical, serologic, and bacteriologic responses to a known inoculum. *J Infect Dis.* **129**:45-52.
- Chang N. and D. E. Taylor. (1990).** Use of pulsed-field agarose gel electrophoresis to size genomes of *Campylobacter* species and to construct a *SalI* map of *Campylobacter jejuni* UA580. *J. Bacteriol.* **172**:5211-5217
- Chou Q., Rusell M., Birch D. E., Raymond J. and Bloch W. (1992).** Prevention of pre-PCR mis-priming and primer dimerization improves low-copy number amplification. *Nucleic Acid. Res.* **20**:1717-1723
- Clark J. M. and Swika R. L. (1977).** Experimental biochemistry. 2nd ed., W.H. Freeman and Company, San Francisco
- Colwell, R. R. (1996).** Global climate and infectious disease: the cholera paradigm. *Science.* **274**:2025-31.

- Conner D. E., Brackett R. E. and Beuchat L.R. (1986).** Effect of temperature, sodium chloride, and pH on growth of *Listeria monocytogenes* in cabbage juice. Appl. Environ. Microbiol. **52**: 59
- Cossart P. and Kocks C. (1994).** The act-based motility of the facultative intracellular pathogen *Listeria monocytogenes*. Mol. Microbiol. **13**:395-402
- Cossart P., Lecuit M. (1998).** Interaction of *Listeria monocytogenes* with mammalian cells during entry and actin-based movement: bacterial factors, cellular ligands and signalling EMBO J. **17**:3797-3806
- Cossart P., Vincente M. F., Mengaud J., Banquero F., Perez-Diaz J. C., Berche P. (1989).** Listeriolysin O is essential for virulence of *Listeria monocytogenes*: direct evidence obtained by gene complementation. Inf. Imm. **57**:3629-3636
- Coyle H. B., Ezzell J. W. Jr., Keller K. F. and Doyle R. J. (1984).** Differentiation of *Bacillus anthracis* and other *Bacillus* species by lectins. J. Clin. Microbiol. **19**:48
- Cryer D. R., Eccleshall R., Marmur J. (1975).** Isolation of yeast DNA. In: Prescott, D. M. (eds.), Methods in Cell Biology, **12**:39-44
- Curtis G. D. W., Mitchell R. G., King A. F. and Griffin E. J. (1989).** A selective differential medium for the isolation of *Listeria monocytogenes*. Letters Appl. Microbiol. **8**: 95-98
- Daims H., Brühl A., Amann R. I., Schleifer K.-H. and Wagner M. (1999).** The domain-specific probe EUB-338 is insufficient for the detection of all *bacteria*: Development and evaluation of a more comprehensive probe set. Syst. Appl. Microbiol. **22**:434-444
- Dekeyser P. J., Cossin-Detrain M., Butzler J. P., Sternon J. (1972).** Acute enteritis due to relevant *Vibrio*, first positive stool cultures. J. Infect. Dis. **125**:390-392
- Deming M. S., Tauxe R. V., Blake P. A. (1987).** *Campylobacter enteritis* at a university from eating chickens and from cats. **126**:526-534
- Dietrich G., Bubert A., Gentschev I., Sokolovic Z., Simm A., Catic A., Kaufmann S. H. E., Hess J., Szalay A. A. and Goebel W. (1998).** Delivery of antigen-encoding plasmid DNA into the cytosol of macrophages by attenuated suicide *Listeria monocytogenes*. Nature Biotechnology **16**:181-185
- Dominguez Rodriguez L., Fernandez Garayzabal J. F., Vazquez Boland J. A., Rodriguez Ferri E., and Suarez Fernandez, G. (1985).** Isolation de microorganismes de *Listeria* a partir de lait cru destine a le consommation humaine. Can. J. Microbiol. **31**:938.

- Donnelly, C.W., Briggs, E.H., and Donnelly, L.S. (1987).** Comparison of heat resistance of *Listeria monocytogenes* in milk as determined by two methods. *J. Food Prot.* **50**:14-17
- Donnelly, D. (1987).** *Listeria*: Environmental studies. Presented at Food Microbiology Res. Conf. XI, Chicago, Nov. 4-6
- Doyle M. P. (1984).** Association of *Campylobacter jejuni* with laying hens and eggs. *Appl. Environ. Microbiol.* **47**:533
- Doyle M. P. and Schoeni J. L. (1986).** Isolation of *Campylobacter jejuni* from retail mushrooms. *Appl. Environ. Microbiol.* **51**:449
- Duim B., Wassenaar T. M., Rigter A., Wagenaar. (1999).** High-resolution genotyping of *Campylobacter* strains isolated from poultry and humans with amplified fragment length polymorphism fingerprinting. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:2369-2375
- Durant J. A., Corrier D. E., Byrd J. A., Stanker L. H. and S. C. Ricke. (1999).** Feed deprivation affects crop environment and modulates *Salmonella enterica* colonization and invasion of leghorn hens. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**(5):1919-1923
- Ericsson H., Stalhandske P., Danielsson-Tham M.-L., Bannerman E., Bille J., Jaquet Ch., Rocourt J., Ursing J., Tham W. (1996).** Division into five groups by REA of the most frequently isolated phagovar of *Listeria monocytogenes* in sweden. *Med. Microbiol. Letters.* **5**:145-155
- Espaze E. P. , Gautreau D., Catimel B., Miegerville F., Rocourt J., Courtieu A. L. (1989).** An epidemiological survey of human listeriosis in France during 1987, using serotyping and phage typing. *Acta Microbiol. Hung.* **36**:231-234
- Farber J. M. and Peterkin P. I. (1991).** *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiol. Rev.* **55**:476-511
- Farber, J. M., W. H. Ross, and J. Harwig. (1996).** Health risk assessment of *Listeria monocytogenes* in Canada. *Int J Food Microbiol.* **30**:145-56.
- Felsenstein J. (1981).** Evolutionary trees from DNA sequences; a maximum likelihood approach. *J. Mol. Evol.* **17**:368-376
- Fleming D. W., Cochi S. L., Mac Donald K. L., Brondum J., Hayes P.S., Plikaytis B. D., Holmes M. B., Audurier A., Broome C. V. and Reingold A. L. (1985).** Pasteurized milk as a vehicle of infection in an outbreak of listeriosis. *N. Engl. J. Med.* **312**:404-407
- Fluit A. C., Widjojoatmodjo M. N., Box A. T. A., Torensma R., Vekhoef J. (1993).** Rapid detection of *Salmonellae* in poultry with the magnetic immuno-polymerase chain reaction assay. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**(5):1342-1346

- Foster E.M. (1986).** New *bacteria* in the news. A special symposium. *Campylobacter Jejuni*. Food Technol. **40(8):**20
- Fraser J. M. and Sperber W. H. (1988).** Rapid detection of *Listeria* spp. in food and environmental samples by Äsculin hydrolysis. J. Food. Prot. **51:** 762-765
- Freshney R. I. (1987).** Culture of animal cells. Ala R. Liss, Inc., New York
- Fricker C. R. (1984).** A comparison of methods for the isolation of *Salmonella* from sewage sludge. Zbl. Bakt. Hyg. **179:**170-178
- Fritsche, T.R., M. Horn, S. Seyedirashti, R.K. Gautom, K.-H. Schleifer and M. Wagner. (1999).** *In situ* detection of novel bacterial endosymbionts of *Acanthamoeba* spp. phylogenetically related to members of the *Rickettsiales*. Appl. Environ. Microbiol. **65:**206-212
- Gaillard J. L., Berche P., Frehel C, Gouin E. and Cossart P. (1991).** Entry of *Listeria monocytogenes* into cells is mediated by internalin, a repeat protein reminiscent of surface antigens from gram-positive *cocci*. Cell **65:** 1127-1141
- Gaillard, J.L., Berche, P., Mounier, J., Richard, S., and Sansonetti, P. (1987).** *In vitro* model and intracellular growth of *Listeria monocytogenes* in the human enterocyte-like cell line Caco-2. Infect. Immun. **55:**2822-2829
- Gardner G. A. (1981).** *Brochotrix thermosphacta* (*Microbacterium thermosphactum*) in the spoilage of meats: a review, p 139-173. In: Roberts, T. A., Hobbs, G. A., Christian, J. H. B., Skovgaard, N (ed.), Psychrotrophic microorganisms in spilage ang pathogenicity. Academic Press, London
- Gibson J., Lorenz E. and Owen R. J. (1997).** Lineages within *Campylobacter jejuni* by numerical analysis of pulsed-field gel electrophoretic DNA profiles. J. Med. Microbiol. **46:**157-163
- Goebel W., Leitmeister-Wächter M., Kuhn M., Domann E., Chacraborty T., Köhler S., Bubert A., Wünscher M. and Sokolovic Zeljka. (1993).** *Listeria monocytogenes*-a model system for studying the pathomechanisms of an intracellular microorganism. Zbl. Bakt. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart/New York **278:**334-347
- Groisman E. A. und H. Ochman. (1997).** How *salmonella* became a pathogen. Trends. in Microbiol. **5(9):**343-349
- Guenich, H. and Muller, H.E. (1984).** Isolation and quantitative determination of *Listeria monocytogenes* in raw and biologically treated waste water. Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig. B **179:** 266.

- Hanai K., Satake M., Nakanishi H., Venkateswaran K. (1997).** Comparison of commercially available kits with standard methods of detection of *Salmonella* strains in food. *Appl. Environ. Microbiol.* **63(2):775-778**
- Harris N. V., Weiss N. S., Nolan C. M. (1986).** The role of poultry and meats in the etiology of *Campylobacter jejuni/coli* enteritis. *Am. J. Pub. Health.* **76:407-411**
- Ho, J.L., Shands, K.N., Friedland, G., Eckind, P., and Fraser, D.W. (1986).** An outbreak of type 4b *Listeria monocytogenes* infection involving patients from eight Boston hospitals. *Arch. Intern. Med.* **146:520-524.**
- Hoeltke H. J. and C. Kessler (1990).** Non-radioactive labeling of RNA transcripts *in vitro* with the hapten digoxigenin (DIG). *Nucl. Acid Res.* **18:5843-5851**
- Hopkins R. S. and Scott A. S. (1983).** Handling raw chicken as a source of sporadic *Campylobacter jejuni* infections [letter]. *J. Infect. Dis.* **148:770**
- Hopkins R. S., Olmsted R., Istre G. R. (1984).** Endemic *Campylobacter jejuni* infection in colorado: identified risk factors. *Am. J. Pub. Health.* **74:249-250**
- Horn, M., Fritsche, T.R., Gautom, R.K., Schleifer, K.-H., and Wagner, M. (1999).** Novel bacterial endosymbionts of *Acanthamoeba* spp. related to *Paramecium* symbiont *Caedibacter caryophilus*. *Environmental Microbiology.* **1(4):357-367**
- Howard P. J., Harsono K. D. and Luchansky J. B. (1992).** Differentiation of *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua*, *Listeria ivanovii* and *Listeria seeligeri* by pulsed-field gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* **58:709-712**
- Hülphers G. (1911).** Lefvernekros hos kanin orsaked af en ej förut beskrifven bakterie. *Sven: Vet. Tidskr.* **16: 265-273.** Reprinted 1959, *Medlemsbl. Sverge. Vet. Förb.* **11 (Suppl.):11-16**
- Humphrey T. J., Henley A., Lanning D. G. (1993).** The colonization of broiler chicken with *Campylobacter jejuni*; some epidemiologic investigations. *Epidemiol. Infect.* **110:601-607**
- Jones D. (1990).** Foodborne listeriosis. *Lancet.* **336:1171-1174**
- Jones D. (1992).** Current classification of the genus *Listeria*. *Abstr. 11th international symposium on problems of listeriosis (ISOPOL)* p. 7-8
- Jones, D. A. S., H. (1992).** The Genus *Listeria*, p. 4 v. (xliii, 4126). In e. a. Balows A. (ed.), *The Prokaryotes : a handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, applications*, 2nd. ed, vol. v.2. Springer-Verlag, New York.
- Jonnson I., Monsen T., Wistrom J. (1997).** A case of *Plesiomonas shigelloides* cellulitis and bacteraemia from northern europe. *Scand. J. Infect. Dis.* 1997; **29(6):631-632**

- Juretschko, S., Timmermann, G., Schmid, M., Schleifer, K.-H., Pommerening-Röser, A., Koops, H.-P., and Wagner, M. (1998).** Combined molecular and conventional analyses of nitrifying bacterial diversity in activated sludge: *Nitrosococcus mobilis* and *Nitrospira*-like bacteria as dominant populations. *Appl. Environ. Microbiol.*, **64(8)**:3042-3051.
- Kapperud G., Skjerve E., Bean N. H., Ostroff S. M., Lassen J. (1992).** Risk factors for sporadic *Campylobacter* infections: results of a case-control study in southeastern Norway. *J. Clin. Microbiol.* **30**:3117-3121
- Kapperud G., Skjerve E., Vik L., Hauge K., Lysaker A., Aalmen I. (1993).** Epidemiological investigations of risk factors for *Campylobacter* colonization in Norwegian broiler flocks. *Epidemiol. Infect.* **111**:45-55
- Karunasagar, I., R. Lampidis, W. Goebel, and J. Kreft. (1997).** Complementation of *Listeria seeligeri* with the *plcA-prfA* genes from *L. monocytogenes* activates transcription of seeligerolysin and leads to bacterial escape from the phagosome of infected mammalian cells. *FEMS Microbiol Lett.* **146(2)**:303-10.
- Kauffmann F. (1963).** Zur Differenzialdiagnose der *Salmonella*-sub-genera I, II und III. *Acta Path. Microbiol. Scand.* 58:109-113. In: *The procaryotes 2nd Ed.* Balows A., H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder and K.-H. Schleifer (eds.). Springer Verlag, New York. pp2760-2774
- Kauffmann F. (1966).** Zur Klassifizierung und Nomenklatur der *Salmonella*-sub-genera I-IV. *Zbl. Bakt. Hyg. I Ref* **202**:482-483
- Kell D. B., Kaprelyants A. S., Weichart D. H., Harwood C. R., Barer M. R. (1998).** Viability and activity in readily culturable bacteria: a review and discussion of the practical issues. *Antonie van Leeuwenhoek.* **73(2)**:169-187
- Kist M. (1985).** The historical background of *Campylobacter* infection: new aspects. In: Pearson A. D., editor. *Proceedings of the 3rd international workshop on Campylobacter infections*; Ottawa; 1985 Jul 7-10. London: Public Health Laboratory Service; 1985. p. 23-27
- Klein P. G. and Juneja V. K. (1997).** Sensitive detection of viable *Listeria monocytogenes* by reverse transcription-PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 4441-4448
- Köhler S., Bubert A., Vogel M. and Goebel W. (1991).** Expression of the *iap* gene coding for protein p60 of *Listeria monocytogenes* is controlled on the posttranscriptional level. *J. Bacteriol.* **173**:4668-4677

- Köhler S., Leitmeister-Wächter M., Chakraborty T., Lottspeich F. and Goebel W. (1990).** The gene coding for protein p60 of *Listeria monocytogenes* and its use as a specific probe for *Listeria monocytogenes*. *Infect. Immun.* **58**:1943-1950
- Kokotovic B. and S. L. On. (1999).** High resolution genomic fingerprinting of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* by analysis of amplified fragment length-polymorphism. *FEMS Microbiol. Letters* **173**:77-84
- Kreft J., Bohne J., Gross R., Kestler H., Sokolovic Z. and Werner Goebel. (1995).** in Signal transduction and bacterial virulence. Ed by Rico Rappuel, Springer Verlag, Heidelberg, Germany. p. 129-137
- Kuhn M. and Goebel W. (1995).** Molecular studies on the virulence of *Listeria monocytogenes*. Genetic Engineering Plenum Press, New York. **17**:31-51
- Kühn, M., Hausner, M., Bungartz, H.-J., Wagner, M., Wilderer, P.A., and Wuertz, S. (1998).** Semi-automated confocal laser scanning microscopy and image processing for the analysis of biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:4115-4127.
- Lathe R. (1985).** Synthetic oligonucleotide probes deduced from amino acid sequence data. Theoretical and practical considerations. *J. Mol. Biol.* **183**:1-12
- Le Minor L. (1992).** The genus *Salmonella*. In: The procaryotes 2nd Ed. Balows A., H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Herder and K.-H. Schleifer (eds.) Springer Verlag, New York. p. 2760-2774
- Le Minor L. and Popoff M. Y. (1987).** Request for an opinion: Designation of *Salmonella enterica* sp. nov., nom. Rev., as the type and only species of the genus *Salmonella*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **37**:465-468
- Leitmeister-Wächter M., Domann M. E. and T. Chakraborty. (1991).** Detection of a gene encoding a phosphatidylinositol-specific phospholipase C that is co-ordinately expressed with listeriolysin in *Listeria monocytogenes*. *Mol. Microbiol.* **5**:361-366
- Leitmeister-Wächter M., Haffner C., Domann E., Goebel W. and Chakraborty T. (1990).** Identification of a gene that positively regulates expression of listeriolysin, the major virulence factor of *Listeria monocytogenes*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 8336-8340
- Lior H., Woodward D. L., Edgar J. A., Laroche L. J., Gill P. (1982).** Serotyping of *Campylobacter jejuni* by slide agglutination based on heat-labile antigenic factors. *J. Clin. Microbiol.* **15**:761-768

- Lovett J., Francis D. W. and Hunt J. M. (1987).** *Listeria monocytogenes* in raw milk: Detection, incidence and pathogenicity. *J. Food Protect.* **50**:188.
- Ludwig W., K.-H. Schleifer and Stackebrandt E. (1984).** 16S rRNA analysis of *Listeria monocytogenes* and *Brochothrix thermosphacta*. *FEMS Microbiol. Letters* **25**:199-204
- Ly, T. M., and H. E. Muller. (1990).** Ingested *Listeria monocytogenes* survive and multiply in protozoa. *J Med Microbiol.* **33**:51-4
- Ly, T. M., and H. E. Muller. (1990).** Interactions of *Listeria monocytogenes*, *Listeria seeligeri*, and *Listeria innocua* with protozoans. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **36**:143-150
- Manz W., Amann R., Ludwig W., Wagner M. and Schleifer K.-H. (1992).** Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of *proteobacteria*: Problems and solutions. *System. Appl. Microbiol.* **15**:593-600
- Marmur J. (1961).** A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acids from microorganism. *J. Mol. Biol.* **3**:592-600
- Mazurier S. I. and Wenars K. (1992).** Typing of *Listeria* strains by random amplification of polymorphic DNA. *Res. Microbiol.* **143**:499-505
- Medema G. and Schets C. (1993).** Occurrence of *Plesiomonas shigelloides* in surface water: Relationship with faecal pollution and tropic state. *Zentralbl. Hyg. Umweltmed.* Jul; **194**(4):398-404
- Mengaud J., Braun-Breton C. and P. Cossart. (1991).** Identification of phosphatidylinositol-specific phospholipase C activity in *Listeria monocytogenes*: a novel type of virulence factor? *Mol. Microbiol.* **5**:367-372
- Meyer H. (1999).** Animals as sources of infections in humans salmonellosis. *Dtsch Tierärztl. Wschr.* **106**:344-351
- Munro P. M., Flatau G. N., Clément R. L., Gauthier M. J. (1995).** Influence of the RPOS (KatF) sigma factor on maintenance of viability and culturability of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* in seawater. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**(5):1853-1858
- Murray E. G. D., R. A. Webb, M. B. R. Swann (1926).** A disease of rabbits characterised by a large mononuclear leucocytosis, caused by a hitherto undescribed bacillus *Bacterium monocytogenes* (n. sp.), *Journal of Pathology and Bacteriology*, **29**:407-439
- Murray V. (1989).** Improved double-stranded DNA sequencing using the linear polymerase chain reaction. *Nucleic Acid Res.* **17**:8889
- Nakama A., Terao M., Kokubo Y., Itoh T., Maruyama T, Kaneuchi C and McLauchlin J. (1998).** A comparison of *Listeria monocytogenes* serovar 4b isolates of clinical and food origin in japan by pulsed-field gel electrophoresis. *Int. J. Food microbiol.* **42**:201-206

- Nakama A., Terao., Kokubo Y., Itoh T., Maruyama C., Kaneuchi C. Mc Lauchlin J. (1998).** A comparison of *Listeria monocytogenes* serovar 4b isolates of clinical and food origin in Japan by pulsed-field gel electrophoresis. *Int. J. Food Microbiol.* **42**:201-206
- Ng S. P., Tsui C. O., Roberts D., Chau P. Y. and Ng M. H. (1996).** Detection and serogroup differentiation of *Salmonella* spp. in food within 30 hours by enrichment-immunoassay with a T6 monoclonal antibody capture enzyme-linked-immunosorbent assay. *Appl. Environ. Microbiol.* **62(7)**:2294-2302
- Nokrans G. and Svedhem A. (1982).** Epidemiologic aspects of *Campylobacter jejuni* enteritis. *J. Hyg. (Cambridge)* **89**:163-170
- Notermans S. and Hoogenboom-Verdegaal H. (1992).** Existing and emerging foodborne diseases. *Int. J. Food Microbiol.* **15**:197-205
- Oosterom J, den Uyl C. H., Bänffer J. R. J., Huisman J. (1984).** Epidemiologic investigations on *Campylobacter jejuni* in households with primary infections. *J. Hygiene (Cambridge)* **92**:325-32
- Pearson, H.E. (1970).** Human infections caused by organisms of *Bacillus* species. *Am. J. Clin. Pathol.* **53**:506
- Penner J. L., Hennesy J. N., Congi R. V. (1983).** Serotyping of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* on the basis of thermostable antigens. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **2**:378-383
- Peplow M. O., Correa-Prisant M., Stebbins M. E., Jones F., Davies P. (1999).** Sensitivity, specificity and predictive values of three *Salmonella* rapid detection kits using fresh frozen poultry environmental samples versus those of standard plating. *Appl. Environ. Microbiol.* **65(3)**:1055-1060
- Piffaretti J.-C., Kressebuch H., Äschenbacher M., Bille J., Bannermann E., Musser J. M., Selander R. K. and J. Rocourt. (1989).** Genetic characterization of clones of the bacterium *Listeria monocytogenes* causing epidemic disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **86**:3818-1822)
- Pirie J, H. H. (1927).** A new disease of veld rodents „Tiger river disease“. *Publ. S. African. Inst. Med. Res.* **3**:163-186
- Poppe C., Smart N., Khakhira R., Johnson W., Spika J., Prescott J. (1998).** *Salmonella typhimurium* DT104: a virulent and drug-resistant pathogen
- Proctor M. E., Brosch R., Mellen J. W., Garret L. A., Kaspar C. W. and Luchansky J. (1995).** Use of pulsed-field gel electrophoresis to link sporadic cases of invasive listeriosis with recalled chocolate milk. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:3177-3179

- Quentin R., Huet H., Wang F.-S., Geslin P., Goudeau A. and R. K. Selander. (1995).** Characterization of *Streptococcus agalactiae* strains by multilocus enzyme genotype and serotype: identification of multiple virulent clones that cause invasive neonatal disease. J. Clin. Microbiol. **33**:2576-2581
- Rappaport F., Konforti N., Navon B. (1956).** J. Clin. Pathol. **9**:261-266
- Riley L. w., Remis R. S., Helgerson S. D., McGee H. B., Wells J. G., Davis B. R., (1983).** Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. N. Engl. J. Med. 308-681
- Rochelle P. a., Weightman A. J. and Fry J. C. (1992).** DNase I treatment of Taq DNA polymerase for complex PCR decontamination. BioTechniques, **13**:520
- Rocourt J., Audurier A., Courtieu A. L., Durst J., Ortel S., Schrettenbrunner A. and Taylor A. G. (1985).** A multi-centre study on the phage-typing of *Listeria monocytogenes*. Zentralbl. Bakteriol. Hyg. A. **259**:489-497
- Rocourt, J., and H. P. Seeliger. (1985).** Distribution of species of the genus *Listeria*.. Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg [A]. **259(3)**:317-30.
- Rocourt, J., H. Hof, A. Schrettenbrunner, R. Malinverni, and J. Bille. (1986).** Acute purulent *Listeria seeligeri* meningitis in an immunocompetent adult. Schweiz Med Wochenschr. **116(8)**:248-51.
- Rodriguez D. C., Tauxe R. V. Rowe B. (1990).** International increase in *Salmonella enteritidis*: a new pandemic ? Epidemiol. Infect. **105**:21-27
- Roller C., Wagner M., Amann R., Ludwig W. and K.-H. Schleifer (1994).** *In situ* probing of gram-positive *bacteria* with high DNA G+C content content by using 23S-rRNA-targeted oligonucleotides Microbiology. **140**:2849-2858
- Saiki. R. K., Gelfand D. H., Stoffel S., Scharf S. J., Higuchi R., Horn G. T., Mullis K. B., Ehrlich H. A. (1988).** Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science **293**:487-491
- Saitou N. and Nei M. (1987).** The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol. Biol. Evol. **4**:406-425
- Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T. (1989).** Molecular cloning: A laboratory manual 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
- Santos J. A., Gonzalez C. J., Lopez T. M., Otero A., Garcia-Lopez M. L. (1999).** Hemolytic and elastolytic activities influenced by iron in *Plesiomonas shigelloides*. J. Food. Protection Dec; **62(12)**:1475-1477

- Schlech W. F., Lavigne P. M., Bortolussi R. A., Allen A. C., Haldane E. V., Wort A. J., Hightower A. W., Johnson S. E., King S. H., Nichols E. S. and Broome C. V. (1983).** Epidemic listeriosis- evidence for transmission by food. *N. Engl. J. Med.* **308**: 203-206
- Schleifer, K.-H. and M. Wagner. (1998).** *In situ* detection and identification of *bacteria* prior to their cultivation. *Bioscience Microflora*, **17(1)**:15-22
- Schmid G. P., Schaefer R. E., Plikaytis B. D., Schaefer J. R., Bryner J. H., Wintermeyer L. A. (1987).** A one-year study of endemic campylobacteriosis in a midwestern city: association with consumption of raw milk. *J. Infect. Dis.* **156**:218-222
- Schmid M. (1997).** *In situ* Nachweis der mRNS eines Virulenzgens von *Listeria monocytogenes* auf Einzelzellebene, Diplomarbeit am Lehrstuhl für Mikrobiologie, TU-München
- Schubert R. H., Holz-Bremer A. (1999).** Cell adhesion of *Plesiomonas shigelloides* *Zentralbl Hyg. Umweltmed. Sep*; **202(5)**:383-388
- Schuchat A., Swaminathan B. and Broome C. V. (1991).** Epidemiology of human listeriosis. *Clin. Microbiol. Rev.* **4**:169-183
- Seeliger H. P. R. (1961).** Listeriosis. Hafner Press, New York
- Seeliger H. P. R. and D. Jones. (1986).** *Listeria*, p 1235-1245. In P. H. Sneath et al. (ed.) Bergey's manual of systematic bacteriology, vol. 2. The Williams & Wilkins Co., Baltimore.
- Seeliger H. P. R. and K. Höhne. (1979).** Serotyping of *Listeria monocytogenes* and related species. *Methods Microbiol.* **13**:31-49
- Seeliger, H.P.R. and Jones, D. (1986).** Genus *Listeria*. In: Sneath, P. H.A. (ed.), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 2. Williams and Wilkins: Baltimore, MD pp. 1235-1245
- Selliger, H.P.R. (1987).** Listeriosis: History and actual developments. Paper delivered at: World Health Organization Consultation on Prevention and Control of Listeriosis, W. Berlin, December 10-12, 1986, p.3.
- Silliker J. H. (1987).** New bacteria in the news: A special symposium. *Listeria monocytogenes*. *Food Technol.***40(8)**:24.
- Skirrow M. B. and Blaser M. J. (1992).** Clinical and epidemiologic considerations, p. 3-9. In I. Nachakim, M. J. Blaser, and L. S. Tompkins (ed.), *Campylobacter jejuni*: current status and future trends. American Society for Microbiology, Washington, D. C.

- Sneath P. H. A. and Jones D. (1976).** Brochotrix, a new genus tentatively placed in the family *Lactobacillaceae*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **26**:102-104
- Soumet C., Ermel G., Rose N., Rose V., Drouin P., Salvat G., Colin P. (1999).** Evaluation of a multiplex-PCR assay for simultaneous identification of *Salmonella typhimurium* from environmental swabs of poultry houses. *Lett. Appl. Microbiol.* **28**:113-117
- Stackebrandt E. and Woese C. R. (1981).** The evolution of procaryotes, p. 1-31. In: Carlile, M. J., Collins, J. F., and Moseley, B. E. B. 8ed.), *Molecular and cellular aspects of evolution*. Society for general Microbiology
- Stern N J., (1992).** Reservoirs of *Campylobacter jejuni* and approaches for intervention in poultry, p. 49-60. In I. Nachakim, M. J. Blaser and L. S. Tompkins (ed.), *Campylobacter jejuni:current status and future trends*. American Society for Microbiology, Washington, D. C
- Stern N. J., Henderson, M. P., Blankenship, L., Deibel, K. E., Doores, S., Doyle, M. P., Ng, H., Pierson M. D., Sofos, J. N. Sveum, W. H., and Westhoff, D. C. (1985).** Prevalence and distribution of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in retail meats. *J. Food Protect.* **48**:595
- Strunk O. (1993).** Rechnergestützte phylogenetische Analyse von Bakterien aufgrund evolutionärer Basengleichheit an bestimmten Alignment-Positionen. Diplomarbeit an der Technischen Universität München, Lehrstuhl für Informatik.
- Strunk O., Gross O., Reichel B., May M., Hermann S., Stuckman N., Nonhoff B., Lenke M., Ginhart A., Vilbig A., Ludwig T., Bode A., Schleifer K.-H., Ludwig W. (1997).** ARB: A software environment for sequence data. *Nucl. Acid Res.* in prep.
- Strunk O., Ludwig W., (1997).** ARB: A software environment for sequence data [www.document]. URL <http://www.mikro.biologie.tu-muenchen.de>
- Sun A. N., Camilli A. and Portnoy D. A. (1990).** Isolation of *Listeria monocytogenes* small-plaque mutants defective for intracellular growth and cell-to-cell spread. *Infect. Immun.* **58**:3770-3778
- Talon R., Grimont P A., Gasser F. and Boeufgras J. M. (1988).** *Brochotrix campestris* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **38**:99-102
- Tauxe R. V. (1992).** Epidemiology of *Campylobacter jejuni* infections in the United States and other industrialized nations, p. 9-19. In I. Nachakim, M. J. Blaser and L. S. Tompkins (ed.), *Campylobacter jejuni:current status and future trends*. American Society for Microbiology, Washington, D. C

- Todd E. C. D. (1989).** Preliminary estimates of costs of foodborne disease in the United States. *J. Food. Protect.* **52**:595-601
- Turpin P. E., Maycroft K. A., Rowlands C. L. and Wellington E. M. H. (1993).** Viable but noncultureable salmonellas in soil. *J. Appl. Bacteriol.* **74**:421-427
- van Doorn L.-J., van Haperen A. V., Burnens A., Huysmna M., Vandamme P., Giesendorf B. A. J., Blaser M. J. and Quint W. G. V. (1999).** Rapid identification of thermotolerant *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, *Campylobacter lari* and *Campylobacter upsaliensis* from various geographic locations by a GTPase-based PCR reverse Hybridization assay. *J. Clin. Microbiol.* **37**:1790-1796
- Vandamme P., van Doorn L.-J., Al Rashid S. T., Quint W. G. V., van der Plas J., Chan V. L., On S. L. W. (1997).** *Campylobacter hyoilei* Alderton *et al.* 1995 and *Campylobacter coli* Véron and Chatelain 1973 are subjective synonyms. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **47**:1055-1060
- Vasquez-Boland J., Kocks C., Dramsi S., Ohayon H., Geoffrey C., Mengaud J. and Cossart P. 1992).** Nucleotide sequence of the lecithinase operon of *Listeria monocytogenes* and possible role of lecithinase in cell-to-cell spread. *Infect. Immun.* **60**:219-230
- Wagner M., Schmid M., Juretschko S., Trebesius K.-H., Bubert A., Goebel W., K.-H. Schleifer. (1998).** *In situ* detection of a virulence factor mRNA and 16S rRNA in *Listeria monocytogenes*. *FEMS Microbiol. Letters.* **160**:159-168
- Wagner, M., R. Amann, H. Lemmer, and K.H. Schleifer (1993).** Probing activated sludge with oligonucleotides specific for *proteobacteria*: inadequacy of culture-dependent methods for describing microbial community structure. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:1520-1525.
- Wagner, M., R. Amann, H. Lemmer, W. Manz, and K.H. Schleifer. (1994).** Probing activated sludge with fluorescently labeled rRNA targeted oligonucleotides. *Wat. Sci. Tech.* **29**:15-23.
- Wahl G. M., Berger S. L. and A. R. Kimmel (1987).** Molecular hybridization of immobilized nucleic acids: Theoretical concepts and practical considerations. *Methods in Enzymology.* **152**:399-407
- Wain J., Hien T. T., Connerton P., Ali T., Parry C. M., Chinh N. T. T, Vinh H., Phuong C. X. T., Ho V. A. Diep T. S., Farrar J. J., White N. J., Dougan G. (1999).** Molecular typing of multiple-antibiotic resistant *Salmonella enterica* serovar typhi from vietnam: Application to acute and relapse cases of typhoid fever. *J. Clin. Microbiol.* **37(8)**:2466-247

- Walcher M, 1999.** Vergleichende Sequenzanalyse des *iap*-Gens als Grundlage für die Differenzierung von *Listeria monocytogenes* Stämmen und für die Entwicklung eines stammspezifischen PCR-Nachweisverfahrens, Diplomarbeit am Lehrstuhl für Mikrobiologie, TU-München
- Wang R.-F., Cao W.-W. and Johnson M. (1992).** 16S-rRNA-based probes and Polymerase Chain Reaction method to detect *Listeria monocytogenes* cells added to foods. Appl. Environ. Microbiol. **58**:2872-2831
- Weiss B., Thompson A., Richardson C. C. (1968).** Enzymatic breakage and joining of deoxyribonucleic acid. VII. Properties of the enzyme-adenylate intermediate in the polynucleotide ligase reaction. J. Biol. Chem. **243**:4556-4563
- Widjoatmodjo M. N., Fluit A. C., Torensma R., Verdonk G. P. H. T., Verhoef J. (1992).** The magnetic immuno polymerase chain reaction assay for direct detection of *Salmonellae* in fecal samples. J. Clin. Microbiol. **30(12)**:3195-3199
- Wiedmann M., Bruce J. I., Keating C., Johnsons A. E., Mc Donough P. L. and Batt C. A. (1997).** Ribotypes and virulence gene polymorphisms suggest three distinct *Listeria monocytogenes* lineages with different pathogenic potential. Infect. Immun. **65**:27078-2716
- Woese C. R. (1987).** Bacterial evolution. Microbiol Rev. **51**:221-271
- Wuenscher M. D., Köhler S., Bubert A., Gerike U. and Goebel W. (1993)** The *iap* gene of *Listeria monocytogenes* is essential for cell viability, and its gene product p60, has bacteriolytic activity. J. Bacteriol. **175**:3491-3501

G: ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

μ	Mikro (10 ⁻⁶)
A	Adenin, Ampere
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
b	Basen
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin, Kohlenstoff
C.	<i>Campylobacter</i>
ca.	circa
CTP	Cytosintriphosphat
Cy-3	5,5'-Disulfo-1,1'-di(γ-carbopentynyl)-3,3,3',3' tetramethyindol-
Cy-5	Cy 5.18-Derivat, N-hydroxysuccimidester
Da	Dalton
dest.	destilliert
DIG	Digoxigenin
DIG-11-UTP	Digoxigenin-11-uridin-5'-triphosphat
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNase	Deoxyribonuklease
DNS	Deoxyribonukleinsäure
ds	double stranded, doppelsträngig
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ERG	Eppendorf-Reaktionsgefäß
<i>et al.</i>	<i>et alteri</i>
EtBr	Ethidiumbromid
etc.	<i>et cetera</i>
EtOH _{abs}	96 % Ethanol unvergällt
Fluos	5,(6)-Carboxyfluorescein-N-hydroxysuccimidester
Fluos -12-UTP	Fluorescein-12-uridin-5'-triphosphat
g	Fallbeschleunigung, Gramm
G	Guanin
GC	mol % Guanin + Cytosin
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde, hekto
IPTG	Isopropylthiogalactosid
k	kilo (10 ³)
L.	<i>Listeria</i>
m	Milli (10 ⁻³), Meter
M	Molar
min	Minute
ml	Milliliter
n	Nano (10 ⁻⁹)
N	Normal
OD _x	optische Dichte, gemessen bei einer Wellenlänge von x nm
p	para
p.a.	pro analysi
Pa	Pascal
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat gepufferte-Saline- Lösung

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

PCR	Polymerase chain reaction, Polymerase Kettenreaktion
PFA	p-Formaldehyd
POD	Meerrettich-Peroxidase
RNase	Ribonuklease
RNS	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute
rRNS	ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
S	Svedberg (s^{-1})
<i>S.</i>	<i>Salmonella</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
ss	single stranded, einzelsträngig
T	Thymin
<i>Taq</i>	DNS abhängige DNS Polymerase aus <i>Thermus aquaticus</i>
T_D	Dissoziationstemperatur
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
T_M	Schmelztemperatur
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TSA	Tyramid-Signal-Amplifikation
U	units, Uracil
ÜN	Über Nacht
UTP	Uraciltriphosphat
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen/Volumen
Vol.	Volumenanteile
w/v	Masse/Volumen
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- β -D-Galactosid

G: ANHANG

G.1.: Distanzmatrizes der Verwendeten Gene aus dem Virulenzgencluster der *Listeria* Arten

G.1.1.: Ähnlichkeitsmatrix der Nukleinsäuresequenzdaten des *ldh* Gens

	<i>L. monocytogenes</i> ldhnuc	<i>L. innocua</i> ldhnuc	<i>L. welshimeri</i> ldhnuc	<i>L. seeligeri</i> ldhnuc	<i>L. ivanovii</i> ldhnuc	<i>L. grayi</i> ldhnuc
<i>L. monocytogenes</i> ldhnuc	100,0%					
<i>L. innocua</i> ldhnuc	94,3%	100,0%				
<i>L. welshimeri</i> ldhnuc	88,3%	89,8%	100,0%			
<i>L. seeligeri</i> ldhnuc	86,1%	86,1%	87,3%	100,0%		
<i>L. ivanovii</i> ldhnuc	87,1%	89,8%	89,8%	87,8%	100,0%	
<i>L. grayi</i> ldhnuc	75,9%	76,6%	77,9%	76,4%	78,1%	100,0%

G.1.2.: Identitätsmatrix der Aminosäuresequenzdaten des *ldh* Gens

	<i>L. monocytogenes</i> ldhas	<i>L. innocua</i> ldhas	<i>L. welshimeri</i> ldhas	<i>L. seeligeri</i> ldhas	<i>L. ivanovii</i> ldhas	<i>L. grayi</i> ldhas
<i>L. monocytogenes</i> ldhas	100,0%					
<i>L. innocua</i> ldhas	99,2%	100,0%				
<i>L. welshimeri</i> ldhas	97,7%	98,4%	100,0%			
<i>L. seeligeri</i> ldhas	97,7%	96,9%	96,9%	100,0%		
<i>L. ivanovii</i> ldhas	98,4%	99,2%	97,7%	97,7%	100,0%	
<i>L. grayi</i> ldhas	84,5%	85,2%	83,7%	82,9%	85,3%	100,0%

G.1.3.: Ähnlichkeitsmatrix der Nukleinsäuresequenzdaten des *prs* Gens

	<i>L. monocytogenes</i> prsnuc	<i>L. innocua</i> prsnuc	<i>L. welshimeri</i> prsnuc	<i>L. ivanovii</i> prsnuc	<i>L. seeligeri</i> prsnuc	<i>L. grayi</i> prsnuc
<i>L. monocytogenes</i> prsnuc	100,0%					
<i>L. innocua</i> prsnuc	92,3%	100,0%				
<i>L. welshimeri</i> prsnuc	88,3%	87,5%	100,0%			
<i>L. ivanovii</i> prsnuc	88,2%	87,8%	90,6%	100,0%		
<i>L. seeligeri</i> prsnuc	89,7%	89,0%	88,8%	91,2%	100,0%	
<i>L. grayi</i> prsnuc	80,7%	79,2%	79,4%	79,2%	78,1%	100,0%

G.1.4.: Identitätsmatrix der Aminosäuresequenzdaten des *prs* Gens

	<i>L. monocytogenes</i> prsas	<i>L. innocua</i> prsas	<i>L. welshimeri</i> prsas	<i>L. ivanovii</i> prsas	<i>L. seeligeri</i> prsas	<i>L. grayi</i> prsas
<i>L. monocytogenes</i> prsas	100,0%					
<i>L. innocua</i> prsas	99,4%	100,0%				
<i>L. welshimeri</i> prsas	96,9%	97,6%	100,0%			
<i>L. ivanovii</i> prsas	98,0%	96,6%	96,1%	100,0%		
<i>L. seeligeri</i> prsas	98,8%	97,8%	96,9%	99,2%	100,0%	
<i>L. grayi</i> prsas	90,6%	90,6%	89,8%	89,8%	90,6%	100,0%

G.1.5.: Ähnlichkeitsmatrix der Nukleinsäuresequenzdaten des *vclb* Gens

	<i>L. monocytogenes</i> vclbnuc	<i>L. innocua</i> vclbnuc	<i>L. welshimeri</i> vclbnuc	<i>L. seeligeri</i> vclbnuc	<i>L. ivanovii</i> vclbnuc	<i>L. grayi</i> vclbnuc
<i>L. monocytogenes</i> vclbnuc	100,0%					
<i>L. innocua</i> vclbnuc	91,9%	100,0%				
<i>L. welshimeri</i> vclbnuc	84,7%	84,1%	100,0%			
<i>L. seeligeri</i> vclbnuc	86,5%	86,2%	84,4%	100,0%		
<i>L. ivanovii</i> vclbnuc	83,5%	85,0%	84,7%	88,6%	100,0%	
<i>L. grayi</i> vclbnuc	72,4%	72,4%	69,9%	72,7%	71,4%	100,0%

G.1.6.: Identitätsmatrix der Aminosäuresequenzdaten des *vclb* Gens

	<i>L. monocytogenes</i> vclbas	<i>L. innocua</i> vclbas	<i>L. welshimeri</i> vclbas	<i>L. seeligeri</i> vclbas	<i>L. ivanovii</i> vclbas	<i>L. grayi</i> vclbas
<i>L. monocytogenes</i> vclbas	100,0%					
<i>L. innocua</i> vclbas	100,0%	100,0%				
<i>L. welshimeri</i> vclbas	98,1%	98,1%	100,0%			
<i>L. seeligeri</i> vclbas	97,2%	97,2%	95,3%	100,0%		
<i>L. ivanovii</i> vclbas	99,1%	99,1%	97,2%	98,1%	100,0%	
<i>L. grayi</i> vclbas	78,8%	78,8%	78,8%	77,9%	78,8%	100,0%

G.1.7.: Ähnlichkeitsmatrix der Nukleinsäuresequenzdaten des *orfa* Gens

	<i>L. seeligeri</i> orfanuc	<i>L. ivanovii</i> orfanuc	<i>L. monocytogenes</i> orfanuc	<i>L. innocua</i> orfanuc	<i>L. welshimeri</i> orfanuc
<i>L. seeligeri</i> orfanuc	100,0%				
<i>L. ivanovii</i> orfanuc	83,4%	100,0%			
<i>L. monocytogenes</i> orfanuc	75,9%	75,1%	100,0%		
<i>L. innocua</i> orfanuc	76,4%	75,4%	90,5%	100,0%	
<i>L. welshimeri</i> orfanuc	74,4%	73,7%	77,0%	77,3%	100,0%

G.1.8.: Identitätsmatrix der Aminosäuresequenzdaten des *orfa* Gens

	<i>L. seeligeri</i> orfaas	<i>L. ivanovii</i> orfaas	<i>L. monocytogenes</i> orfaas	<i>L. innocua</i> orfaas	<i>L. welshimeri</i> orfaas
<i>L. seeligeri</i> orfaas	100,0%				
<i>L. ivanovii</i> orfaas	86,4%	100,0%			
<i>L. monocytogenes</i> orfaas	78,0%	78,5%	100,0%		
<i>L. innocua</i> orfaas	79,0%	78,5%	94,5%	100,0%	
<i>L. welshimeri</i> orfaas	75,8%	76,6%	81,9%	81,9%	100,0%

G.2.: Zuordnung der *L. monocytogenes* Stämme in die Entwicklungslinien in Abhängigkeit der verwendeten Berechnungsverfahren und Sequenzfilter

Tabelle G.1.: Einteilung aller untersuchter *L. monocytogenes* Stämme nach vergleichender phylogenetischer Analyse derer *iap*-Gen Sequenzen in die Entwicklungslinien von *L. monocytogenes* in Abhängigkeit der verwendeten Sequenzfilter und des Baumberechnungsverfahrens. (Lmo) = *L. monocytogenes*, ([sv]) = Serovariation, (ML) = „Maximum-Likelihood“, (NJ) = „Neighbor-Joining“, (PA) = „Maximum-Parsimony“, (FI) = „FITCH-Margoliash“, (TN) = TN-„repeat“-Domäne des *iap*-Gens, (k. A.) = keine Auflösung, (*) = Serotyp unsicher

Art	Referenz	Nukleinsäure						Aminosäure					
		mit TN			ohne TN			mit TN			ohne TN		
		ML	NJ	PA	ML	NJ	PA	ML	NJ	FI	ML	NJ	FI
Lmo	SLCC2374	I	I	I	I	I	k. A.	I	I	I	I	I	I
Lmo	TUMLis5	I	I	I	I	I	k. A.	I	I	I	I	I	I
Lmo	TUMLis6	I	I	I	I	I	k. A.	I	I	I	I	I	I
Lmo	IMVW1427	II	II	II	II	II	k. A.	II	II	II	II	II	II
Lmo	IMVW1428	II	II	II	II	II	k. A.	II	II	II	II	II	II
Lmo	IMVW1446	II	II	II	II	II	k. A.	II	II	II	II	II	II
Lmo	IMVW1447	II	II	II	II	II	k. A.	II	II	II	II	II	II
Lmo	IMVW1464	II	II	II	II	II	k. A.	II	II	II	II	II	II
Lmo	IMVW1517	II	II	II	II	II	k. A.	II	II	II	II	II	II
Lmo	IMVW1577	II	II	II	II	II	k. A.	II	II	II	II	II	II
Lmo	IMVW1603	II	II	II	II	II	k. A.	II	II	II	II	II	II
Lmo	IMVW1724	II	II	II	II	II	k. A.	II	II	II	II	II	II
Lmo	IMVW1725	II	II	II	II	II	k. A.	II	II	II	II	II	II
Lmo	IMVW1726	II	II	II	II	II	k. A.	II	II	II	II	II	II
Lmo	IMVW1727	II	II	II	II	II	k. A.	II	II	II	II	II	II
Lmo	IMVW2291	II	II	II	II	II	k. A.	II	II	II	II	II	II
Lmo	IMVW2296	II	II	II	II	II	k. A.	II	II	II	II	II	II
Lmo	IMVW2309	II	II	II	II	II	k. A.	II	II	II	II	II	II
Lmo	IMVW2311	II	II	II	II	II	k. A.	II	II	II	II	II	II
Lmo	IMVW2312	II	II	II	II	II	k. A.	II	II	II	II	II	II
Lmo	IMVW2313	II	II	II	II	II	k. A.	II	II	II	II	II	II
Lmo	IMVW2314	II	II	II	II	II	k. A.	II	II	II	II	II	II
Lmo	IMVW478	II	II	II	II	II	k. A.	II	II	II	II	II	II
Lmo	IMVW479	II	II	II	II	II	k. A.	II	II	II	II	II	II
Lmo	SLCC4013	II	II	II	II	II	k. A.	II	II	II	II	II	II
Lmo	TUMLis7	II	II	II	II	II	k. A.	II	II	II	II	II	II
Lmo	TUMLis8	II	II	II	II	II	k. A.	II	II	II	II	II	II
Lmo	TUMLis9	II	II	II	II	II	k. A.	II	II	II	II	II	II
Lmo	TUMLis10	II	II	II	II	II	k. A.	II	II	II	II	II	II
Lmo	TUMLis11	II	II	II	II	II	k. A.	II	II	II	II	II	II
Lmo Iso1	TUMLis20	II	II	II	II	II	k. A.	II	II	II	II	II	II
Lmo Iso11	TUMLis21	II	II	II	II	II	k. A.	II	II	II	II	II	II
Lmo Iso45	TUMLis23	II	II	II	II	II	k. A.	II	II	II	II	II	II
Lmo Iso46	TUMLis24	II	II	II	II	II	k. A.	II	II	II	II	II	II
Lmo Iso50	TUMLis25	II	II	II	II	II	k. A.	II	II	II	II	II	II

Tabelle G1.: Fortsetzung

Art	Referenz	Nukleinsäure						Aminosäure					
		mit TN			ohne TN			mit TN			ohne TN		
		ML	NJ	PA	ML	NJ	PA	ML	NJ	FI	ML	NJ	FI
Lmo NV4700	TUMLis29	II	II	II	II	II	k. A.	II	II	II	II	II	II
Lmo ScottA	TUMLis32	II	II	II	II	II	k. A.	II	II	II	II	II	II
Lmo	IMVW1302	III	III	III	III	III	k. A.	III	III	III	III	III	III
Lmo	IMVW1433	III	III	III	III	III	k. A.	III	III	III	III	III	III
Lmo	IMVW1436	III	III	III	III	III	k. A.	III	III	III	III	III	III
Lmo	IMVW1449	III	III	III	III	III	k. A.	III	III	III	III	III	III
Lmo	IMVW1454	III	III	III	III	III	k. A.	III	III	III	III	III	III
Lmo	IMVW1516	III	III	III	III	III	k. A.	III	III	III	III	III	III
Lmo	IMVW1602	III	III	III	III	III	k. A.	III	III	III	III	III	III
Lmo	IMVW1630	III	III	III	III	III	k. A.	III	III	III	III	III	III
Lmo	IMVW1632	III	III	III	III	III	k. A.	III	III	III	III	III	III
Lmo	IMVW310	III	III	III	III	III	k. A.	III	III	III	III	III	III
Lmo	IMVW34564	III	III	III	III	III	k. A.	III	III	III	III	III	III
Lmo	IMVW349	III	III	III	III	III	k. A.	III	III	III	III	III	III
Lmo	IMVW351	III	III	III	III	III	k. A.	III	III	III	III	III	III
Lmo	IMVW560	III	III	III	III	III	k. A.	III	III	III	III	III	III
Lmo	IMVW566	III	III	III	III	III	k. A.	III	III	III	III	III	III
Lmo	IMVW567	III	III	III	III	III	k. A.	III	III	III	III	III	III
Lmo	IMVW568	III	III	III	III	III	k. A.	III	III	III	III	III	III
Lmo	IMVW761	III	III	III	III	III	k. A.	III	III	III	III	III	III
Lmo	TUMLis12	III	III	III	III	III	k. A.	III	III	III	III	III	III
Lmo	TUMLis13	III	III	III	III	III	k. A.	III	III	III	III	III	III
Lmo	TUMLis14	III	III	III	III	III	k. A.	III	III	III	III	III	III
Lmo	TUMLis15	III	III	III	III	III	k. A.	III	III	III	III	III	III
Lmo	TUMLis16	III	III	III	III	III	k. A.	III	III	III	III	III	III
Lmo Aachen	TUMLis17	III	III	III	III	III	k. A.	III	III	III	III	III	III
Lmo EGD	TUMLis18	III	III	III	III	III	k. A.	III	III	III	III	III	III
Lmo F-Stamm	TUMLis19	III	III	III	III	III	k. A.	III	III	III	III	III	III
Lmo Iso3	TUMLis22	III	III	III	III	III	k. A.	III	III	III	III	III	III
Lmo LL141	TUMLis26	III	III	III	III	III	k. A.	III	III	III	III	III	III
Lmo LL365	TUMLis27	III	III	III	III	III	k. A.	III	III	III	III	III	III
Lmo LL93	TUMLis28	III	III	III	III	III	k. A.	III	III	III	III	III	III
Lmo R479a	TUMLis30	III	III	III	III	III	k. A.	III	III	III	III	III	III
Lmo R62a	TUMLis31	III	III	III	III	III	k. A.	III	III	III	III	III	III
Lmo V527a	TUMLis33	III	III	III	III	III	k. A.	III	III	III	III	III	III
Lmo V5a	TUMLis34	III	III	III	III	III	k. A.	III	III	III	III	III	III

E: Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von Januar 1998 bis September 2000 am Lehrstuhl für Mikrobiologie der Technischen Universität München unter der Leitung des Ordinarius Herrn Prof. Dr. Karl-Heinz Schleifer angefertigt.

An dieser Stelle gilt mein herzlicher Dank:

Herrn Prof. Dr. Karl-Heinz Schleifer für die Möglichkeit dieses Thema an seinem Lehrstuhl zu bearbeiten, für sein Interesse an der Arbeit, sowie für die Unterstützung und Hilfestellung in vielfacher Hinsicht.

PD Dr. Michael Wagner für viele Freiheiten, unaufhörlich sprudelnde Ideen und die stete Unterstützung mit Diplomanden und Hiwi's.

Meinem alten Freund Michael Klein danke ich für die schönste Zeit sowohl bei den „Chemikern“, als auch bei den „Biologen“ und für seine unglaubliche Ruhe, Gutmütigkeit und Hilfsbereitschaft.

„Meinen Diplomanden“ Justyna Adamczyk, Marion Walcher und Matthias Werner für ihr gezeigtes Engagement und für ihr Durchhaltevermögen mich als Betreuer zu ertragen. Ich hoffe ich konnte euch allen etwas beibringen.

Den „ehemaligen“, Dr. Steppane Juretschko für die angenehme Zeit und den guten Kontakt über den großen Teich und besonders Dr. Aldo Ammendola für die große Hilfe in den letzten Wochen.

Meinen Laborkollegen Herrn Horn, Marit Harzenetterin und Cora Beier für die angenehme Arbeitsatmosphäre, für die gezeigte Hilfsbereitschaft und viel Spaß im 005.

Meiner großen Hilfe, während der letzten Monate, Valerie Albrecht danke ich für den gezeigten Einsatz, ihren großen Fleiß und für ihre Bereitschaft über die Großen und vor allem kleinen Dinge des Lebens so offen zu reden.

Sibylle Schadhauer für ihre unendliche Hilfsbereitschaft und Geduld und für die angenehme Atmosphäre im „SM-Labor“, Jutta Elgner für die geleistete Hilfe, sowie Beate Schumacher für ihr gutes Herz und für viele interessante Diskussionen, wie der Feind „LiCor“ am besten zu bezwingen wäre.

DANKSAGUNG

„Catering-service“ Dr. Natuschka Lee für viele motivierende und aufmunternde Worte an den langen Wochenenden und für ihre Hingabe nach meinem Mensaboykott mich unaufhaltsam mit Leckereien zu versorgen.

Den Rest der „Wagners“, Markus Schmid, Holgi Daims, Alex Loy, Uli Purkhold und natürlich Andi Brühl für ihre Hilfsbereitschaft und für nette Stunden auch außerhalb des Labors.

Dr. Wolfgang Ludwig für seine ehrliche, bodenständige Art „*Was wuist denn, I hob jetzt koa Zeit, dann hock di hoit doch her*“, ebenso den „Ludwigs“ Andre Mehlen, Johannes Zimmermann, Katrin Zwirgelmeier, Thomas Behr, Johannes Fried und Dr. David Arahal für die guten Kontakte zum „dritten“ Stock und für den gelegentlichen Blick ins Bierglas.

Dr. Leo Eberl und seinem Team, Astrid Gotschlich, Anette Steidle, Birgit Huber und besonders meinen „*Salmonella*“-Partner Herrn Otto Geisenberger für nette Unterhaltungen und die gute Labornachbarschaft.

Josef Reischenbeck für die schnelle und zuverlässige Anfertigung fast unerfüllbarer Wünsche, die uns allen den Laboralltag sehr erleichterten.

Dr. Martin Wagner, Dr. Angelika Lehner und Prof. Dr. Ernst Brandl vom Institut für Milchhygiene und Milchtechnologie der Veterinärmedizinischen Universität Wien für die angenehme Zeit während meines Aufenthalts in Wien und für die prompte Versorgung mit *L. monocytogenes* und *Campylobacter* Stämmen.

Dr. Andreas Bubert und Prof. Dr. Werner Goebel vom Theodor-Boveri-Institut für Biowissenschaften in Würzburg für die nette Aufnahme während meines Aufenthalts.

Dr. Harald Meier für seine ehrliche Art zu diskutieren und mir seine Meinung zu sagen und für den großzügigen „*Campylobacter-support*“, sowie Dr. Ingrid Huber für den guten Kontakt über den Öresund hinweg und ihr unermüdliches bestreben Listerien wieder zum Leben zu erwecken.

Mein aufrichtiger Dank gilt meinen Eltern Frau Helga und Herrn Herbert Schmid, die mir durch ihre großzügige Unterstützung und stete Hilfe meine Ausbildung erst ermöglichten.

Nicht zuletzt möchte ich mich besonders bei all meinen Freunden bedanken, die ich in letzter Zeit sehr vernachlässigt habe, die aber immer zu mir gestanden haben und mich immer wieder zum durchhalten ermutigt haben. Vergelt`s Gott.

Ich habe fertig !