

Lehrstuhl für Mikrobiologie  
der Technischen Universität München

**Auswirkungen stammspezifischer Unterschiede  
auf Ökologie und Virulenz  
von *Listeria monocytogenes***

**Marion Walcher**

Vollständiger Abdruck der von der  
Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan  
für Ernährung, Landnutzung und Umwelt  
der Technischen Universität München  
zur Erlangung des akademischen Grades eines

**Doktors der Naturwissenschaften**

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. Wolfgang Höll

Prüfer der Dissertation: 1. Priv.-Doz. Dr. Michael Wagner  
2. Univ.-Prof. Dr. Rudi F. Vogel

Die Dissertation wurde am \_\_\_\_\_ bei der Technischen Universität München  
eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung,  
Landnutzung und Umwelt am \_\_\_\_\_ angenommen.

---

# Inhaltsverzeichnis

<b>A</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>A.1</b>	<b><i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i></b>	<b>1</b>
	A.1.1 Stammunterschiede bei <i>L. monocytogenes</i>	6
	A.1.2 Überleben von <i>L. monocytogenes</i> in der Umwelt	8
<b>A.2</b>	<b>AMÖBEN ALS ÜBERTRAGUNGSVEHIKEL FÜR (FAKULTATIV) INTRAZELLULÄRE BAKTERIEN</b>	<b>9</b>
<b>A.3</b>	<b>ZIELE DIESER ARBEIT</b>	<b>12</b>
<b>B</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>13</b>
<b>B.1</b>	<b>VERWENDETE TECHNISCHE GERÄTE</b>	<b>13</b>
<b>B.2</b>	<b>VERWENDETE ORGANISMEN</b>	<b>14</b>
<b>B.3</b>	<b>NÄHRMEDIEN UND PUFFER</b>	<b>15</b>
	B.3.1 Medien und Puffer für die Anzucht der Amöben	15
	B.3.2 Medien zur Anzucht der Bakterien	16
	B.3.3 Medien und Puffer für die Anzucht von Säugerzellen	16
<b>B.4</b>	<b>KULTIVIERUNG UND STAMMHALTUNG</b>	<b>17</b>
	B.4.1 Kultivierung und Stammhaltung der Acanthamöben	17
	B.4.2 Stammhaltung der Bakterien	17
	B.4.3 Stammhaltung von Säugerzelllinien	18
<b>B.5</b>	<b>HERSTELLUNG VON INFEKTIONSALIQUOTS</b>	<b>19</b>
<b>B.6</b>	<b>ZELLZAHLBESTIMMUNG VON AMÖBEN- UND SÄUGERZELLEN</b>	<b>20</b>
<b>B.7</b>	<b>INFEKTIONSSTUDIEN MIT <i>ACANTHAMOEBA</i> SPP.</b>	<b>20</b>
	B.7.1 Infektion der Acanthamöben	20
	B.7.2 Zellernte und Zellzahlbestimmung von Amöben und Bakterien	21
	B.7.3 Untersuchung des Einflusses von Amöben auf die Gentamicin-Wirkung	24
<b>B.8</b>	<b>INFEKTION VON SÄUGERZELLEN MIT <i>L. MONOCYTOGENES</i></b>	<b>25</b>
	B.8.1 Bestimmung von intrazellulären <i>L. monocytogenes</i> -Zellzahlen in Säugerzellen	25
	B.8.2 Bestimmung der Adhäsion von Listerien an die Wirtszellen	26
<b>B.9</b>	<b>BESTIMMUNG DER HÄMOLYSEAKTIVITÄT VON <i>L. MONOCYTOGENES</i></b>	<b>27</b>
<b>B.10</b>	<b>BESTIMMUNG DER UMWELTPERSISTENZ VON <i>L. MONOCYTOGENES</i></b>	<b>27</b>

---

---

<b>B.11</b>	<b>IN SITU-DETEKTION VON INTRAZELLULÄREN BAKTERIEN IN AMÖBEN MITTELS FLUORESZENZMIKROSKOPIE</b>	<b>29</b>
	B.11.1 Fixierung und Immobilisierung von Amöbenzellen auf Objektträgern / Deckgläschen	29
	B.11.2 Nachweis von intrazellulären Bakterien in Acanthamöben mit Hilfe des DNS-Farbstoffes DAPI	30
	B.11.3 Detektion intrazellulärer Bakterien mittels konfokaler Laser Scanning Mikroskopie	31
<b>B.12</b>	<b>TRANSMISSIONSELEKTRONENMIKROSKOPIE</b>	<b>31</b>
	B.12.1 Fixierung und Einbettung für die Transmissionselektronenmikroskopie	31
	B.12.2 Ultramikrotomie, Kontrastierung und Transmissionselektronenmikroskopie	32
<b>B.13</b>	<b>ISOLIERUNG VON DNS</b>	<b>33</b>
<b>B.14</b>	<b>ISOLIERUNG VON RNS</b>	<b>34</b>
	B.14.1 RNS-Isolierung nach Oelmüller <i>et al.</i> (1990), modifiziert	35
	B.14.2 Isolierung von RNS mit dem Bead Beater	36
<b>B.15</b>	<b>DNASE-VERDAU</b>	<b>37</b>
<b>B.16</b>	<b>RNASE-VERDAU</b>	<b>37</b>
<b>B.17</b>	<b>REVERSE-TRANSKRIPTASE-REAKTION ZUM NACHWEIS VON BOTEN-RNS</b>	<b>38</b>
	B.17.1 Prinzip der RT-PCR	38
	B.17.2 Kontrollreaktionen	38
	B.17.3 Verwendete Primer	39
	B.17.4 Standardansatz und Reaktionsführung für die Durchführung der RT-PCR	39
<b>C</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>41</b>
<b>C.1</b>	<b>LISTERIEN-INFEKTIONSSTUDIEN MIT ACANTHAMÖBEN</b>	<b>41</b>
	C.1.1 Einfluss von <i>L. monocytogenes</i> auf die Amöbenzellzahl	41
	C.1.2 Optimierung und Evaluierung des Infektionsassays	42
	C.1.2.1 Bestimmung der optimalen „multiplicity of infection“ (MOI)	42
	C.1.2.2 Bestimmung der bakteriziden Konzentration an Gentamicin zur vollständigen Abtötung aller extrazellulären Bakterien	44
	C.1.2.3 Einfluss von Acanthamöben auf die bakterizide Wirkung von Gentamicin	45
	C.1.2.4 Untersuchungen zur intrazellulären Vermehrung von <i>L. monocytogenes</i> in Acanthamöben	48
	C.1.2.5 <i>Enterobacter aerogenes</i> als Negativkontrolle	51

---

C.1.3	Anwendung des Assays	52
C.1.3.1	<i>L. monocytogenes</i> EGD in Acanthamöben	52
C.1.3.2	Temperaturabhängigkeit der Persistenz von <i>L. monocytogenes</i> in Acanthamöben	53
C.1.3.3	Verhalten von Vertretern der drei Genotypen in Acanthamöben	53
C.1.3.4	Einfluss listerieller Virulenzgene auf das Überleben in Acanthamöben	54
C.1.4	Mikroskopische Untersuchungen zum Nachweis der intrazellulären Lokalisation von <i>L. monocytogenes</i> in Amöbenzellen	56
<b>C.2</b>	<b>UMWELTEINFLÜSSE AUF DIE EXPRESSION LISTERIELLER VIRULENZGENE UND DAS ÜBERLEBEN VON <i>L. MONOCYTOGENES</i> IN DER UMWELT</b>	<b>59</b>
C.2.1	Untersuchungen zur Expression von Virulenzgenen in <i>L. monocytogenes</i>	59
C.2.1.1	Etablierung der RT-PCR für <i>L. monocytogenes</i> anhand des konstitutiv transkribierten <i>iap</i> -Gens	59
C.2.1.2	Expression des Virulenzfaktors <i>plcB</i> aus <i>L. monocytogenes</i>	61
C.2.2	Untersuchungen zur Persistenz von <i>L. monocytogenes</i> in der Umwelt	63
<b>C.3</b>	<b>STAMMSPEZIFISCHE UNTERSCHIEDE DER DREI <i>L. MONOCYTOGENES</i>-GENOTYPEN IN VIRULENZ UND WIRTSZELLSPEZIFITÄT</b>	<b>65</b>
C.3.1	Bestimmung der Hämolyseaktivität von <i>L. monocytogenes</i>	67
C.3.2	Infektionsstudien mit Säuger-Zelllinien	68
C.3.2.1	Vermehrung der <i>L. monocytogenes</i> -Stämme in Tib 73- Hepatocyten	68
C.3.2.2	Vermehrung der <i>L. monocytogenes</i> -Stämme in J774- Makrophagen	69
C.3.2.3	Vermehrung der <i>L. monocytogenes</i> -Stämme in Caco-2- Endothelzellen	70
C.3.2.4	Unterscheidung zwischen Adhäsions- und Invasions- bzw. intrazellulärem Verhalten mittels Zugabe von Cytochalasin D	72

---

## **D DISKUSSION** **75**

<b>D.1</b>	<b>INTERAKTIONEN VON <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i> MIT <i>ACANTHAMOEBA</i> SP.</b>	<b>75</b>
D.1.1	Einfluss von <i>L. monocytogenes</i> auf die Zahl der Amöbenzellen	75
D.1.2	Überleben von <i>L. monocytogenes</i> EGD-e in Acanthamöben	76
D.1.3	Probleme bei der Entwicklung des Assays	77
D.1.3.1	Kontrolle der Wirksamkeit des Antibiotikums Gentamicin für die Abtötung aller extrazellulär vorhandener Bakterien	77
D.1.3.2	Kontrolle auf Vermehrungsfähigkeit von intrazellulären <i>L. monocytogenes</i> in Acanthamöben durch die Entfernung von extrazellulären Bakterien	79
D.1.3.3	Einfluss der MOI auf die Zahl der überlebenden <i>L. monocytogenes</i> -Zellen	81
D.1.4	Einfluss von Virulenzgenen und stammspezifischen Unterschieden auf das Überleben von <i>L. monocytogenes</i> in Acanthamöben	83
D.1.4.1	Vermehrung verschiedener <i>L. monocytogenes</i> -Stämme in Acanthamöben	83
D.1.4.2	Der Einfluss von Virulenzgenen auf das Überleben in Acanthamöben	84
D.1.5	Mikroskopische Untersuchung der intrazellulären Persistenz von <i>L. monocytogenes</i> in Acanthamöben	86
D.1.6	Zusammenfassende Betrachtungen und Ausblick	88
<b>D.2</b>	<b>ENCLOSURE-EXPERIMENTE ZUR UNTERSUCHUNG DER UMWELTPERSISTENZ VON <i>L. MONOCYTOGENES</i></b>	<b>89</b>
<b>D.3</b>	<b>IN VITRO INFEKTIONSSTUDIEN MIT SÄUGERZELLINIEN</b>	<b>90</b>
D.3.1	Die pathogenen Eigenschaften von <i>L. monocytogenes</i> -Geno- und Serotypen	90
D.3.2	Die Funktion listerieller Virulenzgene und deren eventuelle Beteiligung an der Attenuation bestimmter Stämme	91
D.3.3	Auswirkungen der Attenuation in Endothelzellen auf die Entwicklung einer systemischen Listeriose	94

---

## **E ZUSAMMENFASSUNG** **97**

---

## **F LITERATURVERZEICHNIS** **99**

## Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Amp	Ampicillin
atm	Atmosphäre
ATP	Adenosintriphosphat
b	Basen
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin, Kohlenstoff
ca.	circa
CLSM	Konfokales Laserscanningmikroskop
CTP	Cytosintriphosphat
Da	Dalton
dest	destilliert
DIG	Digoxigenin
DIG-11-UTP	Digoxigenin-11-Uridin-5'-triphosphat
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNase	Desoxyribonuklease
DNS / DNA	Desoxyribonukleinsäure
ds	double stranded, doppelsträngig
E.	<i>Escherichia</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ERG	Eppendorfreaktionsgefäß
et al.	et alteri
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH <sub>abs</sub>	96% Ethanol, unvergällt
FA	Formamid
g	Fallbeschleunigung, Gramm
G	Guanin
GC	mol% Guanin + Cytosin
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
k	kilo (10 <sup>3</sup> )
KBE	Koloniebildende Einheiten
L.	Listeria
LD <sub>50</sub>	Letale Dosis eines Stoffes bzw. Krankheitserregers, bei der 50% der Versuchstiere sterben
μ	Mikro (10 <sup>-6</sup> )
m	Milli (10 <sup>-3</sup> ), Meter
M	Molar (mol/l)
MLEE	multilocus enzyme electrophoresis
min	Minute
ml	Milliliter
mRNS	messenger (Boten-) Ribonukleinsäure
n	Nano (10 <sup>-9</sup> )
nm	Nanometer
OD <sub>x</sub>	Optische Dichte, gemessen bei einer Wellenlänge von x nm
orf	open reading frame (offener Leserahmen)

---

p.a.	pro analysi
p.i.	post infectionem (Zeitpunkt nach Zugabe von Bakterien zu einem Infektionsansatz)
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphate buffered Saline (phosphatgepufferte Kochsalzlösung)
PCR	Polymerase chain reaction, Polymerasekettenreaktion
PFA	p-Formaldehyd
PFGE	pulsed field gel electrophoresis
POD	Meerrettich-Peroxidase
RAPD	random amplification of polymorphic DNA
REA	Restriction Enzyme Analysis
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
RNase	Ribonuklease
RNS	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
rRNS	ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
S	Svedberg (s-1)
SDS	Natriumdodecylsulfat
ss	single stranded, einzelsträngig
SSC	Standard-Saline-Citrat
sv	Serovar
T	Thymidin
Taq	DNS-abhängige DNS-Polymerase aus <i>Thermus aquaticus</i>
TD	Dissoziationstemperatur
TEM	Transmissionselektronenmikroskop
TM	Schmelztemperatur
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan
u	units, Einheiten
U	uracil
ün	über Nacht
UTP	Uraciltriphosphat
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen/Volumen
vol.	Volumenanteile
WHO	World Health Organisation, Weltgesundheitsorganisation
w/v	weight/volume, Masse/Volumen

---

---

## A Einleitung

### A.1 *Listeria monocytogenes*

Sucht man unter den pathogenen Mikroorganismen Modellorganismen zur Untersuchung von Virulenzmechanismen, so stößt man mit auf die Art *Listeria monocytogenes*. *L. monocytogenes* kann durchaus als der *E. coli* unter den intrazellulären Krankheitserregern betrachtet werden, da anhand dieses Bakteriums das intrazelluläre Verhalten pathogener Organismen im Allgemeinen sowie Gram-positiver im Speziellen aufgeklärt werden konnte (Kuhn & Goebel, 1995). Listerien wurden bereits in den zwanziger Jahren von E.G.D. Murray aus erkrankten Hasen in Reinkultur isoliert, von ihm aber zunächst als *Bacterium monocytogenes* bezeichnet (Murray *et al.*, 1926). Drei Jahre später, im Jahr 1929, wurden zum ersten Mal Infektionen im Menschen auf *L. monocytogenes* zurückgeführt und somit ein klarer Bezug zu den ausgelösten Symptomen hergestellt (Nyfelt, 1929). Erst zu Beginn der 80er Jahre wurde die tatsächliche Bedeutung von *L. monocytogenes* als pathogener Organismus durch eine Verbesserung der Nachweismöglichkeiten erkannt, da zahlreiche Epidemien in Nordamerika und Europa auf diesen Organismus zurückgeführt werden konnten (Fleming *et al.*, 1985; Linnan *et al.*, 1988; McLauchlin, 1987; McLauchlin *et al.*, 1989; McLauchlin *et al.*, 1991). Seither versuchen eine Reihe von Wissenschaftlern, Ökologie, Epidemiologie und Virulenz dieses Erregers aufzuklären.

Die Gattung *Listeria* wird phylogenetisch den Gram-positiven Organismen mit niedrigem G+C-Gehalt zugeordnet (Ludwig *et al.*, 1984; Woese, 1987). Ihr gehören die sechs Arten *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, *L. innocua*, *L. welshimeri* und *L. grayi* an, von denen mit *L. monocytogenes* und *L. ivanovii* nur zwei säugerpathogen sind. *L. monocytogenes* ist der einzige humanpathogene Vertreter (Jones und Seeliger, 1992). Listerien haben ein sehr breites Temperaturspektrum, innerhalb dessen sie noch zur Zellteilung befähigt sind. Die obere Temperaturgrenze liegt bei ca. 42°C, und sogar bei 1°C wurde noch Vermehrung beobachtet (Farber, 1989). Aufgrund ihrer Fähigkeit, sich in

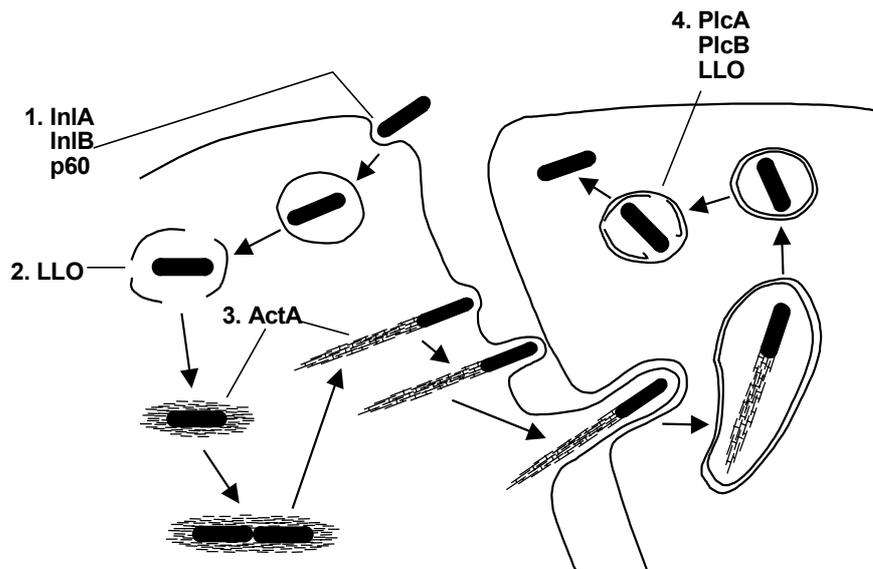
---

---

gekühlten Lebensmitteln zu vermehren, gehören Listerien neben zahlreichen anderen Lebensmittelverderbern zur sogenannten „Kühlschrankflora“. Ein erhebliches Infektionsrisiko geht daher von kontaminierten Lebensmitteln aus, und Verunreinigungen mit Listerien stellen ein schwerwiegendes Problem in der lebensmittelverarbeitenden Industrie dar (Norton *et al.*, 2001a; Norton *et al.*, 2001b; Tompkin, 2002). Aus diesem Grund werden die Listerien der Gruppe der „food-borne pathogens“ zuordnet. Listerien sind nur bei Temperaturen bis zu 24°C durch Flagellen beweglich (Jones und Seeliger, 1992) und verlieren ihre Beweglichkeit bei erhöhten Temperaturen, so dass sie im menschlichen Körper unbeweglich sind (s.u.).

Vor allem für immunsupprimierte Patienten sowie ältere Personen oder Kleinkinder geht eine Infektion mit *L. monocytogenes* oft mit schwerwiegenden gesundheitlichen Beeinträchtigungen einher. So kann dieser Organismus einfache gastrointestinale Symptome, die meistens mit Fieber und Erbrechen verbunden sind, hervorrufen (Hof, 1990), sich aber auch systemisch im gesamten Körper ausbreiten (Bizet und Rocourt, 1988; Jurado *et al.*, 1993) und sogar die Blut-Hirn-Schranke sowie die Plazenta passieren (Drevets, 1999; Spencer, 1987). Eine Infektion manifestiert sich oft in einer Gehirnentzündung wie Meningitis bzw. Meningoenzephalitis (Barlow und McGorum, 1985; Durand *et al.*, 1993), aber es können auch weitere Organe wie Leber oder Milz befallen sein (Vásquez-Boland *et al.*, 2001). Für das ungeborene Kind kann eine Infektion durch *L. monocytogenes* sogar tödlich verlaufen. Oft treten bei der Schwangeren keine oder nur leichte grippale Symptome auf, weshalb eine solche Infektion meistens nicht erkannt oder fehlgedeutet wird (Hof, 1990). Infizierte Föten hingegen werden oft tot geboren bzw. sterben kurz nach der Geburt. Aufgrund des noch nicht entwickelten, frühkindlichen Immunsystems ist es für die Listerien ein Leichtes, sich im gesamten Körper auszubreiten und sämtliche Organe des ungeborenen Kindes zu infizieren. Abszesse an Leber, Nieren, Lunge, Milz, Gehirn und der Haut des Embryos sind die Folge (Larsson *et al.*, 1979; Southwick und Purich, 1996; Spencer, 1987). Man spricht hier von der sogenannten *Granulomatosis infantiseptica*.

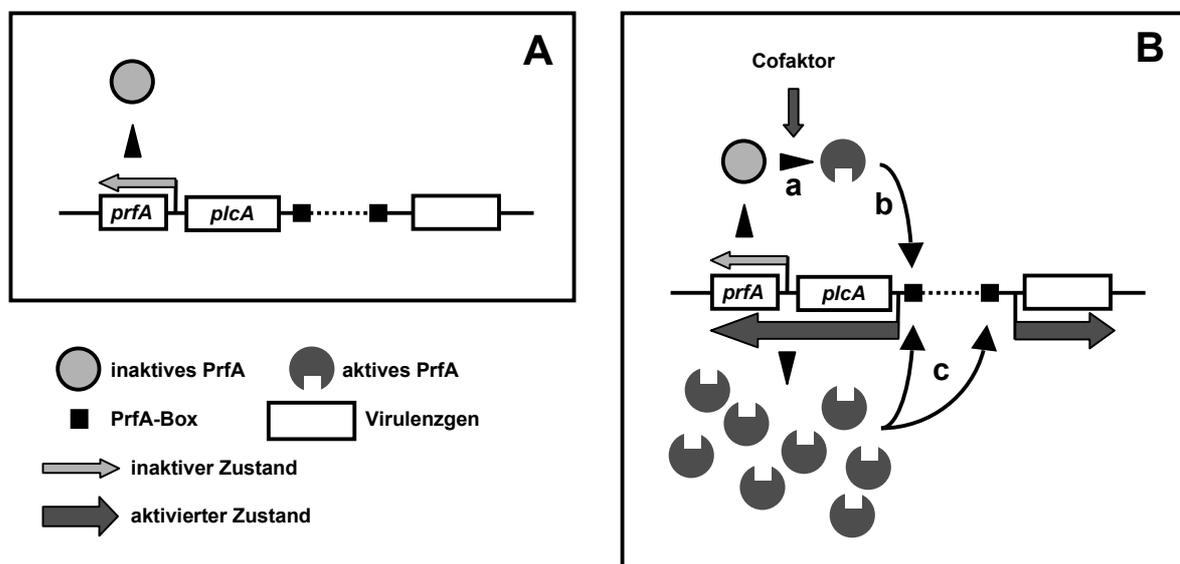
Pathogene Vertreter der Gattung *Listeria* – *L. monocytogenes* und *L. ivanovii* – können intrazellulär in einer Reihe von Säugerzellen überleben. Sogar nicht-phagozytische Zellen wie Epithel- und Endothelzellen nehmen die Bakterien auf (Gaillard *et al.*, 1987; Schlech, 1984; Schlech *et al.*, 1994). Durch die Aktivität der sogenannten Internaline (kodiert durch die *inl*-Gene), die, soweit bekannt, durch ein spezifisches Wirtszellspektrum charakterisiert sind, heften sich die Listerien an die Wirtszellmembran an und werden durch Phagozytose aufgenommen. Ein weiteres Protein (p60), kodiert durch das *iap*-Gen, ist ebenfalls an der Anlagerung an die Wirtszelle beteiligt. Einmal im Phagosom, lysieren die Listerien die Phagosomenmembran durch ein zelleigenes Hämolyisin, das Listeriolysin O (*hly*), und vermehren sich anschließend frei im Cytosol der Wirtszelle. Aufgrund ihrer Unbeweglichkeit bei 37°C haben die Listerien ein ausgeklügeltes System zur Fortbewegung im Cytosol der Wirtszellen entwickelt. Das ActA-Protein (*actA*) polymerisiert an einem Pol der Bakterienzelle Aktinmonomere. Durch die ständige Anheftung eines neuen Monomers an die bereits entstandenen Aktinpolymere, die aufgrund ihres Aussehens auch als Kometenschweif bezeichnet werden, wird ein Vorschub erzeugt, der die Bakterien regelrecht durch die Wirtszelle katapultiert. Somit gelangen einzelne Listerien auch an den Rand der Zelle und werden durch die Entstehung pseudopodienähnlicher Strukturen in die benachbarte Zelle geschoben. Die Pseudopodien werden abgeschnürt und formen eine Vakuole in der neuen Zelle, in der die Bakterien dann von einer Doppelmembran umgeben sind. Der Infektionszyklus wird anschließend von einer Phosphatidylcholin- sowie einer Phosphatidylinositol-spezifischen (Lecithinase) Phospholipase C (*plcB/A*) geschlossen, die zusammen mit dem Listeriolysin O die umgebende Doppelmembran zerstören und so zur Freisetzung der Listerien im Cytosol der neuen Wirtszelle führen (Abb. 1).



**Abb. 1:**  
 Infektionszyklus von  
*L. monocytogenes*  
 (nach Tilney und  
 Portnoy, 1989)

Betrachtet man den komplizierten intrazellulären Lebenszyklus von *L. monocytogenes* und die Vielzahl der daran beteiligten Proteine, wird ersichtlich, dass alle diese Gene einer komplexen Regulation unterliegen müssen, die bisher nicht bis ins Detail geklärt werden konnte. Bis auf die Internaline und das *iap*-Gen befinden sich alle Virulenzgene zusammen mit einer Metalloprotease, die für die proteolytische Prozessierung der Lecithinase verantwortlich ist (Poyart *et al.*, 1993), auf einem 9 kb großen Virulenzgencluster. Mit Ausnahme des *iap*-Gens sind alle Gene zumindest teilweise PrfA-reguliert. PrfA ist in geringen Mengen konstitutiv vorhanden und hält durch die Aktivierung des eigenen Promotors die Transkription von *prfA* aufrecht (Bohne *et al.*, 1996; Bohne *et al.*, 1994; Freitag *et al.*, 1993; Renzoni *et al.*, 1997). Durch umgebungsbedingte Faktoren wird die Transkription von *prfA* durch die Bindung an einen weiteren Promotor, der ein bicistronisches Transkript aus *plcA* und *prfA* liefert, erhöht. Welche Faktoren für diese Aktivierung verantwortlich sind, konnte bis heute nicht im Detail geklärt werden. Mehr und mehr Anzeichen deuten auf eine komplexe Regulation in Abhängigkeit von diversen physikalisch-chemischen Parametern hin, die zwischen parasitischem und saprophytischem Lebensstil unterscheiden lassen. Eine besonders wichtige Variable ist in diesem Zusammenhang die Temperatur, da die Transkription PrfA-regulierter Gene bei Temperaturen unter 30°C reprimiert, bei 37°C hingegen aktiviert ist (Datta und Kothary, 1993; Leimeister-Wächter *et al.*,

1992). Zusätzlich spielt die chemische Zusammensetzung des umgebenden Mediums eine bedeutende Rolle. Eisenmangel bzw. das Vorhandensein von Zuckerphosphaten in intrazellulären Kompartimenten der Wirtszelle könnten zur Expression listerieller Virulenzgene führen (z.B. Conte *et al.*, 1996; Geoffroy *et al.*, 1987; Litwin und Calderwood, 1993), wohingegen in Vollmedium diese Expression verhindert wird. Der hier zugrunde liegende Regulationsmechanismus beruht wahrscheinlich auf einer Katabolitrepression durch fermentierbare Zucker (Milenbachs *et al.*, 1997). Es bestehen zudem Unterschiede in der Expression einzelner Virulenzgene, die auf der Affinität des jeweiligen Promotors für PrfA gründen und eine differentielle Expression der benötigten Virulenzfaktoren bewirken. So hat z.B. die sogenannte PrfA-Box des *actA*-Promotors im Gegensatz zu perfekt symmetrischen Palindromen, wie das beispielsweise beim *hly* oder *plcA*-Gen der Fall ist, signifikante Basenfehlpaarungen zur Erkennungssequenz. Der Promotor wird demnach erst bei extrem hohen PrfA-Konzentrationen aktiviert, wie sie im Infektionsverlauf erst nach Freisetzung ins Cytoplasma beobachtet werden (Bubert *et al.*, 1999). Die PrfA-regulierte Transkription ist schematisch in Abb. 2 dargestellt.



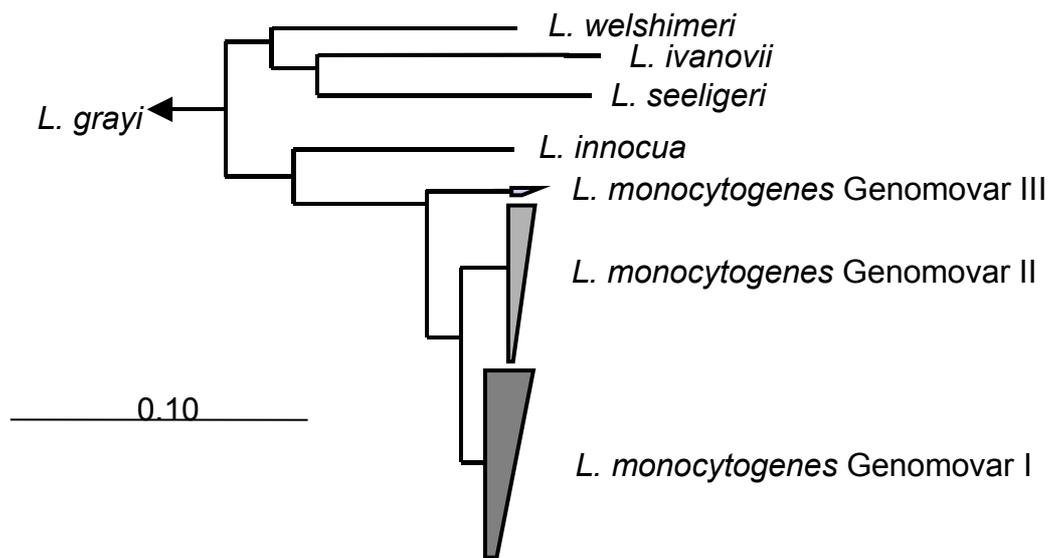
**Abb. 2:** Modell der PrfA-abhängigen Regulation listerieller Virulenzgene (nach Vega *et al.*, 1998)  
**A:** *prfA* wird durch eine autoregulatorische Schleife in geringen Mengen und zudem in inaktiver Form produziert. **B:** Durch den Einfluss eines oder mehrerer extrazellulärer Stimuli kommt es zu einer Aktivierung (a) und gleichzeitig erhöhten Transkription (b) von PrfA über das bicistronische *plcA-prfA*-Transkript. Aktiviertes PrfA bindet an die PrfA-Boxen (c) und induziert die Expression der PrfA-abhängigen Virulenzgene.

---

Eine Reihe von essentiellen Virulenzgenen, die bereits im extrazellulären Milieu benötigt werden, steht sogar nicht oder nur teilweise unter der Kontrolle von PrfA. Die Transkription des *inlAB*-Operons (kodierend für die Internaline A und B) unterliegt etwa einer komplexen Regulation über drei verschiedene Promotoren. Zwei dieser Promotoren sind nicht PrfA-abhängig und der dritte bewirkt auch bei hohen PrfA-Konzentrationen aufgrund niedriger Affinität zu PrfA kaum eine Erhöhung der *inlAB*-Expression (Bohne *et al.*, 1996; Dramsi *et al.*, 1993; Sheehan *et al.*, 1995). Internaline werden im Unterschied zu intrazellulär benötigten Virulenzfaktoren auch in Vollmedium und bei hohen Eisenkonzentrationen gebildet. Die Regulationsmechanismen, die der PrfA-unabhängigen Expression von Virulenzgenen zugrunde liegen, sind jedoch bis heute nicht bekannt.

#### **A.1.1 Stammunterschiede bei *L. monocytogenes***

Die Art *L. monocytogenes* kann aufgrund genetischer und phänotypischer bzw. biochemischer Merkmale in zahlreiche Subtypen unterteilt werden. Ein gängiges Verfahren ist in diesem Zusammenhang die Methode der Serotypisierung (Seeliger und Höhne, 1979). Hier lassen sich 13 *L. monocytogenes*-Serotypen unterscheiden, wohingegen mittels weiterer Typisierungsmethoden (z.B. Phagentypisierung) eine bedeutend genauere Auflösung mit bis zu 80 Phagovaren erreicht werden kann (McLauchlin *et al.*, 1996). Limitierend ist in diesen Fällen die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse, da beide Methoden die Verwendung standardisierter Reagenzien sowie den Einsatz besonders geschulten Personals voraussetzen (McLauchlin *et al.*, 1996; Schönberg *et al.*, 1996). Mit Hilfe von vergleichender Sequenzanalyse kann man drei *L. monocytogenes*-Genotypen unterscheiden (Abb. 3). Für eine Subklassifizierung von *L. monocytogenes* wurden zahlreiche Funktions-, Struktur- und Virulenzgene (*iap*, *hly*, *plcA/B*, *flaA*, *actA*, *inlA*) der Gattung *Listeria* und besonders der Art *L. monocytogenes* herangezogen und mittels vergleichender Sequenzanalyse charakterisiert (Rasmussen *et al.*, 1995; Schmid *et al.*, 2002; Vines und Swaminathan, 1998; Wiedmann *et al.*, 1997).



**Abb. 3:** Auf *iap*-Gen-Nukleinsäuresequenzen basierendes Dendrogramm aller *Listeria* spp. Aufgezeigt wird hier die Klassifizierung von *L. monocytogenes* in drei Entwicklungslinien. Der Balken entspricht einer Sequenzhomologie von 10% (nach Schmid *et al.*, 2002)

Die drei beschriebenen Entwicklungslinien werden auch bei Untersuchungen des gesamten Genoms bzw. Proteoms gefunden. Hierzu geben unterschiedliche Bandenmuster Aufschluss, die mittels Pulsed-Field-Gelelektrophorese nach vorangegangenem Restriktionsverdau mit einem geeigneten Restriktionsenzym bzw. Multilocus-Enzymelektrophorese ermittelt werden (Bibb *et al.*, 1989; Boerlin und Piffaretti, 1991; Boerlin *et al.*, 1991; Brosch *et al.*, 1996; Brosch *et al.*, 1994; Buchrieser *et al.*, 1993; Caugant *et al.*, 1996; Harvey und Gilmour, 1994; Louie *et al.*, 1996).

Epidemiologische Daten deuten näherungsweise auf Unterschiede im pathogenen Verhalten der drei Entwicklungslinien hin, da die meisten Stämme, die mit einer Listeriose-Erkrankung oder -Epidemie in Verbindung gebracht wurden, zu den Linien I und II fallen, während Isolate aus der Umwelt öfter in Genotyp III zu finden sind (Rasmussen *et al.*, 1991; Vines und Swaminathan, 1997; Wiedmann *et al.*, 1997). Die Bedeutung der drei Genotypen hinsichtlich der Virulenz von *L. monocytogenes*-Stämmen ist jedoch bis heute nicht genauer untersucht worden. Wiedmann *et al.* (Wiedmann *et al.*, 1997) versuchten, mit Hilfe eines Plaque-Assays in Mauszellversuchen Unterschiede in der Cytopathogenität der drei Entwicklungslinien zu finden, konnten aber die ermittelten Plaque-Größen

---

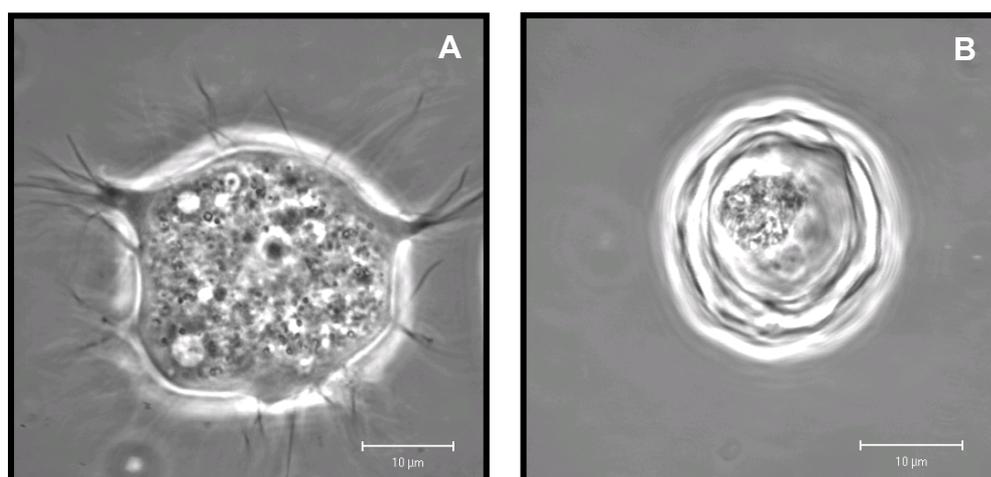
nicht eindeutig einem bestimmten Genotyp zuweisen. Unterschiede im pathogenen Verhalten einzelner *L. monocytogenes*-Stämme sind jedoch schon seit längerem bekannt. Zahlreiche Studien, die sowohl auf Tierversuchsmodellen als auch auf Zellkulturstudien basieren, belegen deutliche Virulenzunterschiede innerhalb der Art *L. monocytogenes*, konnten aber keine Korrelation zu den drei beschriebenen Entwicklungslinien aufzeigen (Barbour *et al.*, 1996; Barbour *et al.*, 2001; Sokolovic *et al.*, 1996). Aufgrund epidemiologischer Daten wird vor allem *L. monocytogenes* sv 1/2a, 1/2b und 4b eine deutlich erhöhte Virulenz im Vergleich zu anderen Serotypen zugeschrieben (Farber und Peterkin, 1991; Gellin und Broome, 1989; Schuchat *et al.*, 1991). Besonders *L. monocytogenes* sv 4b scheint ein hochvirulenter Vertreter der Art *L. monocytogenes* zu sein, da alle größeren *L. monocytogenes*-Epidemien der letzten zwei Jahrzehnte ausschließlich auf diesen Serotyp zurückzuführen sind (Mead *et al.*, 1999).

### **A.1.2 Überleben von *L. monocytogenes* in der Umwelt**

Vertreter der Gattung *Listeria* können aus verschiedensten Habitaten isoliert werden. Vor allem die bereits erwähnten Lebensmittel sind oftmals ein Auslöser für *L. monocytogenes*-Infektionen (Harvey und Gilmour, 1993; Ryser und Marth, 1988; Ryser und Marth, 1989). Darüber hinaus befinden sich Listerien in signifikanten Mengen in Boden, Süßwasser oder Belebtschlamm (Geuenich *et al.*, 1985; Geuenich und Müller, 1984; Watkins und Sleath, 1981; Welshimer, 1968). Ihr breites Temperaturspektrum lässt sie auch starke Temperaturschwankungen überstehen. Langzeitversuche ohne die Zugabe von Nährstoffen ergaben erstaunlich lange Überdauerungszeiten, auch nach einer langen Hungerphase war die Lebendzellzahl nicht signifikant erniedrigt (Herbert und Foster, 2001). Daher ist die Untersuchung der Umweltpersistenz einzelner *L. monocytogenes*-Stämme sowie ihrer Fähigkeit zur Vermehrung in Lebensmitteln und des damit verbundenen Gesundheitsrisikos von großem Interesse. Besonders in Boden oder Belebtschlamm sind Listerien mit einer großen Menge an Protozoenzellen wie z.B. *Acanthamoeba* spp. konfrontiert. Die Bedeutung von Amöben als Träger und damit auch Überträger pathogener Mikroorganismen wurde bereits in zahlreichen Studien aufgezeigt und soll nachfolgend genauer dargestellt werden.

## A.2 Amöben als Übertragungsvehikel für (fakultativ) intrazelluläre Bakterien

Protozoen, die der Gattung *Acanthamoeba* angehören, werden unter anderem als fakultativ pathogene Erreger der sogenannten Acanthamöbenkeratitis beschrieben (Armstrong, 2000). Einige Vertreter rufen in immunsupprimierten Patienten schwerwiegende systemische Infektionen bis hin zur sogenannten granulomatösen Amöbenencephalitis hervor (Marshall *et al.*, 1997). Acanthamöben kommen ubiquitär vor und können aus einer Vielzahl von Habitaten isoliert werden. Thermophile Vertreter wurden bereits in heißen Quellen gefunden (Rivera *et al.*, 1989), aber auch in nährstoffarmen Habitaten, z.B. Leitungswasserrohren, können Acanthamöben für lange Zeiträume überdauern (Michel *et al.*, 1995; Michel *et al.*, 1998; Rohr *et al.*, 1998). Acanthamöben haben einen biphasischen Lebenszyklus: im sogenannten Trophozitenstadium vermehren sich die Amöben, sie sind stoffwechselaktiv und durch Acanthapodien beweglich (Abb. 4 A; Khan, 2001). Mit extremen Umweltbedingungen konfrontiert, bilden die Amöben Cysten mit einer extrem dicken doppelten Zellwand. Innerhalb dieser Zellwand liegt das Cytoplasma in kondensierter Form vor (Abb. 4 B). In Form der Cysten können Acanthamöben über Jahre hinweg überleben. Bei einer Verbesserung der Umweltbedingungen keimen sie erneut zum Trophoziten aus.



**Abb. 4:** Phasenkontrastaufnahmen von Acanthamöben-Trophoziten (**A**) bzw. -Cysten (**B**); in den Cysten ist das kondensierte Cytoplasma von einer dicken Zellwand umgeben (mit freundlicher Genehmigung von M. Horn)

---

Ca. 25% aller bekannten Acanthamöben-Arten beinhalten obligat intrazelluläre Endocytobionten, die eine stabile Lebensgemeinschaft mit ihrem Wirt eingehen. Basierend auf vergleichender Sequenzanalyse ihrer 16S-rDNS sind diese Endocytobionten fünf phylogenetischen Gruppen – *Rickettsiales*, *Caedibacter*, *Chlamydia*,  $\beta$ -Proteobacteria und dem Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides-Phylum – zugeordnet (Amann *et al.*, 1997; Birtles *et al.*, 1997; Fritsche *et al.*, 1999; Fritsche *et al.*, 2000; Horn *et al.*, 1999; Horn *et al.*, 2001; Horn *et al.*, 2000; Kahane *et al.*, 2001). Alle diese Gruppen enthalten humanpathogene Vertreter, und die obligat intrazelluläre Lebensweise der Endocytobionten könnte ein Hinweis auf das humanpathogene Potenzial dieser Bakterien sein. In der Tat wurde Chlamydien-ähnlichen Endocytobionten der Gattung *Parachlamydia* in *in vitro*-Cytopathogenitätsstudien mit humanen Zellkulturen eine signifikante Invasivität und Cytotoxizität zugewiesen (Collingro, unveröffentlichte Ergebnisse). Nicht nur obligat intrazelluläre Bakterien überdauern in Acanthamöben. In den letzten Jahren wurden Acanthamöben zudem als (Über)träger einer Vielzahl von fakultativ intrazellulären Krankheitserregern identifiziert (Barker und Brown, 1994; Winiacka-Krusnell und Linder, 2001). Viele pathogene Mikroorganismen können in Protozoen persistieren oder sich sogar in ihnen vermehren. Dazu gehören unter anderem *Burkholderia cepacia* (Marolda *et al.*, 1999), *B. pseudomallei* (Inglis *et al.*, 2000), *Mycobacterium avium* (Cirillo *et al.*, 1997; Steinert *et al.*, 1998; Strahl *et al.*, 2001), *Francisella tularensis* (Gustafsson, 1989), *Vibrio cholerae* (Thom *et al.*, 1992), *Helicobacter pylori* (Winiacka-Krusnell *et al.*, 2002) und *Legionella pneumophila* (Rowbotham, 1980; Rowbotham, 1983; Rowbotham, 1986). Auch *L. monocytogenes* sowie *L. seeligeri* vermehren sich laut einer 1990 veröffentlichten Studie in Acanthamöben (Ly und Müller, 1990). Diese Veröffentlichung gründet sich jedoch auf wenig fundierten Ergebnissen. Vorteile für pathogene Bakterien können durch eine Steigerung der Virulenz, aber auch durch den Schutz vor extremen Umweltbedingungen wie Strahlung, Austrocknung, oder chemische Detergenzien bedingt sein.

Unter den erwähnten Mikroorganismen sind vor allem die Legionellen hervorzuheben. Interaktionen zwischen Acanthamöben und Legionellen sind ein seit Jahrzehnten detailliert untersuchtes Modellssystem zur Aufklärung der Wechselwirkungen zwischen Bakterien und Protozoen. Die durch *Legionella pneumophila* ausgelöste Legionärskrankheit, die zum ersten Mal bei einem

Treffen von Kriegsveteranen in den USA auftrat, beruht auf der Übertragung von Legionellen durch Acanthamöben (Winn, 1986). Amöben stellen hier zum einen einen Schutz vor Austrocknung und Strahlung dar, zum anderen erfahren intrazelluläre Legionellen in Protozoen eine deutliche Virulenzsteigerung (Barker *et al.*, 1993) und sind nach Freisetzung aus Amöben sehr viel weniger sensitiv gegenüber Antibiotikabehandlung (Barker *et al.*, 1995). Für *Legionella pneumophila* konnte inzwischen gezeigt werden, dass Virulenzgene, die für das Überleben in Säugerzellen benötigt werden, auch in Acanthamöben eine bedeutende Rolle spielen (Cirillo *et al.*, 2002). Legionellen können im sogenannten „viable but non culturable“-Stadium existieren, aus dem sie durch Koinkubation mit Acanthamöben ins kultivierbare Stadium überführt werden können. Dies ist im Gegensatz dazu *in vivo* oder *in vitro* in humanen Zellkulturen bzw. Mäusen nicht der Fall (Steinert *et al.*, 1997). Eine Virulenzsteigerung gegenüber Säugern ist nicht nur für *Legionella pneumophila* beschrieben. Auch *Mycobacterium avium* ist nach Passage durch Acanthamöben in Zellkulturen deutlich infektiöser (Cirillo *et al.*, 1997). So passagierte Mykobakterien vermehren sich wesentlich effektiver in menschlichen Zellen und sind außerdem in signifikant erhöhten Zellzahlen im Mausmodell in Leber und Milz detektierbar.

Studien der Interaktionen von humanpathogenen Mikroorganismen mit Acanthamöben könnten Einblicke in die Evolution bakterieller Virulenzmechanismen, ihre ursprüngliche biologische Funktion sowie die physiologischen Anforderungen zur Expression der für das intrazelluläre Überleben benötigten Gene liefern. Zudem könnte die intrazelluläre Persistenz pathogener Mikroorganismen in Protozoen erklären, warum einige pathogene Mikroorganismen auch nach längerem Überdauern in der Umwelt ihre Virulenzgene bzw. Pathogenitätsinseln nicht verlieren.

---

### A.3 Ziele dieser Arbeit

Basierend auf früheren Ergebnissen, die eine klare Klassifizierung von *L. monocytogenes*-Stämmen und -Isolaten in drei distinkte Entwicklungslinien belegen, sowie aufgrund epidemiologischer und empirischer Daten, die deutliche Virulenzunterschiede innerhalb der Art *L. monocytogenes* aufzeigen, sollte in der vorliegenden Arbeit eine etwaige Korrelation zwischen der Phylogenie der Art *L. monocytogenes* und der Virulenz einzelner Isolate und Serotypen ermittelt werden.

Des Weiteren sollte anhand von axenisch kultivierten Acanthamöbenkulturen ein Infektionsassay ausgearbeitet und optimiert werden, mit Hilfe dessen das intrazelluläre Überleben von *L. monocytogenes* bzw. weiterer *Listeria* spp. in Acanthamöben untersucht werden kann. Zusätzlich sollten anhand von Mutanten die Rolle der *L. monocytogenes*-spezifischen Virulenzgene in Amöben sowie stammspezifische Unterschiede innerhalb der Art *L. monocytogenes* hinsichtlich des Überlebens in Acanthamöben aufgezeigt werden.

Die Umweltpersistenz einzelner *L. monocytogenes*-Genotypen sollte durch die Ausbringung geeigneter Stämme in bakteriendichten Behältern in die Umwelt untersucht werden.

## B Material und Methoden

Für die Herstellung der Lösungen wurde über eine Reinstwasseranlage (Milli-Q academic A10, Millipore, Eschborn) entsalztes und filtriertes Wasser (im Folgenden Aquabidest) verwendet. Der Einsatz von einfach entionisiertem Wasser (im Folgenden Aquadest) wird bei den jeweiligen Lösungen angegeben. Chemikalien wurden, soweit nicht anders angegeben, in p.a. (pro analysis) Qualität bezogen und verwendet. Die pH-Werte wurden mit NaOH- und HCl-Lösungen entsprechender Verdünnungen und Normalitäten eingestellt. Alle Puffer, Medien und Lösungen wurden in einem Wasserdampf-Hochdruckautoklaven (Varioclav Typ 500, H+P Labortechnik, Oberschleißheim) für 20 min bei 121°C und 1 atm Überdruck sterilisiert bzw. steril verpackt geliefert. Abweichende Vorgehensweisen sind gesondert vermerkt. Hitzelabile Substanzen, wie z. B. Antibiotika, wurden nach dem Autoklavieren unter sterilen Bedingungen zugegeben (Sterilfilter 0,2 µm Porengröße, Millipore, Eschborn). Zentrifugationsschritte erfolgten, sofern nicht gesondert vermerkt, in einer Kühlzentrifuge (Hettich, Tuttlingen).

### B.1 Verwendete technische Geräte

Wenn im Text nicht anders angegeben, wurden in dieser Arbeit die in Tabelle 1 beschriebenen Geräte verwendet.

**Tab. 1:** Verwendete technische Geräte

Gerät	Hersteller
Begasungsbrutschrank	Nunc Cellstar, Wiesbaden
Crosslinker	MWG-Biotech AG, Ebersberg
Epifluoreszenzmikroskop	Axioplan, Zeiss, Jena
Glasmesser-Brechgerät	Leica EM KMR2, Leica Mikrosysteme, Benzheim
Inkubationsofen	Heraeus Instruments, Hanau
Inverses Mikroskop	Axiovert 25, Zeiss, Jena
Konfokales Laser-Scanning-Mikroskop	LSM 510, Zeiss, Jena
Kühlzentrifuge	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen
Lichtmikroskop	Standard 25, Zeiss, Jena
Photometer	Beckmann DU 650, München
Reinstwasseranlage	Millipore, Eschborn

Gerät	Hersteller
Schleifgerät	Leica EM Trim, Leica Mikrosysteme, Benzheim
Schüttelinkubationsofen	Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel
Sterilbank	Heraeus Instruments, Hanau
Tischzentrifuge	Bachofer, Reutlingen
Transmissionselektronenmikroskop	EM 10, Zeiss, Jena
Ultraschallgerät	Branson Sonic Power Comp. Sonifier B12
Ultramikrotom	Leica Ultracut UCT, Leica Mikrosysteme, Benzheim

## B.2 Verwendete Organismen

Die in dieser Arbeit verwendeten Organismen sind in Tabelle 2 aufgeführt.

**Tab. 2:** Verwendete Organismen

Organismus	Stamm	Herkunft	Referenz
<i>Acanthamoeba</i> sp.	UWC1	University of Washington, Seattle, USA	Fritsche <i>et al.</i> , 1998
<i>Acanthamoeba</i> sp.	UWC1/E25	University of Washington, Seattle, USA	Fritsche <i>et al.</i> , 1998
<i>Listeria monocytogenes</i>	sv 1/2a; EGD-e	Universität Würzburg	Mackness (1964)
<i>L. monocytogenes</i>	sv 1/2b	Universität Würzburg	Seeliger, 1961
<i>L. monocytogenes</i>	sv 1/2c	Universität Würzburg	Seeliger, 1961
<i>L. monocytogenes</i>	sv 3a	Universität Würzburg	Seeliger, 1961
<i>L. monocytogenes</i>	sv 3b	Universität Würzburg	Seeliger, 1961
<i>L. monocytogenes</i>	sv 4a	Universität Würzburg	Seeliger, 1961
<i>L. monocytogenes</i>	sv 4b	Universität Würzburg	Seeliger, 1961
<i>L. monocytogenes</i>	sv 4c	Universität Würzburg	Seeliger, 1961
<i>L. monocytogenes</i>	sv 4a; SLCC2374	Universität Würzburg	Seeliger, 1961
<i>L. monocytogenes</i>	$\Delta prfA$	Universität Würzburg	
<i>L. monocytogenes</i>	$\Delta iap$	Universität Würzburg	
<i>L. monocytogenes</i>	$\Delta actA$	Universität Würzburg	
<i>L. monocytogenes</i>	$\Delta inIA$	Universität Würzburg	
<i>L. monocytogenes</i>	$\Delta inIB$	Universität Würzburg	
<i>L. monocytogenes</i>	$\Delta inIAB$	Universität Würzburg	
<i>L. monocytogenes</i>	$\Delta inIGHE$	Universität Würzburg	
<i>Enterobacter aerogenes</i>		Institutsstammsammlung, TU München	
Caco-2	ATCC HTB-37	ATCC	
J774		Universität Würzburg	
Tib 73.1		Universität Würzburg	

Die verwendeten Acanthamöbenstämme wurden in TSY (trypticase soy broth with yeast extract)-Medium gehalten, alle *L. monocytogenes*-Stämme wuchsen in BHI (brain heart infusion)-Medium. *E. aerogenes* wurde in HD (Hefe-Dextrose)-Medium kultiviert. Die Aufzucht und Infektion von Säugerzellen erfolgte in RPMI 1640-Medium (+ 2 mM L-Glutamin, Gibco – Invitrogen GmbH, Karlsruhe), supplementiert mit 10% fötalem Kälberserum (FCS, Biochrom, Berlin; s.u.).

Bei den verwendeten Acanthamöben handelte es sich um ein isogenes Pärchen. Dies sind Amöben derselben Spezies, von denen ein Stamm Endocytobionten („E25“) in sich trägt, während der andere Stamm ohne Symbiosepartner lebt. Solche isogenen Pärchen können künstlich durch Infektion von Amöben mit Endosymbionten hergestellt werden. Dabei entwickeln sich stabile Lebensgemeinschaften, die über Jahre hinweg bestehen. Aus im Labor mit Endocytobionten infizierten Amöben lassen sich die Endocytobionten durch Antibiotika auch nach Jahren wieder entfernen, während dies bei natürlich infizierten Amöben bislang nicht möglich ist.

In dieser Arbeit wurde die Acanthamöbe UWC1, die natürlicherweise keine Endosymbionten enthält und deren isogener Partner UWC1/E25 mit *Chlamydien*-ähnlichen Endocytobionten verwendet (s. Tab. 2).

### **B.3 Nährmedien und Puffer**

Die Verfestigung aller Nährmedien erfolgte durch die Zugabe von 15 g/l Agar (Gibco– Invitrogen GmbH, Karlsruhe).

#### **B.3.1 Medien und Puffer für die Anzucht der Amöben**

TSY-Broth (Trypticase Soy Broth with Yeast Extract)	
Trypticase Soy Broth (Oxoid, Wesel)	30 g
Hefeextrakt	10 g
Aqua <sub>dest</sub>	ad 1000 ml
pH 7,3	

---

Page's Amoebic Saline (10fach konzentriert)	
NaCl	1,2 g
MgSO <sub>4</sub> (*7 H <sub>2</sub> O)	0,04 g
CaCl <sub>2</sub> (*2 H <sub>2</sub> O)	0,04 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,42 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,36 g
Aqua <sub>dest</sub>	ad 1000 ml

### B.3.2 Medien zur Anzucht der Bakterien

BHI-Medium (Brain Heart Infusion-Medium, Difco, Detroit, Michigan)	
BHI Fertigmedium (DIFCO, Bacto BHI)	37 g
Aqua <sub>dest</sub>	ad 1000 ml

HD-Medium (Hefe-Dextrose-Medium)	
Trypton	10 g
Hefeextrakt	2,5 g
Glucose	1 g
NaCl	7 g
Aqua <sub>dest</sub>	ad 1000 ml
	pH 7,4

### B.3.3 Medien und Puffer für die Anzucht von Säugerzellen

RPMI-Komplettmedium	
FCS (hitzeinaktiviert; Biochrom, Berlin)	50 ml
RPMI 1640-Fertigmedium mit 2 mM L-Glutamin (Gibco – Invitrogen GmbH, Karlsruhe)	ad 500 ml

10x PBS (Phosphat-gepufferte Saline)	
NaCl	80 g
KCl	2 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (wasserfrei)	11,5 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (wasserfrei)	2 g
Aqua <sub>bidest</sub>	ad 1000 ml

10x Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup>	
MgCl <sub>2</sub> (*6 H <sub>2</sub> O)	1 g
CaCl <sub>2</sub> (*2 H <sub>2</sub> O)	1 g
ad 1000 ml Aqua <sub>bidest</sub>	

1x PBS	
10x PBS	100 ml
Aqua <sub>bidest</sub>	ad 1000 ml

1x PBS (Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup> )	
10x PBS	100 ml
10x Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup>	100 ml
Aqua <sub>bidest</sub>	ad 1000 ml

Trypsin/EDTA (Gibco – Invitrogen GmbH, Karlsruhe)

## **B.4 Kultivierung und Stammhaltung**

### **B.4.1 Kultivierung und Stammhaltung der Acanthamoeben**

Die Kultivierung der axenisch wachsenden Acanthamoeben erfolgte bei Raumtemperatur in flüssigem Medium in 10 ml- bzw. 150 ml-Zellkulturflaschen (Nunc, Wiesbaden). Die Kulturen wurden regelmäßig mit Hilfe eines inversen Mikroskops auf Kontamination überprüft. Bei starker Zunahme von vom Kulturflaschenboden abgelösten Trophozoiten bzw. bei verstärkter Cystenbildung wurde das Medium vorsichtig abgegossen und durch frisches ersetzt.

Zur Stammhaltung der Acanthamoeben wurden von jedem Stamm mehrere Subkulturen in 10 ml-Zellkulturflaschen in TSY-Medium angelegt und bei Raumtemperatur aufbewahrt. Bei diesen Kulturen wurde einmal pro Woche das alte Medium vorsichtig abgegossen und frisches Medium zugegeben.

### **B.4.2 Stammhaltung der Bakterien**

Zur Stammhaltung der Bakterien wurden Glycerinkulturen angelegt, die bei -80°C gelagert wurden. Hierfür wurde 1 ml einer spätlogarithmisch wachsenden Kultur geerntet (14 000 rpm, 5 min, 4°C), einmal in 1 ml 1x PBS gewaschen, das Zellpellet anschließend in 500 µl 1x PBS resuspendiert und gründlich mit 500 µl sterilem Glycerin vermischt. Diese Glycerinkulturen wurden in einem Trockeneis-Ethanol-Bad schockgefroren und bei -80°C gelagert. Zudem wurden die verwendeten Organismen auf den entsprechenden verfestigten Nährmedien mit einer sterilen Impföse ausgestrichen, über Nacht bei der jeweils optimalen Wachstumstemperatur bebrütet und anschließend bei 4°C gelagert. Diese

---

Stämme wurden zur Stammhaltung etwa alle vier Wochen auf frisches Medium überimpft und deren Reinheit durch Verdünnungsausstriche und mikroskopische Kontrolle im Phasenkontrast überprüft.

### **B.4.3 Stammhaltung von Säugerzelllinien**

Alle verwendeten Medien und Puffer wurden in einem Wasserbad auf 37°C vorgewärmt, um eine Schädigung der Zellen durch Abkühlen zu vermeiden.

Alle verwendeten Zelllinien wurden in einem begasteten Brutschrank bei 5% CO<sub>2</sub>-Atmosphäre in RPMI-1640 bebrütet. Eukaryontenzellen adhären am Boden der Kulturschalen, das Medium kann dementsprechend alle zwei bis drei Tage gewechselt werden.

#### **Passagieren von Zelllinien**

Sind die Zellen zu einem konfluenten Monolayer zusammengewachsen, stellen sie in der Regel ihr Wachstum ein, lösen sich vom Boden der Kulturschalen ab und lysieren teilweise. Dieser Prozess sollte durch das Passagieren der Zellen (Transfer in neue Kulturschalen und gleichzeitige Ausdünnung) verhindert werden. Einige Zelllinien mussten durch Trypsinbehandlung chemisch vom Boden der Kulturschale abgelöst werden. Dafür wurden zunächst die Zellen mit 1x PBS gewaschen. Dabei muss darauf geachtet werden, dass das PBS kein Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup> enthält, da Trypsin durch zweiwertige Ionen gehemmt wird. Anschließend wurden 2 ml Trypsin/EDTA-Gemisch (Gibco – Invitrogen GmbH, Karlsruhe) zugegeben, überschüssiges Trypsin/EDTA abgesaugt und ca. 5 min im Brutschrank inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden in frischem Medium gründlich resuspendiert, um die Bildung von Zellklumpen zu verhindern, und ein Teil dieser Zellsuspension in ein neues Kulturgefäß mit bereits vorgelegtem Medium pipettiert (Verdünnungsfaktor ca. 1:10).

## B.5 Herstellung von Infektionsaliquots

### Lösungen

PBS-Stammlösung

200 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$

200 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$

pH 7,3

1 x PBS (Phosphate-Buffered Saline)

NaCl 130 mM

$\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$  10 mM

pH 7,2–7,4

Glycerin

### Durchführung

1 ml Bakteriensuspension aus Übernachtskulturen, die bei der jeweils optimalen Wachstumstemperatur unter Belüftung geschüttelt worden waren, wurden in 24 ml frisches Medium überimpft und bis zu einer  $\text{OD}_{550}$  von 1,1 bzw. 180 Klett-Einheiten an einem Klett-Photometer ebenfalls aerob im Schüttler inkubiert. Dann wurden 20 ml der Bakterienkulturen in 50 ml-Reaktionsgefäßen (Greiner, Nürtingen) geerntet (5000 rpm, 10 min, 4°C) und zweimal mit jeweils 10 ml 1 x PBS gewaschen. Das Zellpellet wurde anschließend in 50 ml 20% Glycerin/PBS-Gemisch aufgenommen und gründlich resuspendiert. Jeweils 1 ml der Suspension wurde in ein 1,5 ml ERG überführt, in einem Trockeneis-Ethanol-Gemisch schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt.

Zur Bestimmung der in 1 ml enthaltenen Bakterienzellzahlen wurden jeweils zwei ERG aufgetaut, die Bakterienkulturen in verschiedenen Verdünnungsstufen ausplattiert, über Nacht bei 37°C bebrütet und die Bakterienkolonien ausgezählt. Dadurch ließ sich die genaue Zahl der lebensfähigen Bakterien ermitteln. Diese Infektionsaliquots wurden bei Bedarf aufgetaut und für Infektionsstudien sowohl für Säugerzellen als auch für Acanthamoeben verwendet.

---

## B.6 Zellzahlbestimmung von Amöben- und Säugerzellen

Zur Bestimmung der Zellzahlen von Amöben- und Säugerzellen wurden 10 µl einer gründlich durchmischten Zellsuspension in eine Neubauer-Zählkammer (Marienfeld, Lauda-Königshofen) pipettiert und unter dem Mikroskop ausgezählt. Dabei gilt folgende Formel:

$$\text{Zellzahl/ml} = Z * F_f * F_k$$

Z = Anzahl der Zellen in einem Großquadrat

F<sub>f</sub> = Verdünnungsfaktor

F<sub>k</sub> = Kammerfaktor (für Neubauerzählkammern = 10000)

Um einen möglichst genauen Wert zu erhalten, wurde jeweils der Mittelwert aus den Zellzahlen von fünf Großquadraten ermittelt.

## B.7 Infektionsstudien mit *Acanthamoeba* spp.

### Lösungen

Gentamicin-Stammlösung (Sigma, Taufkirchen)

100 mg/ml Gentamicin in Aqua<sub>bidest</sub> lösen, sterilfiltrieren (Filter 0,2 µm Porengröße, Millipore, Eschborn) und in je 50 µl Aliquots bei –20°C aufbewahren; die Endkonzentration in den Multiwellschalen betrug 300 bzw. 500 µg/ml.

1 x Page's Saline (s. B.3.1)

### B.7.1 Infektion der Acanthamöben

Drei Tage vor der Infektion wurden axenisch wachsende Amöben-Kulturen mit frischem Medium versetzt, um in den nachfolgenden Infektionsexperimenten immer vom gleichen Alter der Kultur ausgehen zu können. Durch Aufschütteln wurden die Amöben vom Boden der Kulturschale gelöst, die Zellsuspension in 50 ml-Reaktionsgefäße (Greiner, Nürtingen) überführt und die Zellen geerntet (3000 rpm, 3 min, RT). Nach einem Waschschrift mit 30 ml 1x Page's Saline wurde das Zellpellet anschließend in einer geeigneten Menge 1x Page's Saline

aufgenommen und gründlich resuspendiert. Die Zellzahlbestimmung der Amöben erfolgte wie unter B.6 beschrieben.

Die Infektionen wurden in 12-well-Multischalen (Nunc, Wiesbaden) durchgeführt. In die Vertiefungen dieser Multischalen wurden jeweils 1,5 ml 1 x Page's Saline, die  $5 \times 10^4$  Amöben enthielten, pipettiert. Die Schalen wurden anschließend bei der späteren Inkubationstemperatur (18, 30 oder 37°C) für etwa eine Stunde aufbewahrt, um den Amöben das Absetzen und Anheften am Boden der Vertiefungen zu ermöglichen. Dies wurde mit dem inversen Mikroskop überprüft.

Nachdem die Amöben sich abgesetzt hatten, wurden die Infektionsaliquots der benötigten Bakterienspezies aufgetaut. Die Bakterien wurden, wenn nicht in den entsprechenden Kapiteln gesondert vermerkt, mit einer MOI (multiplicity of infection) von 100 ( $5 \times 10^6$  Bakterienzellen) zu den Amöben gegeben und für 3 min bei 1000 rpm auf diese aufzentrifugiert. Die Multischalen wurden dann zum Schutz gegen Verdunstung mit Plastikklebebändern verschlossen und bei der entsprechenden Temperatur (18, 30 bzw. 37°C) inkubiert.

Die Infektionen wurden mit *Listeria monocytogenes* EGD und *Enterobacter aerogenes* parallel durchgeführt, wobei *E. aerogenes* als Standardfutterbakterium von Amöben nicht zur Infektion dieser befähigt sein sollte und somit als Negativkontrolle diente. Zusätzlich wurden für jeden Erntezeitpunkt Kontrollen der Amöben ohne Bakterien und der jeweiligen Bakterienspezies ohne Amöben in 1 x Page's Saline mit und ohne Gentamicin-Behandlung angelegt.

Die Infektionen mit *L. monocytogenes* und *E. aerogenes* wurden in Triplikaten durchgeführt, um statistisch genauere Aussagen treffen zu können.

### **B.7.2 Zellernte und Zellzahlbestimmung von Amöben und Bakterien**

In jede Vertiefung der Multischalen, die geerntet werden sollte, wurden 300 bzw. 600 µg/ml Gentamicin (bei 37 bzw. 18°C) gegeben, um alle extrazellulär vorhandenen Bakterien abzutöten, und bei der jeweiligen Inkubationstemperatur für 4 h weiterbebrütet. Die Konzentration des Antibiotikums variiert in Abhängigkeit von der Temperatur, da bei niedrigeren Temperaturen dessen Wirksamkeit eingeschränkt ist. Nach dieser Inkubationszeit wurden die Amöben mechanisch mit einem sterilen Spatel vom Schalenboden abgeschabt. Die Effizienz dieses

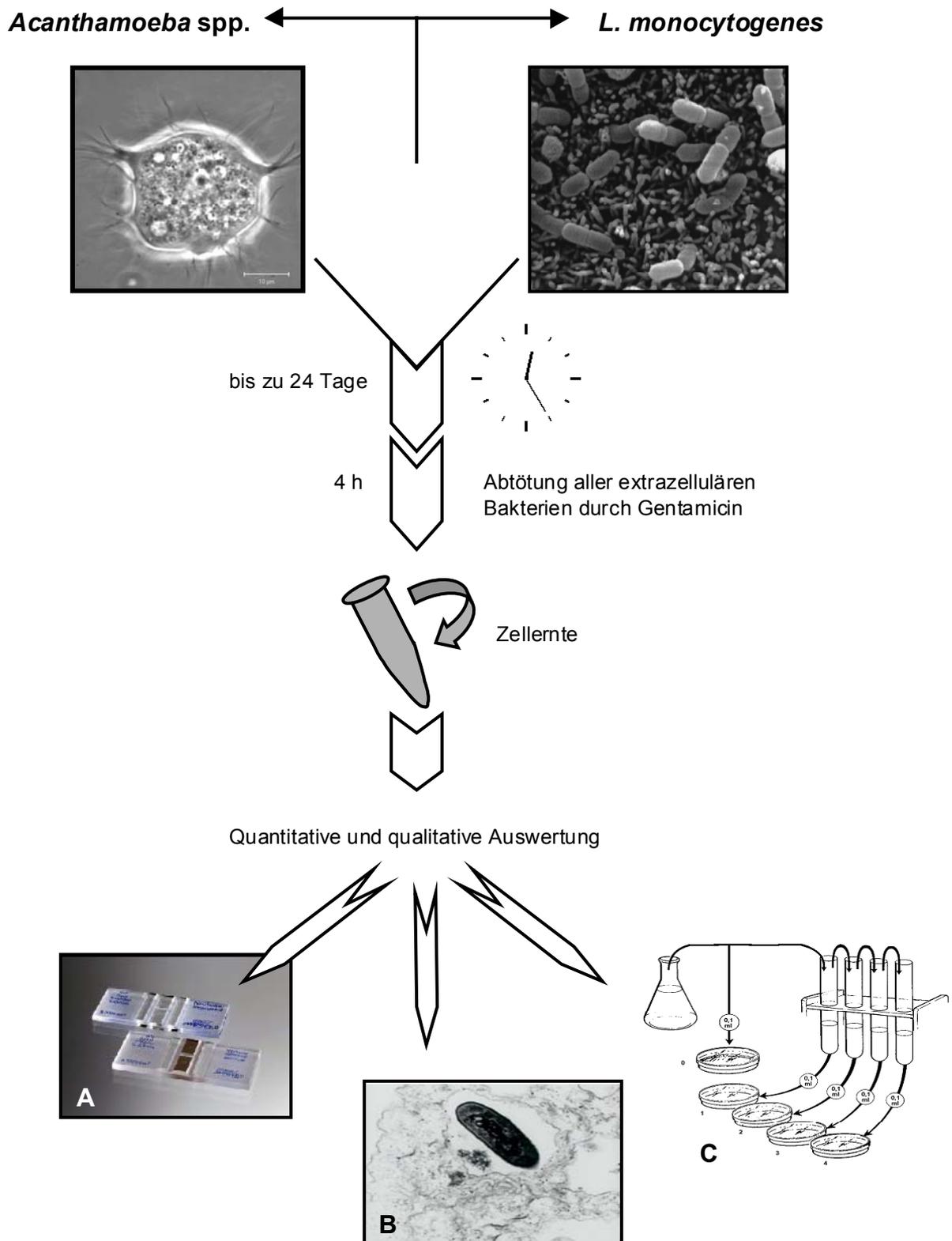
---

Schrittes wurde mikroskopisch mittels des inversen Mikroskops überprüft. Die Suspension wurde in ein 2 ml-ERG überführt, geerntet (10000 rpm, 10 min, 4°C) und das Zellpellet in 1 ml 1 x Page's Saline resuspendiert. Die enthaltene Amöbenzellzahl wurde wie unter B.6 mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer bestimmt.

Um die intrazellulär vorhandenen Bakterien freizusetzen, wurden die Amöben durch das sogenannte „Freeze-und-Thaw-Verfahren“ lysiert. Hierfür wird die entsprechende Zellsuspension in einem Trockeneis-Ethanol-Gemisch schockgefroren und anschließend wieder aufgetaut. Danach wurden zur Ermittlung der intrazellulären Bakterienzahlen von den Lysaten Verdünnungsreihen in 1 x Page's Saline erstellt ( $10^0$  bis  $10^{-3}$ ) und von diesen jeweils 100 µl auf dem jeweiligen Nähragar ausplattiert. Die Negativkontrollen der Bakterien ohne Gentamicin-Behandlung wurden in höheren Verdünnungen ( $10^0$  bis  $10^{-5}$ ) auf die Agarplatten getropft. Hierfür wurden jeweils 3x 10 µl derselben Verdünnungsstufe auf den Agar aufgetropft und getrocknet.

Um auch geschädigte Bakterien bei den Zellzahlbestimmungen mit zu erfassen, wurden die Kolonien auf den Agarplatten erst nach mehrtägiger Inkubation bei 37°C gezählt und so die Lebendkeimzahlen der intrazellulären Bakterien bestimmt.

Der Ablauf des Amöbeninfektionsassays ist schematisch in Abb. 5 dargestellt.



**Abb. 5:** Schematischer Ablauf der Infektionsstudien mit *Acanthamoeba* spp. Die Auswertung erfolgt durch mikroskopische Analyse (**B**) sowie quantitative Zellzahlbestimmung von Amöben- (**A**) und Bakterienzellen (**C**)

---

### **B.7.3 Untersuchung des Einflusses von Amöben auf die Gentamicin-Wirkung**

#### **Infektion in 6-well-Kulturschalen mit und ohne Filtereinsätze**

Durch bakteriendichte Filtereinsätze (Porengröße 0,2 µm, Anapore Membrane, Nunc) wurden die zu untersuchenden Bakterien von den Amöben getrennt in 6-Well Multischalen inkubiert, um den möglichen Einfluss ausgeschiedener Substanzen der Amöben, die die Wirkung des Gentamicins beeinflussen könnten, untersuchen zu können. Parallel dazu wurde eine Infektion ohne Filtereinsätze als Positivkontrolle wie unter B.7.1/2 beschrieben durchgeführt

Pro Vertiefung der verwendeten 6-Well-Multischalen wurden  $1 \times 10^6$  Amöben in 3 ml 1x Page's Saline ausgesät und nach einstündiger Inkubation bei der jeweiligen Infektionstemperatur mit  $1 \times 10^8$  Bakterien versetzt bzw. die Bakterien nach Einsetzen des Filters zugegeben. Die Multischalen wurden mit Plastiklebebändern verschlossen und bei der jeweils zu untersuchenden Temperatur inkubiert.

Die Zellernte und Bestimmung der Amöben- und Bakterienzellzahlen erfolgte wie unter B.6 bzw. B.7.2 beschrieben. Beim Ernten wurden die Bakterien und Amöben, die vorher durch Filtereinsätze getrennt waren, weiterhin getrennt behandelt. Alle Ansätze wurden in Triplikaten durchgeführt.

## B.8 Infektion von Säugerzellen mit *L. monocytogenes*

### B.8.1 Bestimmung von intrazellulären *L. monocytogenes*-Zellzahlen in Säugerzellen

Nach der Bestimmung der Zellzahl einer geernteten Zellsuspension der verwendeten Zelllinie (s. B.6) wurde eine geeignete Menge an Zellen in 24-Well-Kulturschalen (Nunc, Wiesbaden) verteilt und bei 37°C / 5% CO<sub>2</sub> für ca. zwei Tage in RPMI-Medium (+FCS) inkubiert. Die Ausgangszellzahl wurde jeweils so gewählt, dass die Zellen nach diesem Inkubationszeitraum zu einem semikonfluenten Monolayer gewachsen waren. Nach zwei Waschschritten mit PBS<sub>Ca/Mg</sub> (s. B.3.3) zur Entfernung von Serum wurden die Zellen mit der jeweils geeigneten MOI (s. Tab. 3) mit *L. monocytogenes* in RPMI (-FCS) infiziert. Für die Infektion wurde auf die Zugabe von FCS verzichtet, da die Zusammensetzung fötalen Kälberserums bei unterschiedlichen Chargen nie identisch ist. Unbekannte Faktoren könnten jedoch die Interpretation der erhaltenen Ergebnisse erschweren. Um eine reproduzierbare Infektion zu erreichen, erfolgte die Infektion aus bereits vorher hergestellten Infektionsaliquots (s. B.5). Der Infektionszeitraum richtete sich nach der jeweils verwendeten Zelllinie und ist ebenfalls in Tab. 3 aufgeführt. Danach wurden extrazelluläre Bakterien durch dreimaliges Waschen mit PBS<sub>Ca/Mg</sub> entfernt. Adhärenz Zellen wurden durch die Zugabe von Gentamicin-haltigem Medium (RPMI + FCS) abgetötet (100 µg/ml GM). Bei Inkubationen, die länger als eine Stunde dauerten, wurde die Konzentration des Gentamicins nach einer Stunde auf 10 µg/ml verringert, da Gentamicin über längere Inkubationszeiträume und in hohen Konzentrationen in die Eukaryontenzellen eindringen und damit das intrazelluläre Überleben der Listerien beeinflussen kann.

Zur Bestimmung der intrazellulären Zellzahl wurde der Infektionsansatz zweimal mit PBS<sub>Ca/Mg</sub> gewaschen und eiskaltes Aqua<sub>dest</sub> zugegeben. Durch den osmotischen Druck schwellen die Zellen auf und lysieren. Vollständige Lyse wurde bei Caco-2-Zellen durch anschließende Ultraschallbehandlung mit einer Ultraschallspitze erreicht (s. Tab. 3). Die genaue bakterielle Zellzahl wurde durch Ausplattieren geeigneter Verdünnungsstufen aus dem Zell-Lysat auf BHI-Agar ermittelt.

**Tab. 3:** Für einzelne Zelllinien spezifische Infektionscharakteristika

Zelllinie	Herkunft	MOI*	Infektionszeitraum*	Lysemethode
J774	Maus-Tumor-Makrophagen	1	45 min	eiskaltes H <sub>2</sub> O <sub>dest/steril</sub>
Caco-2	menschliches Colonkarzinom	10	60 min	eiskaltes H <sub>2</sub> O <sub>dest/steril</sub> + Ultraschall
Tib 73	Maus-Hepatocyten	10	60 min	eiskaltes H <sub>2</sub> O <sub>dest/steril</sub>

\* Unterschiedliche MOIs und Infektionszeiten richten sich nach der Fähigkeit von *L. monocytogenes*, die entsprechenden Zelllinien zu befallen. Je effektiver eine Infektion ist, desto niedriger werden MOI und Infektionszeiten gewählt.

## B.8.2 Bestimmung der Adhäsion von Listerien an die Wirtszellen

### Inhibitor – Cytochalasin D

Stammlösung: Cytochalasin D (Sigma, Taufkirchen) 2 mg/ml DMSO  
eingesetzte Arbeitskonzentration 2 µg/ml

Wird in dem oben beschriebenen Infektionsassay auf die Zugabe von Gentamicin verzichtet und dadurch extrazelluläre Bakterien nicht abgetötet, befinden sich nach extensiven Waschschrinen und Lyse der Zellen im Zell-Lysat neben intrazellulären auch an Zellen gebundene Bakterien. Hierbei kann nicht zwischen intra- und extrazellulären Bakterien unterschieden werden. Verhindert man aber die Aufnahme der Listerien mit dem Inhibitor Cytochalasin D, so befinden sich im Zell-Lysat ausschließlich adhärente Bakterien. Um sicherzustellen, dass der Inhibitor die Aufnahme der Bakterien bereits zu Beginn der Infektion effektiv hemmt, wurden die Zellen 30 min in RPMI 1640 mit 2 µg/ml Cytochalasin D präinkubiert. Die Infektion selbst fand ebenfalls in RPMI 1640 (+ Cytochalasin D) statt. Nach der Infektion wurden die Zellen dreimal mit PBS<sub>Ca/Mg</sub> gewaschen, wie oben beschrieben in Aqua<sub>dest</sub> lysiert und das Lysat in geeigneten Verdünnungsstufen auf BHI ausplattiert.

Als Kontrolle wurde zum einen eine herkömmliche Infektion ohne die Zugabe von Cytochalasin D durchgeführt, um den korrekten Ablauf des Versuches verfolgen zu können. Zum anderen sollte durch die Zugabe von Gentamicin in einem weiteren Kontrollversuch die quantitative Wirkung des Cytochalasins getestet werden. Da Cytochalasin die Aufnahme der Listerien verhindert, sind hier

theoretisch nach Antibiotikabehandlung ausschließlich extrazelluläre Bakterien vorhanden. Werden diese durch die Zugabe von Gentamicin abgetötet, sollten keine lebensfähigen *L. monocytogenes*-Zellen mehr in diesem Kontrollversuch detektierbar sein.

### **B.9 Bestimmung der Hämolyseaktivität von *L. monocytogenes***

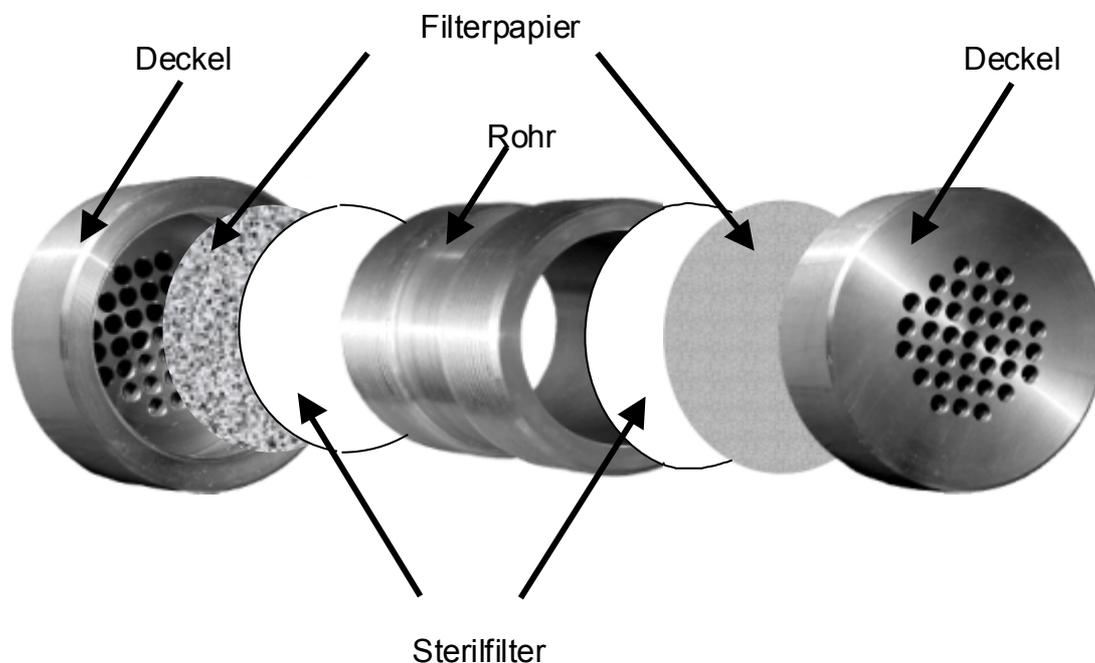
Zur Bestimmung der Aktivität des zelleigenen Hämolysins Listeriolysin O aus *L. monocytogenes* wurden Blutplatten verwendet, die 5% Schafsbluterythrocyten enthielten (Oxoid, Wesel). 2 µl einer *L. monocytogenes*-Übernachtkultur wurden auf die Platten aufgetropft und zwölf bis 24 Stunden aerob bei 37°C inkubiert. Die Hämolyseaktivität wurde entsprechend der um die Kolonien entstandenen Lysehöfe angegeben.

### **B.10 Bestimmung der Umweltpersistenz von *L. monocytogenes***

Die Persistenz einzelner *L. monocytogenes*-Stämme in der Umwelt wurde durch das Ausbringen von bakteriendichten Behältern (Enclosures), die durch den Einsatz von Sterilfiltern einen Austausch zwischen ihrem Inhalt und dem umgebenden Medium erlauben, untersucht. Die Behälter haben, wie Abb. 6 zeigt, Bohrungen an beiden Seiten, die eine optimale Durchflussrate ermöglichen. Diese Bohrungen wurden durch Whatman-Filterpapier (Maidstone, England) und bakteriendichte Filter (Schleicher und Schuell, Dassel) abgedeckt, ein Teil der Umweltprobe in die Enclosures gegeben, mit einer geeigneten Menge an *L. monocytogenes*-Zellen versetzt und anschließend gut verschlossen in einem Gefäß, das das zu untersuchende Habitat enthielt, ausgebracht (Zeitpunkt t<sub>0</sub>). Ein Kontrollbehälter, der neben der Umweltprobe keine zusätzlich zugegebenen *L. monocytogenes*-Zellen enthielt, wurde ebenfalls im Habitat ausgebracht und wie alle anderen inkubiert. Zu diesem Zeitpunkt t<sub>0</sub> wurde die Ausgangszellzahl an *L. monocytogenes*-Zellen, die sich bereits in der Probe befanden, durch Ausplattieren geeigneter Verdünnungsstufen auf Selektivmedien (in diesem Fall

---

Palcam-Agar, Oxoid, Wesel) bestimmt. Zu einem bestimmten Zeitpunkt  $t_1$  wurde die Flüssigkeit im Behälter ebenso wie die beide Seiten begrenzenden Sterilfilter in ein 50 ml-Reaktionsgefäß überführt. Eventuell an den Filtern haftende Zellen wurden durch längeres Vortexen abgelöst, anschließend die Filter entfernt und die suspendierten Zellen durch Zentrifugation (5.000 rpm, 15 min) geerntet. Durch Ausplattieren geeigneter Verdünnungsstufen auf selektivem Palcam-Agar wurde die entsprechende Menge an *L. monocytogenes*-Zellen in den Enclosures sowie im umgebenden Medium bestimmt. Die detektierte Menge an *L. monocytogenes*-Zellen im Kontrollbehälter zum Zeitpunkt  $t_1$  wurde von der Anzahl der Zellen in den inokulierten Enclosures abgezogen.



**Abb. 6:** Schematische Darstellung eines Enclosures mit den verwendeten Filtereinsätzen

## B.11 *In situ*-Detektion von intrazellulären Bakterien in Amöben mittels Fluoreszenzmikroskopie

### B.11.1 Fixierung und Immobilisierung von Amöbenzellen auf Objektträgern / Deckgläschen

#### Lösungen

PBS-Stammlösung	
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	200 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	200 mM
pH 7,2–7,4	

3 x PBS-Lösung	
NaCl	390 mM
Na <sub>x</sub> PO <sub>4</sub> (PBS-Stammlösung)	30 mM
pH 7,2–7,4	

#### 4% Paraformaldehydlösung (Sigma, Taufkirchen)

33 ml Aqua<sub>bidest</sub> wurden auf 60–65°C erhitzt und nach Zugabe von 2,5 g Paraformaldehyd tropfenweise mit 10 N NaOH versetzt, bis das Paraformaldehyd sich gelöst hatte und die Lösung aufgeklärt war. Anschließend wurden 16,6 ml 3 x PBS zugegeben und die Lösung auf etwa 20°C abgekühlt. Der pH-Wert wurde mit HCl auf 7,2–7,4 eingestellt. Anschließend wurde die Lösung sterilfiltriert (Filter 0,2 µm, Millipore, Eschborn) und bei –20°C gelagert.

#### Durchführung

2 ml einer gut gewachsenen Amöbenkultur wurden nach dem Ablösen vom Flaschenboden durch Aufschütteln der Kulturflasche geerntet (10000 rpm, 10 min, RT) und das Zellpellet in wenig 1 x Page's Saline aufgenommen. Von dieser Suspension wurden je 20 µl auf die Aussparungen eines teflonbeschichteten Objektträgers (10 well, Marienfeld, Lauda-Königshofen) pipettiert und für etwa 30 min bei RT stehengelassen. Dies ermöglichte den Amöben, sich am Boden des Objektträgers anzuheften.

Anschließend wurde die Flüssigkeit vorsichtig abgenommen und die Amöben durch Überschichtung mit 20 µl 4%iger Paraformaldehydlösung für 20 – 30 min bei RT auf dem Objektträger fixiert. Die Lösung wurde danach ebenfalls vorsichtig wieder abpipettiert. Um das Paraformaldehyd möglichst vollständig zu entfernen, wurden die fixierten Proben mit 1 x PBS gewaschen, indem 20 µl davon auf jede

---

Aussparung des Objektträgers pipettiert und anschließend gleich wieder abgenommen wurden. Die Objektträger wurden anschließend an der Luft getrocknet.

Wurden Versuche mit Acanthamoeben in kleinen Kulturschälchen auf Deckgläschen (Nunc, Wiesbaden) durchgeführt, erfolgte die Fixierung wie oben, allerdings konnte hier auf die Inkubation zum Absetzen der Amöben verzichtet werden.

### **B.11.2 Nachweis von intrazellulären Bakterien in Acanthamoeben mit Hilfe des DNS-Farbstoffes DAPI**

Der fluoreszierende DNS-Farbstoff DAPI (4',6'-Diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid) bindet an AT-reiche Sequenzen der Wirtszell-DNS und der DNS der intra- bzw. extrazellulär vorhandenen Bakterien. DAPI zeigt ein Anregungsoptimum bei 365 nm und ein Emissionsmaximum bei 418 nm.

#### **Lösungen**

DAPI (Sigma, Taufkirchen)

Stammlösung      1 mg/ml in Aqua<sub>bidest</sub>

Arbeitslösung    1 µg/ml in Aqua<sub>bidest</sub>

Sowohl die Stamm- als auch die Arbeitslösung wurden bei 4°C gelagert.

#### **Durchführung**

Die Zellen wurden wie oben beschrieben auf einem Objektträger bzw. Deckgläschen fixiert und immobilisiert (B.10.1). Auf jede Aussparung des Objektträgers wurden 10 µl der DAPI-Arbeitslösung pipettiert und für 10 min im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde die Lösung vorsichtig mit Aqua<sub>dest</sub> abgespült und der Objektträger an der Luft getrocknet. Nach der Überschichtung des Objektträgers mit Citifluor-AF1 (Citifluor Ltd.) zum Schutz vor Ausbleichung erfolgte die Auswertung am konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop bzw. Epifluoreszenzmikroskop.

### **B.11.3 Detektion intrazellulärer Bakterien mittels konfokaler Laser Scanning Mikroskopie**

Die Auswertung von mit Fluoreszenzfarbstoffen gefärbten Zellen erfolgte mit einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop und der mitgelieferten Bildverarbeitungs-Software. Der Nukleinsäurefarbstoff DAPI wurde mittels eines UV-Lasers (351-364 nm) detektiert, die Umrisse der Amöben wurden durch Aufnahme der Autofluoreszenz mit einem Helium-Neon-Laser (543 nm) dargestellt. Die Dokumentation am konfokalen Laser-Scanning Mikroskop erfolgte direkt durch die Aufnahme digitalisierter Bilder mit der angeschlossenen Bildverarbeitungssoftware.

## **B.12 Transmissionselektronenmikroskopie**

### **Lösungen**

#### Glutaraldehydlösung

2% Glutaraldehyd (Sigma, Taufkirchen) (v/v) in  
1 x PBS bzw. 1 x Page's Saline

#### Osmiumtetroxidlösung

4% Osmiumtetroxid (Sigma, Taufkirchen) (w/v) in Aqua<sub>dest</sub>

#### Spurr-Polymerharz

Spurr-Kit (Sigma, Taufkirchen)

#### Uranylacetat (Serva, Heidelberg)

Bleicitrat (Merck, Darmstadt)

### **B.12.1 Fixierung und Einbettung für die Transmissionselektronenmikroskopie**

Mit *Listeria monocytogenes* EGD bzw. *Enterobacter aerogenes* koinkubierte Acanthamöben wurden je nach Versuchsanordnung mit einem sterilen Spatel vom Boden der 12-well-Schalen abgeschabt bzw. aus Kulturflaschen durch Aufschütteln vom Boden der Flasche abgelöst. Anschließend wurden die

---

infizierten Amöben in 2 ml ERG (10000 rpm, 10 min, RT) bzw. 50 ml-Reaktionsgefäßen (5000 rpm, 10 min, RT) geerntet und einmal in 1 x Page's Saline gewaschen.

Aufgrund des gesundheitsgefährdenden Potenzials der verwendeten Substanzen wurden alle weiteren Schritte unter einem Abzug durchgeführt. Alle Zentrifugationsschritte wurden bei 3000 rpm für 3 min durchgeführt. Das Zellpellet wurde in 1,5 ml 2%iger Glutaraldehydlösung resuspendiert, die Suspension in ein 1,5 ml ERG überführt und für 1 h bei RT inkubiert. Die fixierten Zellen wurden anschließend abzentrifugiert, das überschüssige Glutaraldehyd entfernt und die Zellen dreimal für 10 min mit 1,5 ml Aqua<sub>dest</sub> gewaschen. Danach erfolgte ein zweiter Fixierungsschritt in 2% Osmiumtetroxid für 1 h bei RT, in dessen Anschluss ebenfalls drei zehnmünütige Waschschrirte mit Aqua<sub>dest</sub> durchgeführt wurden. Die so fixierten Zellen wurden über eine aufsteigende Acetonreihe (30%, 50%, 75%, 95%, dreimal 100%) jeweils für 20 min dehydriert. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wurde das Aceton nicht vollständig entfernt und mit drei Teilen des Einbettungsharzes (Spurr, 1969) vermischt. Über Nacht verdampfte das in den Proben vorhandene Aceton. Nach einem Zentrifugationsschritt wurde das Einbettungsmittel durch frisches ersetzt und das Harz bei 60°C für mindestens 48 h auspolymerisiert.

Die in Polymerharz eingebetteten Proben sind für unbegrenzte Zeit verwendbar.

### **B.12.2 Ultramikrotomie, Kontrastierung und Transmissionselektronenmikroskopie**

Ultradünnschnitte wurden mit einem Glasmesser oder einem Diamantmesser (Diatome, Biel, Schweiz) mittels eines Ultramikrotoms hergestellt. Die silbrig- bis goldfarbenen (entspricht einer Schnittdicke von ca. 70 nm) Schnitte wurden auf ein mit Pioloform beschichtetes Nickel-Netzgrid (Plano, Heidelberg) übertragen. Diese wurden in 1% wässrigem Uranylacetat für ca. 4 min und nach mehrmaligem Waschen mit Aqua<sub>dest</sub> in 1% wässrigem Bleicitrat für 2 min kontrastiert (Bowers und Korn, 1968; Reynolds, 1962). Die Untersuchungen am Transmissionselektronenmikroskop erfolgten bei 60 kV.

## B.13 Isolierung von DNS

### Lösungen

Mutanolysin ( $\beta$ -1,4-N-acetyl-muramidase, Sigma, Deisenhofen)

Stammlösung 36 units /  $\mu$ l  $H_2O_{reinst}$

Arbeitslösung Teil Stammlösung + 5 Teile  $H_2O_{reinst}$  (6 units/ $\mu$ l)

Proteinase K-Stammlösung

Proteinase K (Boehringer Mannheim, Deutschland) 40 mg/ml

SDS-Lösung

25% (w/v) Natriumdodecylsulfat in  $H_2O_{dest}$

5 M Natriumchlorid

PBS-Stammlösung (s. B.10.1)

1 x PBS Gebrauchslösung

130 mM NaCl

10 mM  $Na_xPO_4$  (PBS-Stammlösung)

pH 7,2-7,3

Penicillin G

Penicillin G-Lösung 100 mg/ml ( $1,6 \times 10^5$  U/ml)  
(Sigma, Deisenhofen)

Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisch (24:1)

3 M Natriumacetat

Isopropanol

Ethanol<sub>70%</sub>

Elutionspuffer

10 mM Tris / HCl

pH 8,5

### Durchführung

30 ml einer aerob über Nacht gewachsenen Kultur wurden zur Verhinderung der Mureinquervernetzung mit 100  $\mu$ l einer 100 mg/ml-Lösung (16000 Einheiten) Penicillin G (Sigma, Deisenhofen) versetzt und 1 h bei 37°C auf dem Rundschtüttler inkubiert. Anschließend wurden 2 ml der so behandelten Kultur geerntet (14000 rpm, 4°C) und der Zellrückstand in 1x PBS gewaschen. Die sedimentierten Zellen wurden in 500  $\mu$ l  $H_2O_{reinst}$  aufgenommen, mit 25  $\mu$ l Mutanolysin-Lösung versetzt und 45 min bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 25  $\mu$ l Proteinase K-Lösung wurde erneut für 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend

---

wurde der Ansatz durch Zugabe von 45 µl 25% SDS auf 2% SDS eingestellt und zur vollständigen Inaktivierung von DNasen für 10 min bei 60°C inkubiert. Nach vollständiger Lyse der Zellen wurde die Lösung auf 1 M NaCl eingestellt (bei einem Gesamtvolumen von 600 µl: Zugabe von 150 µl 5 M NaCl). Durch Ausschütteln mit 1 Vol. Chloroform-Isoamylalkohol wurde der Zelldebris in die organische Phase überführt und durch einen zehnminütigen Zentrifugationsschritt (14000 rpm, 4°C) von der in der wässrigen Lösung befindlichen DNS getrennt. Diese wurde dann nach Überführen des wässrigen Überstandes in ein neues steriles ERG durch Zugabe von 0,1 Vol. 3 M Natriumacetat und 0,56 Vol. Isopropanol gefällt und zentrifugiert (14000 rpm, 4°C, 15 min). Die sedimentierte DNS wurde nach vorsichtiger Entfernung des Überstandes in 150 µl EtOH<sub>70%</sub> gewaschen und anschließend kurz im Vakuum getrocknet (SpeedVac, Bachofer, Reutlingen). Die DNS wurde in 100 µl Elutionspuffer rückgelöst und bei -20°C gelagert.

## **B.14 Isolierung von RNS**

Aufgrund der hohen Stabilität und Aktivität von RNasen wurden bei der Isolierung und weiteren Handhabung von RNS besondere Maßnahmen ergriffen. Alle Lösungen, die kein Tris enthalten, wurden vor dem Autoklavieren mit 0,1% (v/v) Diethylpyrocarbonat (DEPC; SIGMA, Deisenhofen, BRD) versetzt, für mindestens 3h bis über Nacht bei 37°C inkubiert und dann autoklaviert. Alle Lösungen, die Tris enthalten, wurden mit bereits autoklaviertem H<sub>2</sub>O<sub>reinst, DEPC</sub> bereitet und anschließend erneut autoklaviert. Für Pipettiervorgänge wurden durch  $\gamma$ -Strahlen sterilisierte, RNase-freie Filterspitzen (Biozym Diagnostik 20, 100, 200 und 1000 µl Filterspitzen, Oldendorf, D) verwendet.

### B.14.1 RNS-Isolierung nach Oelmüller *et al.* (1990), modifiziert

#### Lösungen

##### AE-Puffer

20 mM Natriumacetat  
1 mM EDTA  
pH 5,5 (mit Eisessig eingestellt)

##### Glasperlen

0,10-0,11 mm, Braun, Melsungen, BRD  
sterilisiert durch trockene Hitze (200°C, 2 h)

##### 25 % SDS-Lösung

25 % (w/v) Natriumdodecylsulfat (Sigma, Deisenhofen)

##### 3 M Natriumacetat pH 5,2

Roti<sup>®</sup>-Aqua-Phenol pH 4,0-4,5 (Roth, Karlsruhe, BRD)

Roti<sup>®</sup>-Phenol-Chloroform-Lösung (Roth)

EtOH<sub>abs</sub>

EtOH<sub>70%</sub>

H<sub>2</sub>O<sub>reinst, DEPC</sub>

RNasin (Boehringer, Mannheim, BRD)

#### Durchführung

2 ml einer logarithmisch wachsenden Kultur wurden 5 min zentrifugiert (14.000 rpm, Bacher), der Überstand verworfen und die Zellen mit 500 µl eiskaltem AE-Puffer gewaschen. Die sedimentierten Zellen wurden in 500 µl eiskaltem AE-Puffer aufgenommen und 50 µl 25% SDS-Lösung und 600 µl auf 60°C vorgewärmte Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1) zugegeben. Um die Bakterien zu lysieren wurden sterile Glasperlen (0,10-0,11 mm, Braun Melsungen), die etwa dem Volumen von 400 µl entsprachen, zugegeben und der Ansatz 2-5 min sonifiziert (Banelin Sonorex TK 52 Transistor, Bacher). Zur weiteren Lyse wurde 10 min bei 60°C im Wasserbad inkubiert und der Isolierungsansatz 2-3 min auf Eis abgekühlt. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (14.000 rpm, 4°C, 10 min) wurde die obere, wässrige und nukleinsäurehaltige Phase möglichst quantitativ abgehoben, in ein neues, steriles ERG überführt und zur neuerlichen Proteinextraktion mit 1 ml Aqua-Phenol (pH 4,0-4,5) ausgeschüttelt. Durch einen weiteren Zentrifugationsschritt (14.000 rpm, 4°C, 10 min) wurden die wässrige und phenolische Phase erneut getrennt. Die obere, wässrige, nukleinsäurehaltige

---

Phase wurde erneut in ein neues, steriles ERG überführt und die RNS nach Zugabe von 0,1 Vol. 3 M NaAc und 2,5 Vol. EtOH<sub>abs</sub> 1 h bei -80°C gefällt. Die gefällte RNS wurde zentrifugiert (14.000 rpm, 4°C, 20 min.), der Überstand vorsichtig abgenommen und die RNS mit 300 µl EtOH<sub>70%</sub> gewaschen. Nach Entfernung des Überstandes wurde die isolierte RNS kurz im Vakuum getrocknet (SpeedVac, Bachofer) und anschließend in 80-100 µl H<sub>2</sub>O<sub>reinst, DEPC</sub> aufgenommen, zur Inaktivierung von RNasen mit 0,8-1,0 µl RNasin versetzt und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

### **B.14.2 Isolierung von RNS mit dem Bead Beater**

#### **Lösungen**

Trizol  
Chloroform  
Isopropanol  
70% Ethanol

#### **Durchführung**

2 ml logarithmische Kultur wurden 5 min zentrifugiert (14.000 rpm, 4°C), der Überstand verworfen, und das Zellpellet in 1,5 ml Trizol (Bio-101, Vista, CA) resuspendiert. Anschließend wurde die Zellsuspension in ein Bead-Beater Reaktionsgefäß überführt, in dem sich bereits ¼“ Kügelchen befanden. Die Zellen wurden für 30 s bei Geschwindigkeitsstufe 6 im Bead Beater (Bio-101, Vista) lysiert, und Zelldebris sowie Lyse-Matrix bei Raumtemperatur (RT) abzentrifugiert (14.000 rpm, 5 min). Der RNS-haltige Überstand wurde in ein neues, steriles ERG überführt und 1 min bei RT inkubiert. Durch die Zugabe von 0,2 vol. Chloroform, Inkubation für 2 min bei RT und anschließende Zentrifugation (15.000 rpm, 15 min, 4°C) wurden Proteine in die organische Phase überführt und somit von der RNS getrennt. Die wässrige Phase wurde in ein frisches, steriles ERG überführt und durch die Zugabe von 0,5 vol. Isopropanol gefällt (10 min, RT). Anschließend wurde die RNS abzentrifugiert (15.000 rpm, 15 min, 4°C), einmal mit 1,5 ml 0,75% Ethanol<sub>DEPC</sub> gewaschen, und das RNS-Pellet an der Luft getrocknet. Die RNS wurde schließlich durch Inkubation für 10 min bei 55°C in Aqua<sub>bidest/DEPC</sub> gelöst und in 5 µl Aliquots bei -80°C gelagert.

## B.15 DNase-Verdau

### Lösungen

DNase, RNase-frei (Roche, Mannheim)

40 mM MgCl<sub>2</sub>

### Durchführung

72 µl der RNS wurden mit je 9 µl DNase und MgCl<sub>2</sub> vermischt und anschließend für 1 h bei 37°C inkubiert. Der DNase-Verdau wurde anschließend durch die Zugabe von 3 µl 0,2 M EDTA<sub>DEPC</sub> gestoppt und noch vorhandene DNasen durch Erhitzen (60°C, 10 min) abgetötet. Um eventuell störende Reaktionsparameter zu entfernen – vor allem EDTA, das in der nachfolgenden RT-PCR nötige Mg<sup>2+</sup>-Ionen abfangen würde –, wurde die RNS erneut gefällt (s. B.13.1), in 5 µl aliquotiert und bei -80°C gelagert.

## B.16 RNase-Verdau

### Lösungen

RNase A (Sigma, Taufkirchen, 2 units/µl)

### Durchführung

15 µl der zu verdauenden RNS wurden mit 15 µl RNase vermischt und bei 60°C für 30 min inkubiert. Die Vollständigkeit des Verdau wurde durch Agarose-Gelelektrophorese protokolliert. Wurde die RNS zuvor einem DNase-Verdau ausgesetzt, so kann diese nach RNase-Verdau als Negativkontrolle in eine RT-PCR-Reaktion eingesetzt werden.

---

## **B.17 Reverse-Transkriptase-Reaktion zum Nachweis von Boten-RNS**

### **B.17.1 Prinzip der RT-PCR**

Der RT-PCR liegt das Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion zugrunde, der mittels Reverser Transkriptase eine Transformation von RNS in cDNS vorgeschaltet ist. Dabei wird in Abhängigkeit des eingesetzten spezifischen Primers transkribierte Boten-RNS eines bestimmten Gens bzw. ribosomale RNS in sogenannte komplementäre DNS (cDNS) umgeschrieben und diese zur Detektion in einem nachfolgenden Schritt mit einem zweiten Primer mittels PCR amplifiziert. Bei der RT-PCR unterscheidet man zwei verschiedene Prinzipien: bei der „two-step RT-PCR“ werden erst nach der spezifischen Reversen Transkriptase-Reaktion die Reagenzien für die PCR zusammen mit der entsprechenden DNS-Polymerase zugegeben. Im Gegensatz dazu wird bei der „one-step RT-PCR“ zum einen ausschließlich die DNS-Polymerase aus *Thermus thermophilus* verwendet, die zusätzlich Reverse Transkriptase-Aktivität besitzt. Eine weitere Möglichkeit besteht im gleichzeitigen Einsatz von AMV Reverser Transkriptase (RT-AMV) und *Taq* DNS-Polymerase. Im vorliegenden Fall wurden neben RT-AMV sowohl *Taq*- als auch *Pwo*-DNS-Polymerase (Titan One Tube RT-PCR System, Roche, Mannheim) eingesetzt, da durch eine Kombination beider Polymerasen sowohl Genauigkeit der Amplifikationsschritte als auch Ausbeute signifikant erhöht sind.

### **B.17.2 Kontrollreaktionen**

Die Detektion der mRNS eines bestimmten Gens erfordert eine Reihe von Kontrollreaktionen, die es erlauben, erhaltene RT-PCR-Produkte zweifelsfrei der transkribierten RNS zuzuordnen. Zum einen muss ausgeschlossen werden, dass sich noch Reste von DNS in der Probe befinden, die – unabhängig von der Anwesenheit der Ziel-mRNS – zu einer Amplifikation des entsprechenden Gens und demnach zu einer positiven Reaktion führen würde. Dies lässt sich durch eine vorangehende PCR ausschließen, bei der nur durch die Zugabe von *Taq*-

Polymerase, aber unter Ausschluss der Reversen Transkriptase ausschließlich DNS, aber keine RNS amplifiziert werden würde. Zum anderen muss die Spezifität der Primer mit vorangehenden PCR-Reaktionen getestet werden. Als Negativkontrolle sollte nach DNase- sowie RNase-Verdau keine Bande mehr detektierbar sein.

### B.17.3 Verwendete Primer

Die verwendeten Primer sind in Tabelle 4 aufgeführt.

**Tab. 4:** Verwendete PCR-Primer; F = Vorwärtsprimer (bindet an die mRNS); R = Rückwärtsprimer (bindet an die cDNS)

Name	Sequenz
<i>iap</i> -TN-F (Bubert <i>et al.</i> , 1992)	5'-TTC-TTC-TTC-AAT-TTA-TGT-AGG-3'
<i>iap</i> -TN-R (Bubert <i>et al.</i> , 1992)	5'-TTT-TCC-AAG-GTG-TTT-TTG-AGC-3'
<i>plcB</i> -F (Vazquez-Boland <i>et al.</i> , 1992)	5'-ATG-AAA-TTC-AAA-AAG-GT-3'
<i>plcB</i> -R (Vazquez-Boland <i>et al.</i> , 1992)	5'-ATT-TGT-TTT-TTT-AGA-CC-3'

### B.17.4 Standardansatz und Reaktionsführung für die Durchführung der RT-PCR

Für diese Technik wurde ein Thermocycler (Primus Cycler 96, MWG Biotech AG, Ebersberg, Germany) eingesetzt. Alle Reagenzien wurden mit Ausnahme der PCR-Primer (Interactiva, Ulm) von der Betreiberfirma (Roche, Mannheim) bezogen. Alle Reagenzien wurden nach Herstellerangaben vermischt und in die „one-step RT-PCR“ eingesetzt. Für die Durchführung der PCR wurden folgende Programme eingesetzt.

---

### Reaktionsschema für das Primerpaar *iap*-TN-F/R

Reverse Transkription	45°C	30 min		
Einleitende Denaturierung	94°C	3 min		
Denaturierung	94°C	10 s	}	10x
Annealing	45°C	30 s		
Elongation	68°C	45 s		
Denaturierung	94°C	10 s	}	25 x
Annealing	45°C	30 s		
Elongation	68°C	45 s + 5 s je Zyklus		
Abschließende Elongation	68°C	7 min		

### Reaktionsschema für das Primerpaar *plcB*-F/R

Reverse Transkription	45°C	30 min		
Einleitende Denaturierung	94°C	3 min		
Denaturierung	94°C	10 s	}	10x
Annealing	54°C	30 s		
Elongation	68°C	45 s		
Denaturierung	94°C	10 s	}	25 x
Annealing	54°C	30 s		
Elongation	68°C	45 s + 5 s je Zyklus		
Abschließende Elongation	68°C	7 min		

Kontroll-PCR-Reaktionen ohne die Zugabe von Reverser Transkriptase wurden wie oben beschrieben durchgeführt, auf eine anfängliche Inkubation für 30 min bei 45°C wurde verzichtet.

## C Ergebnisse

### C.1 Listerien-Infektionsstudien mit Acanthamöben

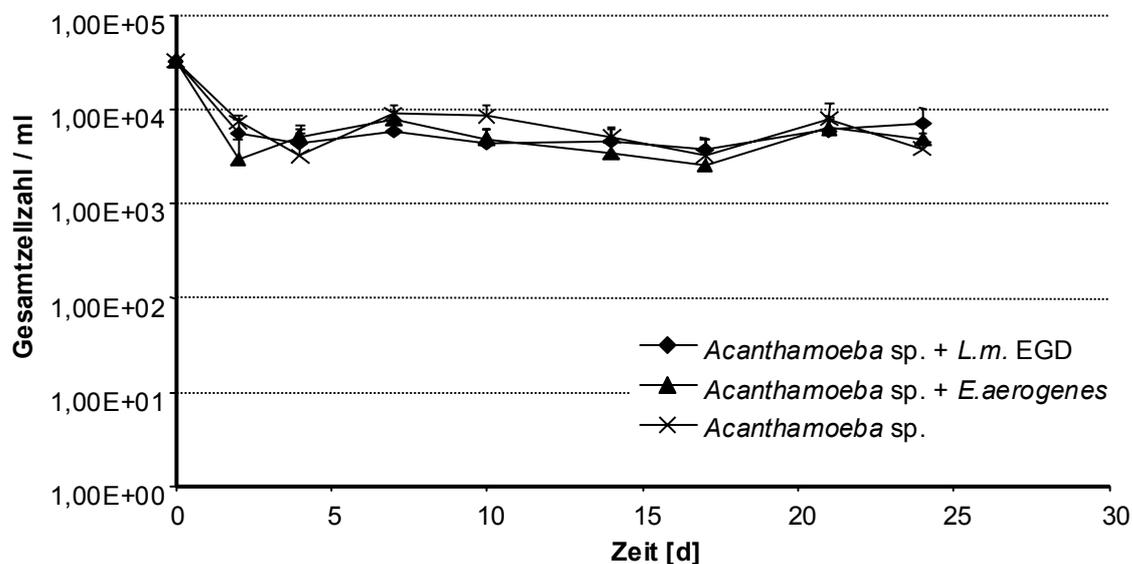
Acanthamöben sind ein vielbeschriebenes Modellsystem zur Untersuchung der Vermehrung pathogener Mikroorganismen in niederen Eukaryonten, das aber für jeden Mikroorganismus neu entwickelt und angepasst werden muss (Barker und Brown, 1994; Cirillo *et al.*, 1997; Gustafsson, 1989; Inglis *et al.*, 2000; Marolda *et al.*, 1999; Rowbotham, 1980; Steinert *et al.*, 1998; Thom *et al.*, 1992; Winiecka-Krusnell und Linder, 2001; Winiecka-Krusnell *et al.*, 2002). In der vorliegenden Arbeit beschäftigte ich mich eingehend mit der Vermehrungsfähigkeit von *L. monocytogenes* in diesen Protozoen.

Ein Infektionsassay mit Acanthamöben gestaltet sich grundlegend verschieden von bislang etablierten Zellkulturstudien mit Säugerzelllinien, da der Versuch in einem Zeitrahmen von mehreren Tagen bis Wochen abläuft und sich zudem Amöben in Kultur anders verhalten als Säugerzellen. Aus diesem Grund musste der in dieser Arbeit angewendete Infektionsassay zunächst etabliert und optimiert sowie die erhaltenen Ergebnisse durch zahlreiche Kontrollen abgesichert werden.

#### C.1.1 Einfluss von *L. monocytogenes* auf die Amöbenzellzahl

Bei den Versuchen wurde jeweils eine bestimmte Menge an *L. monocytogenes*-Zellen zusammen mit Acanthamöben in Zellkulturschalen inkubiert. Um den Einfluss von *L. monocytogenes* auf die Amöben genauer verfolgen zu können, wurden in Kontrollversuchen Amöben ohne die Zugabe von Bakterien als auch nach Zugabe von *Enterobacter aerogenes*, einem Organismus, der in der Regel als Futterbakterium für nicht axenisch kultivierte Amöben dient, inkubiert. In keinem der Ansätze waren signifikante Unterschiede hinsichtlich der Amöbenzellzahl detektierbar. Eine Vermehrung der Amöben war entgegen den Erwartungen auch nicht nach Zugabe der Futterbakterien zu verzeichnen (Abb. 11). Zudem verhielten sich die Amöben in allen Versuchen ähnlich, eine Encystierung (die Assays wurden ohne die Zugabe von Nährstoffen im Medium

durchgeführt (B.7.1)) war jeweils zum selben Zeitpunkt (nach einigen Tagen) zu beobachten.



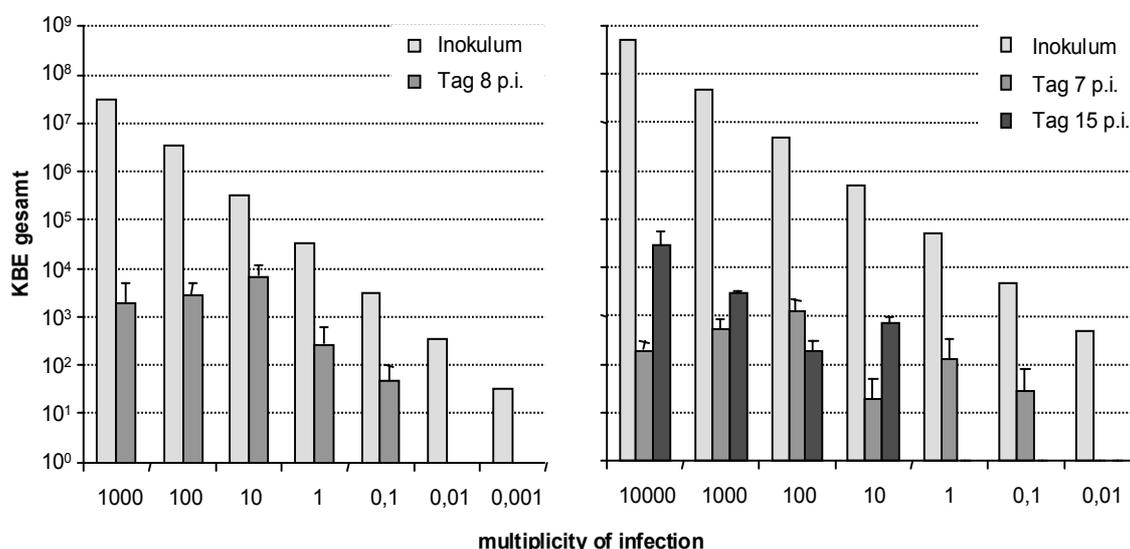
**Abb. 11:** Im Infektionsassay über den Zeitverlauf bestimmte Zahl an Amöbenzellen. Die Amöben wurden mit *L. monocytogenes* Wildtyp (EGD) oder *E. aerogenes* (MOI=100) bzw. ohne die Zugabe von Bakterien inkubiert. *L.m.*: *L. monocytogenes*. Werte jeweils gemittelt aus Triplikaten; die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung aus drei Werten. Der Assay wurde bei 18°C durchgeführt.

## C.1.2 Optimierung und Evaluierung des Infektionsassays

### C.1.2.1 Bestimmung der optimalen „multiplicity of infection“ (MOI)

Ein entscheidender Parameter bei Infektionsstudien mit Eukaryontenzellen ist das Verhältnis aus Bakterien- und Wirtszellen, d.h. die Zahl der Bakterien, die pro Wirtszelle zugegeben werden. Dieses Verhältnis wird durch die sogenannte „multiplicity of infection“, kurz MOI, ausgedrückt. In dieser Arbeit wurde bezüglich des Infektionsassays mit Acanthamöben die optimale MOI bestimmt, indem Amöben mit *L. monocytogenes* in einer MOI zwischen 10 und 1000 infiziert wurden. Mit diesen MOIs wurde ein Infektionsassay über einen Zeitraum von 26 Tagen durchgeführt. Als optimal für die Durchführung des Assays erwies sich eine MOI von 100, da hier über den gesamten Zeitverlauf lebende *L. monocytogenes*-Zellen detektierbar waren. Eine Erhöhung der MOI auf 1000 brachte keine Steigerung der intrazellulären Zellzahlen im Vergleich zu einer MOI von 100.

In einem weiteren Versuch sollte durch eine Reduzierung der MOI untersucht werden, ob bei einer niedrig gewählten MOI eine Nettovermehrung der zugesetzten Bakterien nachzuweisen ist. Hierfür wurden *L. monocytogenes*-Zellen in einer MOI zwischen 0,01 und 10000 ( $10^{-2}$ ,  $10^{-1}$ ,  $10^0$ ,  $10^1$ ,  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$ ) zugegeben. Intrazelluläre Bakterien wurden nach Gentamicin-Behandlung sieben bzw. acht und 15 Tage nach Infektion (p.i.) geerntet und die jeweilige bakterielle Zellzahl durch Plattierung geeigneter Verdünnungsstufen bestimmt. Die Zahl der Bakterien war im Vergleich zum Ausgangsinokulum deutlich verringert, es war aber mit Ausnahme der MOI von 100 bei hohen MOIs eine Zunahme der bakteriellen Zellzahlen zwischen Tag sieben und Tag 15 zu verzeichnen. Bei niedrigen MOIs (bis 0,1) waren nach sieben Tagen Inkubation noch Listerien detektierbar, eine stabile Infektion über den gesamten Zeitraum von 15 Tagen manifestierte sich jedoch nicht. Eine Nettozunahme der Zellzahlen nach Koinkubation mit Amöben im Vergleich zur eingesetzten Zellzahl wurde bei keiner der untersuchten MOIs beobachtet (s. Abb. 12).



**Abb. 12:** Zellzahlen von *L. monocytogenes* EGD-e im Amöben-Infektionsassay bei einer Temperatur von 18°C in Abhängigkeit von der Zahl der eingesetzten Zellen. Dargestellt sind hier die eingesetzten Zellzahlen (□) sowie die Zellzahlen nach 7 bzw. 8 Tagen (■) und 15 Tagen (■) Inkubation. KBE: Koloniebildende Einheiten. Werte jeweils gemittelt aus Triplikaten; die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung aus drei Werten.

---

### **C.1.2.2 Bestimmung der bakteriziden Konzentration an Gentamicin zur vollständigen Abtötung aller extrazellulären Bakterien**

Bei dem vorliegenden Assay musste aufgrund der zu beobachtenden Ablösung der Amöben vom Schalenboden auf Waschschriffe zur Entfernung von extrazellulären Bakterien verzichtet werden. Daher war die Behandlung mit geeigneten Antibiotika zur Abtötung aller extrazellulären Listerien für die durchgeführten Versuche von essentieller Bedeutung. Eine geeignete Menge an *L. monocytogenes*-Zellen wurde in 12-Well-Kulturschalen, die auch für die in B.7 beschriebenen Infektionsstudien verwendet wurden, in 1x Page's Saline ohne die Zugabe von Amöben inkubiert und die Wirksamkeit des verwendeten Antibiotikums Gentamicin getestet. Es ist hier nicht ausreichend, frische *L. monocytogenes*-Kulturen auf die Sensitivität gegenüber Gentamicin zu testen, da eine erhöhte Antibiotikaresistenz mit dem Eintritt in die Hungerphase einhergeht (z.B. Buncic *et al.*, 2001; White *et al.*, 2002). Daher wurden zu verschiedenen Zeitpunkten in einem Zeitrahmen von 24 Tagen in Page's Saline inkubierte Listerien mit verschiedenen Konzentrationen an Gentamicin (10, 30, 100, 300, 1000 µg/ml) versetzt und unterschiedlich lange inkubiert (1, 2, 3, 4 h). Nach der jeweiligen Inkubationszeit wurden die Listerien geerntet und in verschiedenen Verdünnungsstufen auf BHI-Agar ausplattiert. Basierend auf diesen Zeit- und Konzentrationsreihen erschien eine Gentamicinkonzentration von 300 µg/ml sowie eine Inkubationszeit von 4 h optimal für die Abtötung aller nicht durch Amöben geschützten, extrazellulären Bakterien (Ergebnisse nicht gezeigt). Dieser Wert bezieht sich auf eine Inkubationstemperatur von 37°C. Die bakterizide Wirkung des Gentamicins reduziert sich jedoch drastisch bei Absenkung der Temperatur (Traub *et al.*, 1983; diese Arbeit). Daher musste die Konzentration an Gentamicin bei Inkubationen bei 18°C auf 500 µg/ml erhöht werden. Diese Werte gelten für alle in dieser Arbeit verwendeten Bakterien, d.h. *L. monocytogenes* sowie *Enterobacter aerogenes*. Durch die Inkubation von Acanthamöben in Anwesenheit von Gentamicin für vier Stunden in den entsprechenden Konzentrationen und anschließende mikroskopische Kontrolle konnte kein sichtbarer Einfluss des Antibiotikums auf die Morphologie der Amöben beobachtet werden. Neben diesen Vorversuchen wurden zusätzlich zeitgleich mit den jeweiligen Probenahmezeitpunkten in jeder Infektionsreihe Kontrollen

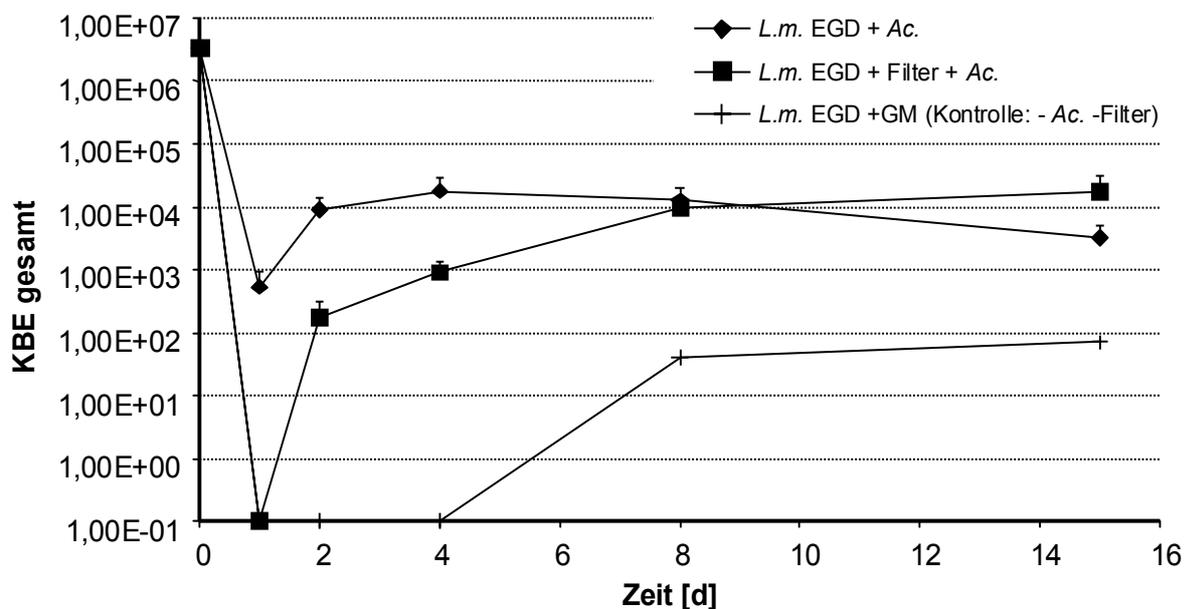
Odurchgeführt, in denen über den gesamten Zeitverlauf Bakterienzellen ohne die Zugabe von Amöben mitinkubiert wurden und wie die Infektionsansätze mit Gentamicin behandelt und anschließend ausplattiert wurden. In diesen Ansätzen sollten keine bzw. vernachlässigbar geringe Mengen an lebensfähigen Listerien-Zellen nachweisbar sein.

### **C.1.2.3 Einfluss von Acanthamöben auf die bakterizide Wirkung von Gentamicin**

Trotz der oben beschriebenen bakteriziden Wirkung des Antibiotikums auf *L. monocytogenes*-Reinkulturen könnte die Anwesenheit von Amöben bei den durchgeführten Infektionsstudien die bakterizide Wirkung von Gentamicin einschränken. Daher wurden wie in B.7.3 beschrieben  $1,3 \times 10^7$  *L. monocytogenes*-Zellen durch einen bakteriendichten Filter getrennt in 6-Well-Multischalen mit  $1,3 \times 10^5$  Amöben (MOI=100) inkubiert. Im Verhältnis zur größeren Bodenfläche dieser Schalen wurden entsprechend mehr Listerien- und Amöbenzellen als in den für die Infektionsstudien eingesetzten 12-Well-Schalen zugesetzt. Diese kleineren Schalen konnten hier nicht verwendet werden, da Einsätze mit bakteriendichten Filtern in dieser Größe nicht erhältlich waren. Der Versuch wurde bei zwei verschiedenen Temperaturen durchgeführt (18 und 37°C). In den 6-Well-Multischalen konnte überraschenderweise im Gegensatz zu den 12-Well-Schalen auch ohne die Anwesenheit von Amöben keine quantitative Wirkung des Antibiotikums erreicht werden (s. Abb. 13). Dieser Faktor erschwert die Interpretation der erhaltenen Ergebnisse. Dennoch ist bei einer Temperatur von 18°C nach Gentamicin-Behandlung in allen Ansätzen ein deutlicher Anstieg der *L. monocytogenes*-Zellzahlen nach zwei Tagen Koinkubation mit Acanthamöben zu verzeichnen. Bei Kontrollversuchen, bei denen *L. monocytogenes* ohne die Anwesenheit eines abtrennenden Filters zusammen mit Amöben inkubiert wurde, war die detektierte bakterielle Zellzahl zu Beginn des Versuchs deutlich höher als in den Ansätzen, in denen Amöben und Listerien durch einen bakteriendichten Filter voneinander getrennt waren. In letzterem Fall waren nach einem Tag Inkubation keine Bakterien detektierbar. Nach einem Inkubationszeitraum von drei bis vier Tagen konnten jedoch in den Schalen, in denen Amöben und Listerien

räumlich durch den Filter getrennt inkubiert worden waren, vergleichbar hohe Zellzahlen ermittelt werden (Abb. 13).

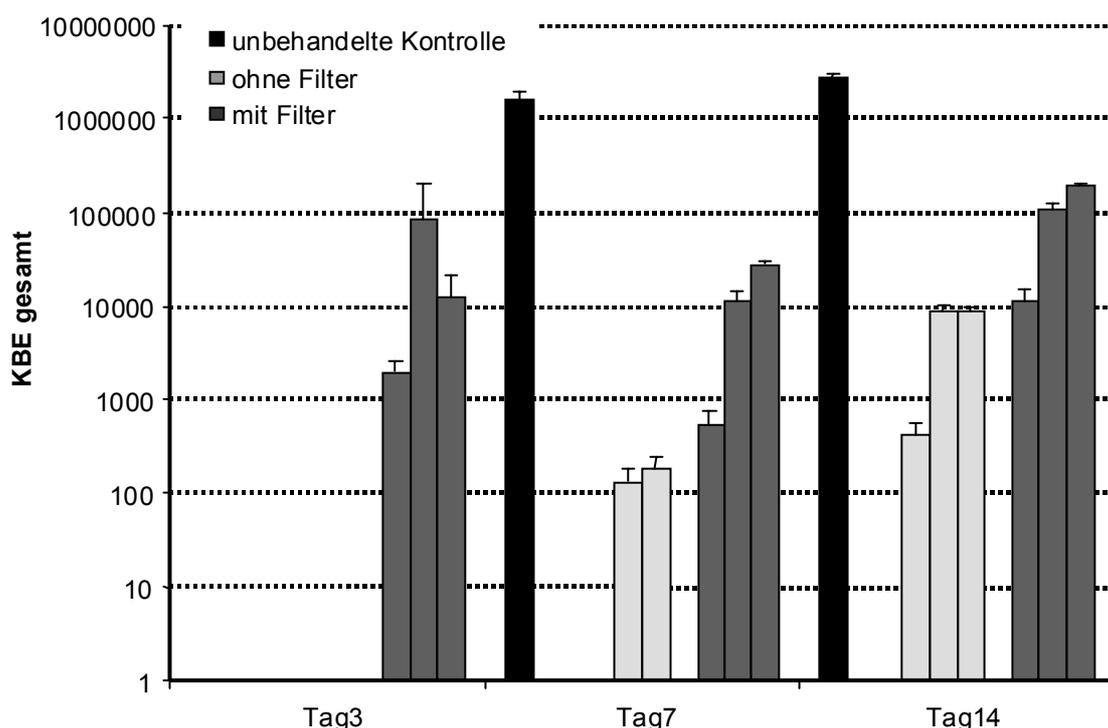
Bei einer Inkubationstemperatur von 37°C konnten bereits beim ersten Probenahmezeitpunkt nach einem Tag in keinem der Ansätze, auch ohne die Anwesenheit eines die Zellen voneinander trennenden Filters, lebende Bakterien detektiert werden (Ergebnisse nicht gezeigt). Dies kann vermutlich auf die bessere Wirksamkeit des Gentamicins bei 37°C zurückgeführt werden. In Negativkontrollen, in denen statt Listerien *E. aerogenes*-Zellen mit Amöben inkubiert wurden, waren bei keiner der untersuchten Inkubationstemperaturen, ob mit oder ohne bakteriendichten Filter, lebende bakterielle Zellen vorhanden (Ergebnisse nicht gezeigt).



**Abb. 13:** Wirkung eines Amöben und Listerien trennenden Filters auf die bakterielle Zellzahl bei 18°C. Werte jeweils gemittelt aus Triplikaten. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung aus je drei Messwerten. KBE: Koloniebildende Einheiten. *L.m.*: *L. monocytogenes*; Ac.: *Acanthamoeba* sp. UWC1; GM: Gentamicin.

Aufgrund der oben erwähnten reduzierten Wirksamkeit des Gentamicins in diesem Versuch wurde in einem weiteren Ansatz untersucht, ob die Anwesenheit des bakteriendichten Filters die Wirkung des Antibiotikums schmälert. Dazu wurden wie oben  $1,3 \times 10^7$  *L. monocytogenes*-Zellen in 6-Well-Schalen (Nunc, Wiesbaden) in Anwesenheit eines Filters, hier aber ohne die Zugabe von Amöben bei 18°C

inkubiert, nach drei, sieben und 14 Tagen Inkubationszeit mit Gentamicin behandelt und in geeigneten Verdünnungsstufen ausplattiert. Als Kontrollen dienten 6-Well-Schalen, in die kein Filter eingesetzt worden war. Es wurden jeweils Gentamicinmengen von 250, 500 und 750 µg/ml eingesetzt, sowie durch eine unbehandelte Kontrolle an den Tagen sieben und 14 die Zahl der überlebenden Bakterien bestimmt. Eine quantitative abtötende Wirkung des Antibiotikums wurde nur in den Ansätzen ohne Zugabe eines Filters erreicht (Abb. 14). Sobald ein Filter zugesetzt worden war, konnte nur eine Reduktion der bakteriellen Zellzahlen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle ca. um den Faktor 10 erreicht werden. Bei längeren Inkubationszeiten waren sogar in den Ansätzen ohne die Verwendung eines Filters lebende Zellen vorhanden, jedoch bedeutend weniger als dies durch den Einsatz der Filter der Fall war. Überraschenderweise waren bei erhöhten Gentamicinkonzentrationen meist auch mehr lebende Bakterien detektierbar.



**Abb. 14:** Wirkung von Gentamicin auf die Überlebensfähigkeit von *L. monocytogenes* in Anwesenheit eines Filters. Dargestellt sind jeweils detektierte Zellzahlen nach Inkubation mit 250, 500 und 750 µg/ml Gentamicin zu drei verschiedenen Erntezeitpunkten. □: *L. monocytogenes* EGD-e ohne Zugabe eines Filters; ■: *L. monocytogenes* EGD-e mit Filtereinsatz; ■: *L. monocytogenes*-Zellzahlen ohne Zugabe von Gentamicin. Inkubationstemperatur: 18°C; Werte jeweils gemittelt aus Triplikaten; die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung aus drei Werten.

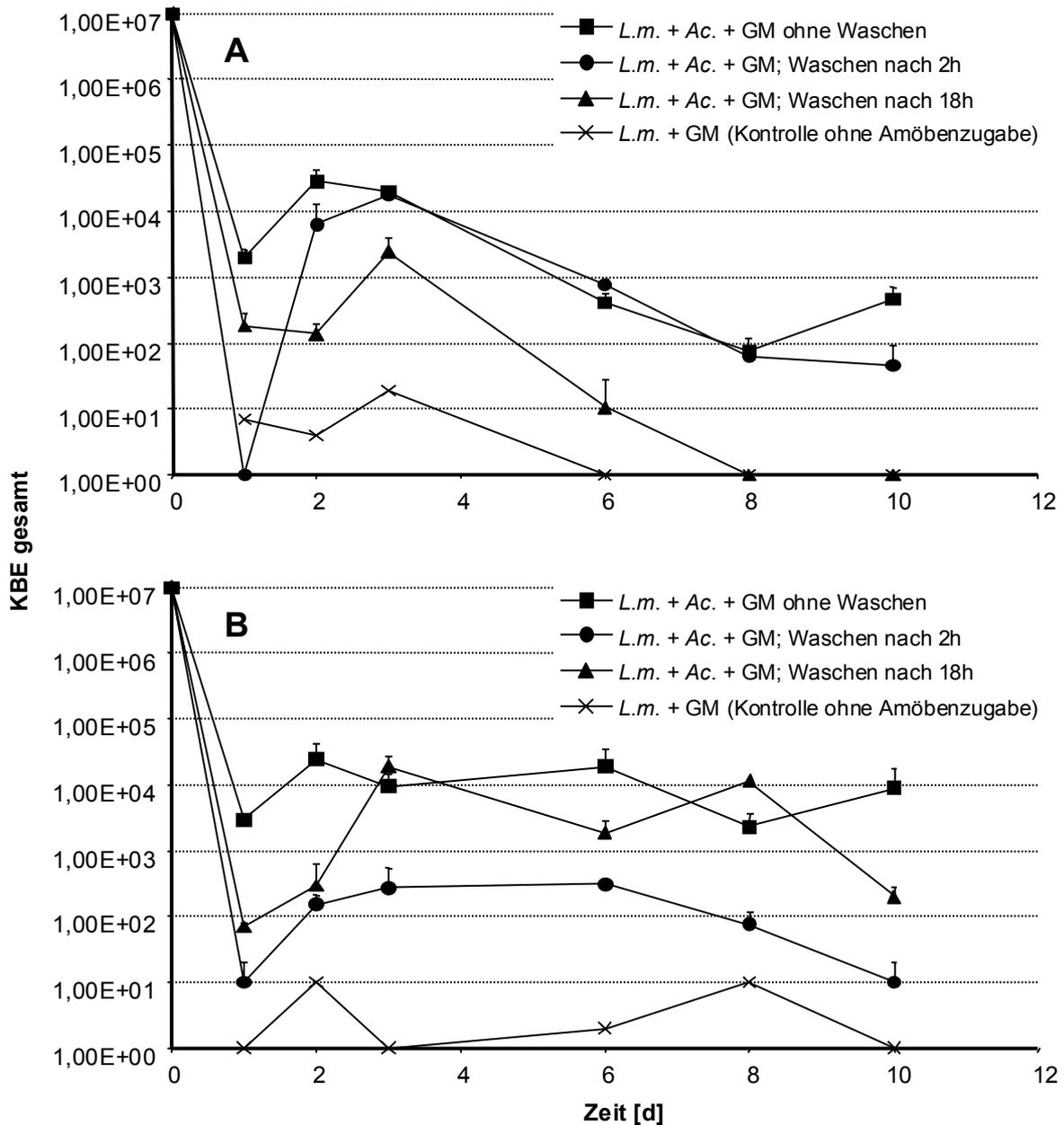
---

#### C.1.2.4 Untersuchungen zur intrazellulären Vermehrung von *L. monocytogenes* in Acanthamoeben

Aufgrund der bisher durchgeführten Versuche zeigte sich, dass die Anzahl der intrazellulär detektierbaren, überlebensfähigen *L. monocytogenes*-Zellen nach einem kurzen Absinken eine relativ konstante Zellzahl über einen längeren Zeitraum einnimmt (s. Abb. 16). Da die Bakterien im Überschuss im Vergleich zu den Amöben vorliegen (MOI = 100), könnte diese gleichbleibende Zellzahl aus der Abtötung der intrazellulären sowie einer ständigen Neuaufnahme extrazellulär vorhandener, noch lebender Bakterien resultieren. Werden also zu einem bestimmten Zeitpunkt die Wirtszellen lysiert und die daraus freigesetzten Listerien auf BHI-Agar ausplattiert, so könnten alle kurz vorher von den Amöben aufgenommenen aber noch nicht abgetöteten Bakterien für die gleichbleibend hohe Zellzahl verantwortlich sein. Diese Theorie sollte durch die Entfernung aller nach erfolgter Infektion extrazellulär vorhandenen Bakterien überprüft werden. Dazu wurden die Ansätze dreimal mit 1x Page's Saline gewaschen, so dass alle zu diesem Zeitpunkt extrazellulären Bakterien aus dem Ansatz entfernt wurden. Amöben heften sich zunächst am Boden der Kulturschale an, lösen sich aber im Infektionsverlauf zunehmend von Schalenboden ab, so dass dieser Waschschriff nur einmal zu Beginn der Versuches durchgeführt werden konnte. Da der genaue Zeitpunkt, bei dem eine erste Interaktion der Listerien mit Amöben stattfindet, nicht bekannt ist, wurde der Waschschriff zu zwei verschiedenen Zeitpunkten (2 h, 18 h nach Zugabe der Bakterien) durchgeführt. In einem ersten Versuch konnte zum einen eine deutliche Vermehrung von *L. monocytogenes* in den Kulturschalen gezeigt werden, die nach zwei Stunden Koinkubation gewaschen worden waren. Die nach Antibiotika-Behandlung bestimmte Listerien-Zellzahl war zunächst unterhalb der Nachweisgrenze, erreichte aber nach zwei Tagen Inkubation Zellzahlen im Bereich der ohne Waschschriffe inkubierten Kontrollansätze (Abb. 15-A). Im Gegensatz dazu konnte in den Ansätzen, bei denen extrazelluläre Listerien erst nach 18 Stunden entfernt worden waren, nach zwei Tagen nur ein geringfügiger Anstieg der intrazellulären Zellzahlen gezeigt werden. Die im Vergleich zu den nach zwei Stunden gewaschenen Ansätzen deutlich höheren Zellzahlen der Ansätze, die erst nach 18 Stunden gewaschen worden waren, am ersten Tag nach der Infektion sprechen jedoch dafür, dass zu diesem Zeitpunkt

deutlich mehr Listerien-Zellen intrazellulär in den Amöben vorhanden waren. In den nach 18 Stunden gewaschenen Ansätzen waren nach acht Tagen Koinkubation keine lebenden *L. monocytogenes*-Zellen mehr nachweisbar.

Aufgrund dieser widersprüchlichen Ergebnisse wurde der oben beschriebene Versuch bei identischen Bedingungen mit denselben Inokula wiederholt (Abb. 15-B). Hier ergab sich ein anderes Bild hinsichtlich der Vermehrung von *L. monocytogenes* in Amöbenzellen sowie dem Effekt der beschriebenen Waschschriffe auf die determinierten Zellzahlen bei den nachfolgenden Erntezeitpunkten. Auch in dieser Versuchsreihe waren nach einem Tag Koinkubation mehr Zellen in den nach 18 Stunden gewaschenen Ansätzen detektierbar als es in den nach zwei Stunden gewaschenen der Fall war. Eine stabile Infektion mit über den gesamten Versuchszeitraum von zehn Tagen signifikant hohen Mengen an lebensfähigen *L. monocytogenes*-Zellen etablierte sich jedoch im Widerspruch zum oben beschriebenen Infektionsassay nur in den Kulturschalen, in denen extrazellulär vorhandene Listerien erst nach 18 Stunden aus dem Assay entfernt worden waren. In den nach zwei Stunden gewaschenen Schalen konnten sich die Listerien hier noch um ca. 1,5 Zehnerpotenzen vermehren, eine stabile Infektion jedoch nicht über den gesamten Versuchszeitraum aufrechterhalten.



**Abb. 15:** Im Amöbenassay bei 18°C bestimmte *L. monocytogenes*-Zellzahlen nach Entfernung aller extrazellulär im Puffer vorhandenen Bakterienzellen durch Waschschriffe. **A, B:** zwei identisch durchgeführte Versuchsreihen. Werte jeweils gemittelt aus Triplikaten; die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung aus drei Werten. KBE: Koloniebildende Einheiten; *L.m.*: *L. monocytogenes*; *Ac.*: *Acanthamoeba* sp. UWC1; GM: Gentamicin

Wie aus Abbildungen 15-A und 15-B ersichtlich, kommen beide identisch, aber unabhängig voneinander durchgeführten Experimente zu partiell unterschiedlichen Ergebnissen. Beide Versuche zeigen jedoch, dass sowohl in den nach zwei Stunden als auch in den nach 18 Stunden gewaschenen Infektionsansätzen ein

Anstieg der restlichen nach Waschen noch vorhandenen Bakterien um mindestens eine Größenordnung in den Amöben zu verzeichnen war.

#### **C.1.2.5 *Enterobacter aerogenes* als Negativkontrolle**

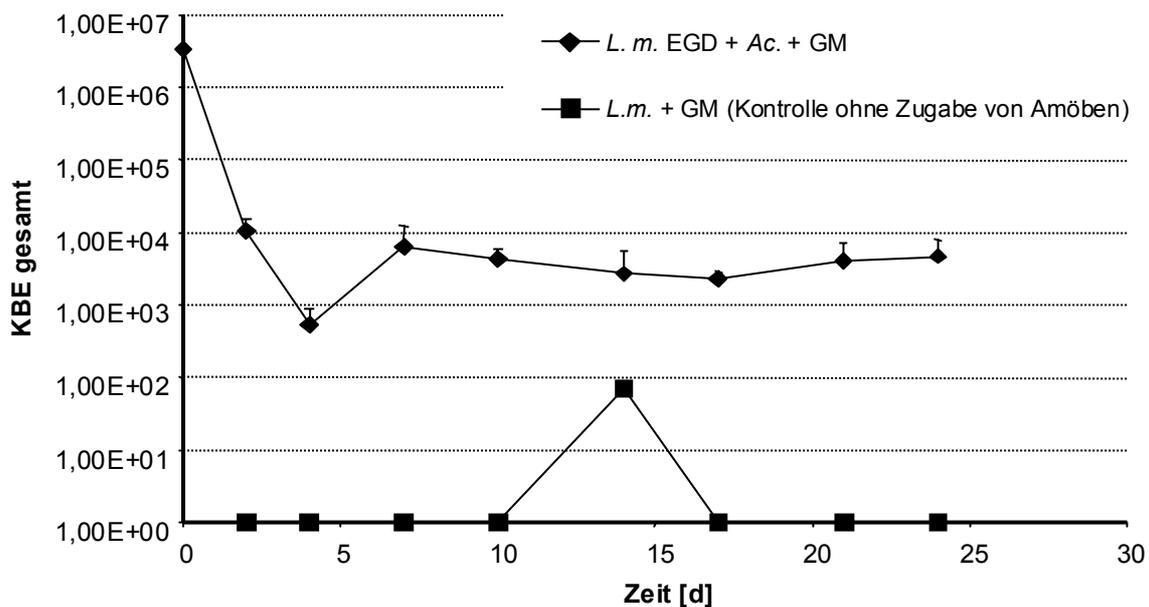
Die Spezifität des Assays sollte durch einen Vergleich der detektierbaren *L. monocytogenes*-Zellzahlen mit den Zahlen anderer bakterieller Spezies genauer untersucht werden. In diesem Fall diente *Enterobacter aerogenes* als Negativkontrolle, da diese Bakterien in der Regel als Futterbakterien für nicht axenisch kultivierte *Acanthamoeba* spp. verwendet werden und sich dementsprechend nicht intrazellulär vermehren können sollten. Mit Hilfe des hier vorgestellten Infektionsassays konnten wie erwartet bei keinem der durchgeführten Versuche unabhängig von der Versuchstemperatur lebende *E. aerogenes*-Zellen detektiert werden (Ergebnisse nicht gezeigt).

---

### C.1.3 Anwendung des Assays

#### C.1.3.1 *L. monocytogenes* EGD in Acanthamoeben

Trotz der oben dargestellten Schwierigkeiten hinsichtlich der Optimierung des Infektionsassays konnte bei einer Infektion von Acanthamoeben mit *L. monocytogenes* EGD immer der gleiche Kurvenverlauf beobachtet werden. Nach einem kurzen Abfall der intrazellulär detektierbaren plattierfähigen Organismen in den ersten Tagen der Infektion stieg die Zellzahl erneut an und erreichte anschließend ein stabiles Niveau, in dessen Bereich *L. monocytogenes* EGD über Zeiträume von mehreren Wochen detektierbar war. Dieser Kurvenverlauf ist exemplarisch in Abb. 16 dargestellt. In allen weiteren Infektionsstudien wurde parallel zu den zu untersuchenden Stämmen ein Infektionsassay mit *L. monocytogenes* EGD-e als Positivkontrolle durchgeführt.



**Abb. 16:** Zellzahlen von *L. monocytogenes* EGD-e im Amöbenassay (MOI=100) bei einer Temperatur von 18°C. Werte jeweils gemittelt aus Triplikaten; die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung aus drei Werten. KBE: Koloniebildende Einheiten; *L.m.*: *L. monocytogenes*; Ac.: *Acanthamoeba* sp. UWC1; GM: Gentamicin

### C.1.3.2 Temperaturabhängigkeit der Persistenz von *L. monocytogenes* in Acanthamöben

In früheren Studien wurde die temperaturabhängige Regulation listerieller Virulenzgene, die nur bei erhöhten Temperaturen ähnlich denen warmblütiger Säugetiere exprimiert werden, beschrieben (z.B. Leimeister-Wächter *et al.*, 1992). Daher wurde der oben beschriebene Infektionsassay bei zwei verschiedenen Temperaturen (18, 37°C) durchgeführt. Als repräsentativ erachtet wurden in diesem Zusammenhang Temperaturen, die durchschnittlich in der Umwelt zu beobachten sind – Habitate, in denen Acanthamöben gemeinsam mit *Listeria* spp. vorkommen (18°C) –, als auch die, bei der listerielle Virulenzgene im homoiothermen Wirt exprimiert werden (37°C). Interessanterweise konnten mit Hilfe des Infektions-Assays nur bei 18°C lebende *L. monocytogenes*-Zellen detektiert werden (vgl. Abb. 16). Bei 37°C wurden diese Bakterien durch die Antibiotika-Behandlung abgetötet und waren nicht detektierbar (Ergebnisse nicht gezeigt). Bei einer Temperatur von 37°C sind Listerien in Anwesenheit von Amöben also nicht intrazellulär vor der bakteriziden Wirkung des verwendeten Antibiotikums Gentamicin geschützt.

### C.1.3.3 Verhalten von Vertretern der drei Genotypen in Acanthamöben

*L. monocytogenes* kann auf der Basis vergleichender Sequenzanalyse in drei distinkte Genotypen eingeteilt werden (s. A. Einleitung). Repräsentative Vertreter dieser drei Genotypen sollten hinsichtlich ihres Überlebens bzw. ihrer Vermehrung in Acanthamöben mit Hilfe des oben dargestellten quantitativen Infektionsassays untersucht werden. Hierzu wurden drei Serotypen aus *L. monocytogenes* ausgewählt, die jeweils Genotyp I (Typstamm EGD, sv 1/2a), II (sv 4b) bzw. III (sv 4a) zugeordnet sind. Ermittelte intrazelluläre Zellzahlen deuteten nicht auf spezifische Unterschiede zwischen den drei Genotypen hinsichtlich der Vermehrung in *Acanthamoeba* spp. hin. Alle drei untersuchten Stämme konnten vergleichbar hohe Zellzahlen in Amöben erreichen. Lebende Zellen waren auch nach längeren Inkubationszeiträumen von bis zu 40 Tagen noch in dem Assay detektierbar (Ergebnisse nicht gezeigt).

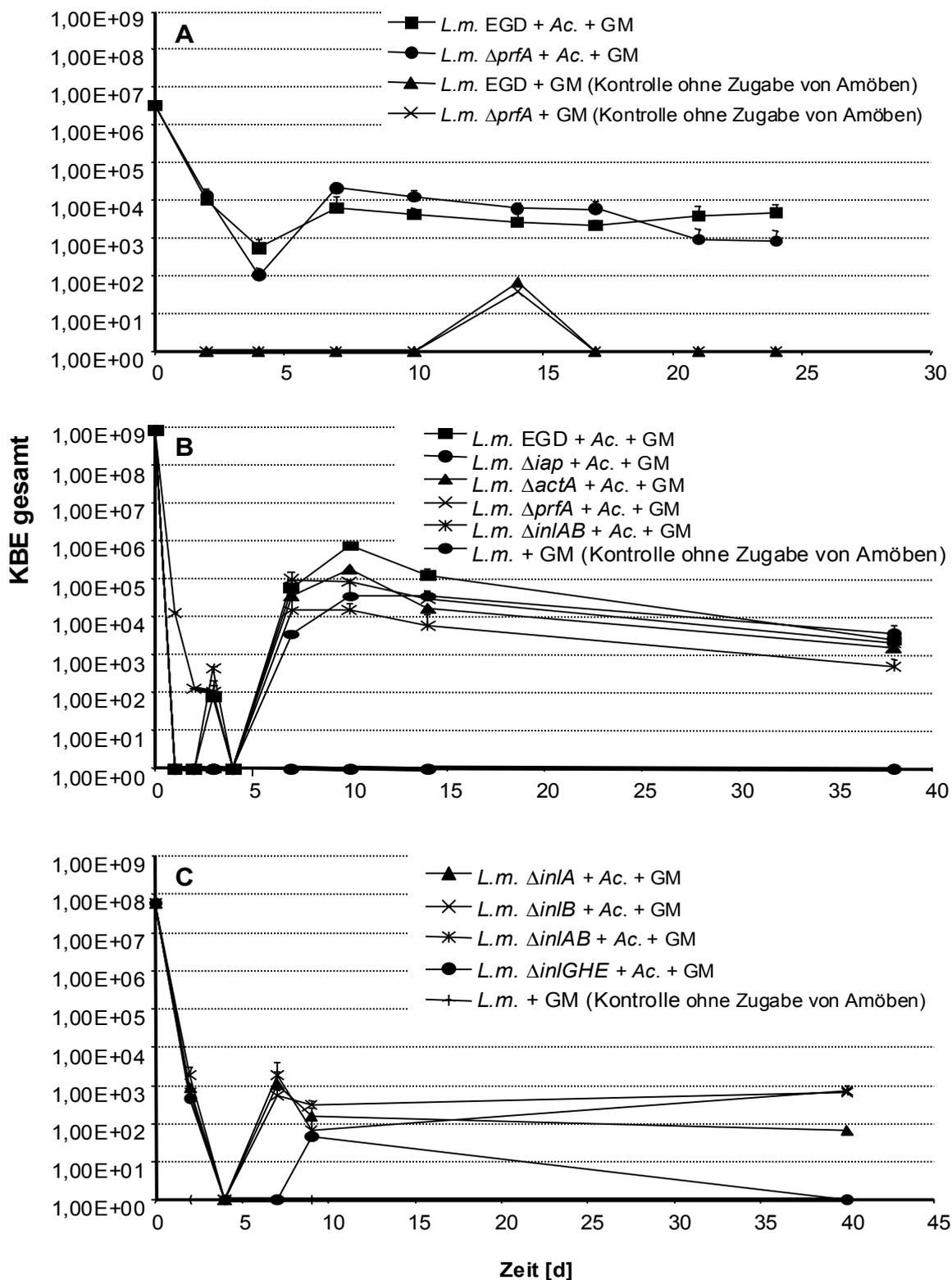
---

### C.1.3.4 Einfluss listerieller Virulenzgene auf das Überleben in Acanthamöben

Überleben bzw. intrazelluläre Vermehrung in Protozoen werden als eine Möglichkeit für fakultativ intrazelluläre Mikroorganismen angesehen ihr pathogenes Potenzial, d.h. den Besitz ihrer Virulenzgene, in der Umwelt aufrechtzuerhalten. Für etliche Bakterien wurde inzwischen die Bedeutung von Acanthamöben hinsichtlich einer Steigerung ihrer für Säugerzellen bestimmten Virulenz deutlich gemacht (siehe A. Einleitung). Daher sollte in der hier vorliegenden Studie die Bedeutung listerieller Virulenzgene für das Überleben in Acanthamöben untersucht werden. Hierzu standen eine Reihe von Virulenzgenmutanten zur Verfügung, die in Tab. 5 aufgeführt sind. Die Mutanten sind durch beeinträchtigte Funktionen in den genannten Eigenschaften charakterisiert.

**Tab. 5:** Verwendete *L. monocytogenes*-Virulenzgenmutanten und deren Eigenschaften in Säugerzellversuchen

Virulenzgenmutante	Defekt <i>in vitro</i> bzw. <i>in vivo</i> in Säugerzellen
$\Delta prfA$	keine Expression der PrfA-abhängigen Virulenzgene (Virulenzgencluster, Internaline), vollkommen apathogen <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i> (Mengaud <i>et al.</i> , 1991b)
pKP1	komplette Deletion des Virulenzgenclusters außer <i>prfA</i> ( $\Delta plcA$ , $\Delta actA$ , $\Delta plcB$ , $\Delta mpl$ , $\Delta hly$ )
$\Delta iap$	filamentös verlängerte Zellketten, unzureichende Zellteilung, geringfügig verringerte Virulenz in Zellkulturversuchen (Kolb-Mäurer <i>et al.</i> , 2001; Wisniewski und Bielecki, 1999)
$\Delta actA$	kein Cell-to-cell-spreading zu beobachten, deutlich attenuiert in Maus-Infektionsmodellen (Kocks <i>et al.</i> , 1992)
$\Delta inlA$	keine Adhäsion an die Wirtszelle, daher apathogen <i>in vitro</i> in Epithelzellen und Makrophagen, LD <sub>50</sub> um vier Größenordnungen verringert (Dramsi <i>et al.</i> , 1997; Mengaud <i>et al.</i> , 1996)
$\Delta inlB$	keine Adhäsion an Hepatocyten, daher apathogen <i>in vitro</i> in Hepatocyten (Dramsi <i>et al.</i> , 1995; Parida <i>et al.</i> , 1998)
$\Delta inlAB$	s.o.
$\Delta inlGHE$	<i>in vitro</i> keine die Virulenz beeinträchtigenden Effekte zu beobachten, Zellzahlen <i>in vivo</i> in Leber und Milz um ca. drei Größenordnungen verringert (Raffelsbauer <i>et al.</i> , 1998)



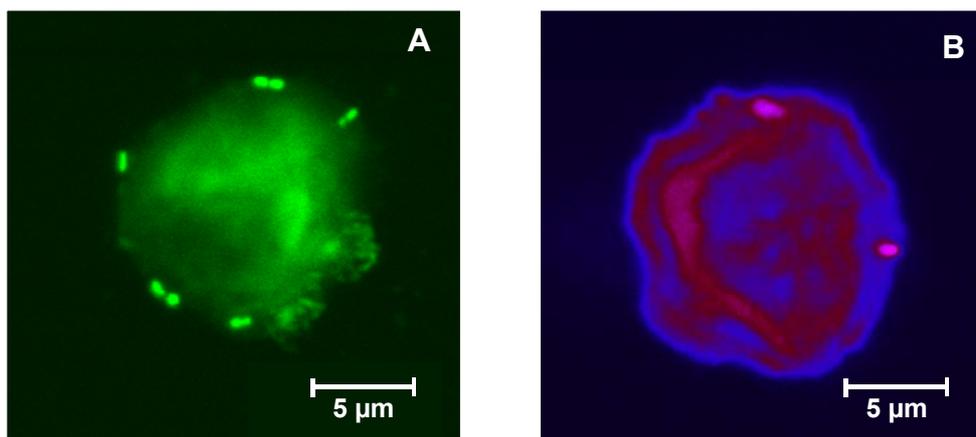
**Abb. 17:** Zellzahlen von Virulenzgenmutanten der Art *L. monocytogenes* in Acanthamoeben bei 18°C. Die Charakteristika der Mutanten sind in Tab. 5 aufgeführt. Werte jeweils gemittelt aus Triplikaten; die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung aus drei Werten. KBE: Koloniebildende Einheiten; *L.m.*: *L. monocytogenes*; Ac.: *Acanthamoeba* sp. UWC1; GM: Gentamicin;  $\Delta$ : Nullmutation im entsprechenden Gen

---

Interessanterweise waren alle oben angeführten *L. monocytogenes*-Mutanten mit Ausnahme der *inIGHE*-Mutante in den Amöben vor der Antibiotikabehandlung geschützt und konnten in den vorgestellten Infektionsassays Zellzahlen, die mit denen des Wildtyps vergleichbar waren, erreichen. Intrazelluläre Zellzahlen waren über den gesamten Versuchszeitraum von 38 Tagen in annähernd gleichen Mengen detektierbar. Im Gegensatz dazu war bei der *inIGHE*-Mutante nur ein kurzer und geringfügiger Anstieg der intrazellulären Zellzahlen nach neun Tagen Inkubation zu verzeichnen, eine dauerhafte Infektion etablierte sich hier nicht (Abb. 17-A, B, C).

#### **C.1.4 Mikroskopische Untersuchungen zum Nachweis der intrazellulären Lokalisation von *L. monocytogenes* in Amöbenzellen**

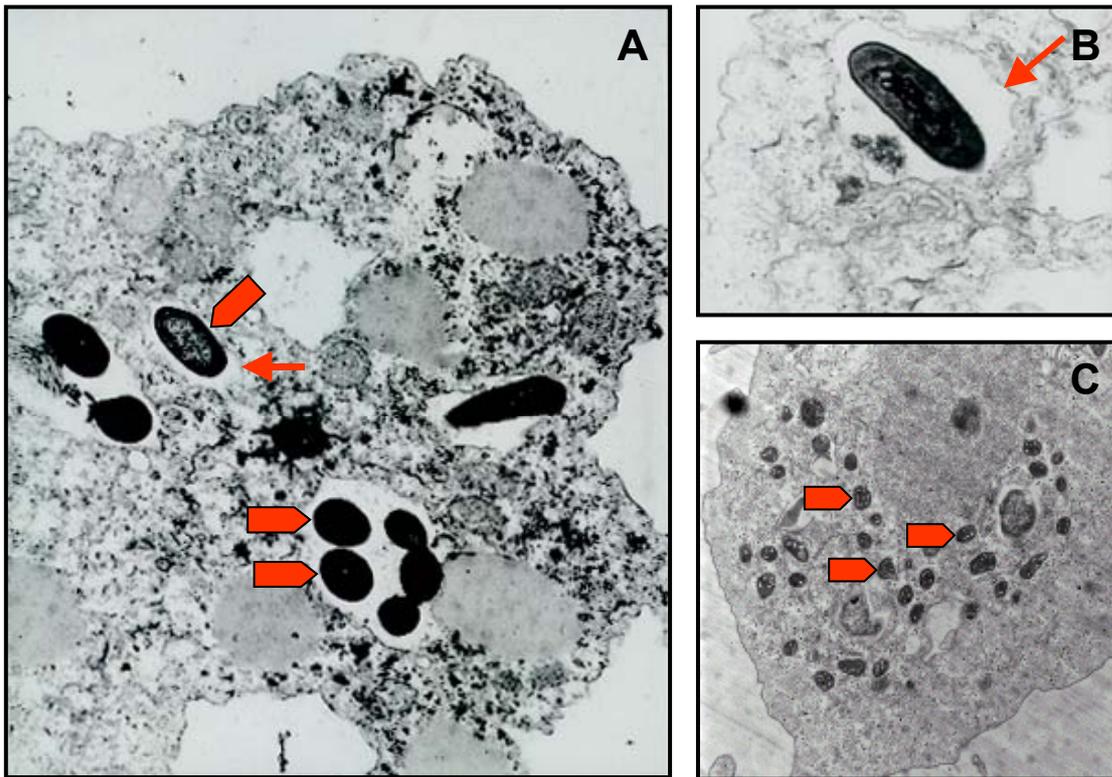
Aufgrund der Ergebnisse der oben vorgestellten quantitativen Infektionsstudien sollte die intrazelluläre Existenz von *L. monocytogenes* in Acanthamöben mikroskopisch untersucht werden. Dazu wurden *Acanthamoeba* sp. UWC1 zusammen mit *L. monocytogenes* in kleinen Kammern inkubiert, die auf Deckgläsern befestigt waren (Nunc, Wiesbaden). Diese Kammern ermöglichen mit Hilfe eines inversen Mikroskops eine direkte Beobachtung des Versuchsansatzes, ohne durch Fixierungs- oder Trocknungsvorgänge in das System eingreifen zu müssen. Durch Lebendbetrachtung der infizierten Amöben im Phasenkontrast konnten jedoch intrazelluläre Listerienzellen nicht zweifelsfrei detektiert werden. Aus diesem Grund wurden durch DAPI- bzw. SYBR GREEN-Färbung die Nukleinsäuren der Bakterien als auch der Amöben angefärbt und damit die Zellen sichtbar gemacht. Somit ließen sich mit Hilfe inverser konfokaler Laserscanning-Mikroskopie intrazellulär lokalisierte *L. monocytogenes*-Zellen nicht nur in Trophozoiten (nicht gezeigt), sondern auch innerhalb von Amöbencysten detektieren (Abb. 19). Auch nach einem Zeitraum von sechs Wochen konnten noch geringe Zellzahlen von ein bis zwei Bakterienzellen pro Amöbe intrazellulär in Cysten nachgewiesen werden (Abb. 19-B). Interessanterweise befanden sich die Listerien innerhalb der Cysten in der dicken Cystenwand.



**Abb. 19:** CLSM-Aufnahmen von infizierten Amöbencysten. **A, B:** Amöbencysten mit *L. monocytogenes*-Zellen in der Cystenwand. **A:** nach 10 Tagen Koinkubation; SYBR-Green-Färbung. **B:** nach 6 Wochen Koinkubation; DAPI-Färbung, Überlagerung von blauem DAPI-Signal und roter Autofluoreszenz.

### Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

Die durch Anfärbung von Nukleinsäuren mit Fluoreszenzfarbstoffen und anschließende Auswertung im CSLM erhaltenen Ergebnisse sollten durch Ultradünnschnitte der infizierten Amöben und anschließende Auswertung im Transmissionselektronenmikroskop (TEM) bestätigt werden. Listerien befinden sich auch nach längeren Inkubationszeiträumen innerhalb von Vakuolen in den Trophozoiten (Abb. 20). Mit Hilfe des TEM konnten nur infizierte Trophozoiten gefunden werden, Cysten, in denen sich *L. monocytogenes*-Zellen befanden, waren nicht detektierbar. Die intrazelluläre Existenz von *L. monocytogenes* in Acanthamöben wurde in einem Kontrollversuch, bei dem statt der Listerien *Enterobacter aerogenes* zugegeben wurde, verglichen. *E. aerogenes* ist ebenfalls in signifikanten Mengen intrazellulär detektierbar, die Bakterien fallen aber durch ihre ungewöhnliche Morphologie auf. Die Zellen sind offensichtlich geschädigt und eng in Phagosomen eingeschlossen, wohingegen die *L. monocytogenes* enthaltenden Vakuolen sehr groß sind und sich innerhalb von *L. monocytogenes*-Zellen noch deutlich zelluläre Strukturen erkennen lassen.



**Abb. 20:** Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme von infizierten Acanthamoeben-Trophozoiten nach 10 Tagen Koinkubation bei 18°C. **A, B:** ➡ intakte *L. monocytogenes*-Zellen in Vakuolen ( ➡ hier deutlich zu sehen: die das Phagosom begrenzende Membran); **C:** ➡ *E. aerogenes*-Zellen. Zu beachten ist die intakte Form von *L. monocytogenes* im Gegensatz zu den deutlich geschädigten *E. aerogenes*-Zellen

---

## **C.2 Umwelteinflüsse auf die Expression listerieller Virulenzgene und das Überleben von *L. monocytogenes* in der Umwelt**

### **C.2.1 Untersuchungen zur Expression von Virulenzgenen in *L. monocytogenes***

Mit der PCR steht ein wichtiges Instrument zur Vervielfältigung von Nukleinsäuren und Untersuchung einzelner Gene zur Verfügung. Neben der herkömmlichen Amplifikation von DNS kann nach einer vorhergehenden Reversen Transkription von RNS in cDNS diese ebenfalls amplifiziert und detektiert werden. Dies ermöglicht es, neben ribosomaler RNS auch mRNS und damit die Expression eines bestimmten Gens unter definierten Wachstumsbedingungen nachzuweisen. In dieser Arbeit sollte durch die Amplifikation der mRNS eines listeriellen Virulenzfaktors dessen Expression bei niedrigen Temperaturen, wie sie auch in der Umwelt vorkommen, nachgewiesen werden. Dies ist ein erster Schritt zur Untersuchung der Bedeutung der Virulenzgene von *L. monocytogenes* auf dessen Überleben in der Umwelt bzw. in Protozoen.

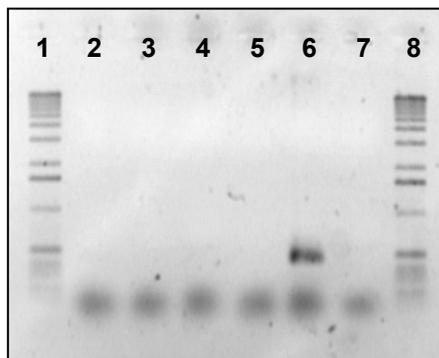
#### **C.2.1.1 Etablierung der RT-PCR für *L. monocytogenes* anhand des konstitutiv transkribierten *iap*-Gens**

Aus *L. monocytogenes* EGD-e Reinkulturen wurde nach RNS-Isolierung und DNase-Verdau die mRNS des *iap*-Gens amplifiziert (B.14-B.17). Das *iap*-Gen wird auf translationeller Ebene reguliert, so dass unabhängig von der Wachstumsphase bzw. vom extrazellulären Milieu immer eine detektierbare Menge *iap*-mRNS in den Zellen vorhanden sein sollte. Aufgrund dieses Charakteristikums sollte anhand des *iap*-Gens die RT-PCR für *L. monocytogenes* optimiert werden. Die in diesem Fall gewählten Primer (*iap*-TN-F/R) amplifizieren mit ca. 500 bp einen relativ kleinen Teil des *iap*-Gens. Ziel der RT-PCR ist in diesem Fall jedoch nicht die vollständige Amplifikation eines Gens, sondern lediglich der Nachweis der entsprechenden mRNS. Dies ist umso leichter, je kürzer das zu amplifizierende Fragment gewählt wird.

---

## Entfernung von DNS aus der Probe

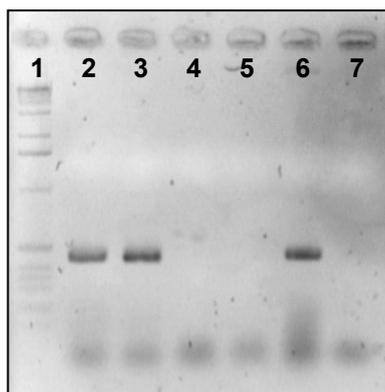
Zur Vermeidung falsch positiver PCR-Reaktionen aufgrund von DNS-Resten in der Probe wurden zunächst sowohl RNS-Isolierung als auch DNase-Verdau dahingehend optimiert, dass nach DNase-Verdau kein positives Signal mehr mit einer herkömmlichen PCR-Reaktion auftreten sollte. Als Positivkontrolle diente DNS aus *L. monocytogenes*-Reinkulturen (B.17.2). Dabei zeigte sich, dass unter Verwendung der RNS-Isolierungsmethode nach Oelmüller (B.14.1) große Mengen an RNS isoliert werden konnten, sich aber ebenfalls noch sehr viel DNS in der Probe befand, die mit Hilfe eines DNase-Verdau nicht quantitativ aus der Probe entfernt werden konnte. Im Gegensatz dazu war die Ausbeute an RNS nach Isolierung mit Trizol (B.14.2) bedeutend geringer. Restkontaminationen durch DNS konnten aber hier durch anschließenden DNase-Verdau ausgeschlossen werden. Dies wurde durch eine negative Kontroll-PCR gezeigt (Abb. 7). Aufgrund der Ergebnisse dieses Vorversuchs wurde im Folgenden RNS mit Hilfe der Trizol-Methode isoliert.



**Abb. 7:** Kontroll-PCR zum Nachweis eines vollständigen DNase-Verdau  
**1, 8:** Längenstandard  
**2-5:** *iap*-PCR mit isolierter RNS aus *L. monocytogenes* EGD-e nach DNase-Verdau in verschiedenen Konzentrationen (500, 100, 50, 10 ng RNS)  
**6:** *iap*-PCR mit DNS aus *L. monocytogenes* EGD-e (Positivkontrolle)  
**7:** Negativkontrolle ohne Zugabe von DNS / RNS zur PCR-Reaktion

## Durchführung der *iap*-RT-PCR

Die RT-PCR wurde nach Herstellerangaben durchgeführt, die Annealingtemperatur für die *iap*-TN-Primer wurde nach Bubert *et al.* (1992) auf 45°C festgelegt. Dabei ließ sich ein positives Signal mit 20 ng RNS erreichen, Negativkontrollen nach DNase- sowie RNase-Verdau bestätigten den spezifischen Nachweis von *iap*-mRNS (Abb. 8).

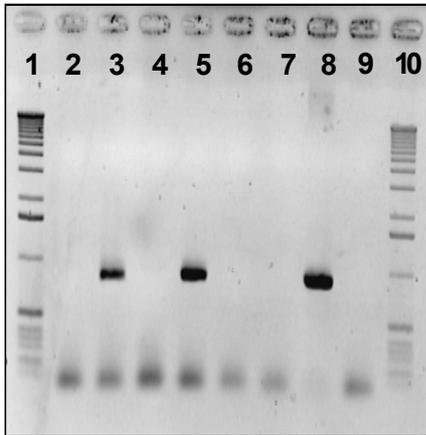


**Abb. 8:** *iap*-RT-PCR aus *L. monocytogenes* EGD-e  
 1: Längenstandard  
 2, 3: RT-PCR aus RNS von *L. monocytogenes* EGD-e (je 100 bzw. 20 ng RNS) nach DNase-Verdau  
 4, 5: RT-PCR nach RNase-Verdau  
 6: Positivkontrolle mit DNS aus *L. monocytogenes* EGD-e  
 7: Negativkontrolle ohne Zugabe von DNS / RNS

### C.2.1.2 Expression des Virulenzfaktors *plcB* aus *L. monocytogenes*

Die Bedeutung listerieller Virulenzgene auf das Überleben von *L. monocytogenes* in der Umwelt wurde bisher nicht im Detail untersucht. Die Virulenzfaktoren könnten unter anderem eine Rolle in der Persistenz von *L. monocytogenes* in Protozoen oder anderen niederen Eukaryonten, mit denen sie in verschiedenen Habitaten in Kontakt kommen, spielen. Im Zusammenhang mit der Expression listerieller Virulenzgene spielt auch die Umgebungstemperatur eine große Rolle. Daher sollte mit Hilfe der RT-PCR die Expression von PrfA-regulierten Virulenzgenen aus *L. monocytogenes* in Abhängigkeit von der Temperatur getestet werden. Dazu wurden 30 ml BHI-Medium mit 0,2% (w/v) Aktivkohle versetzt und anschließend autoklaviert (Ripio *et al.*, 1996). Aktivkohle fängt einen Großteil der Nährstoffe ab, die in BHI normalerweise vorhanden sind und imitiert so intrazelluläre Bedingungen, bei denen PrfA-regulierte Gene exprimiert werden. Somit hängt die Konzentration an entsprechender Virulenzgen-mRNS im Medium nur noch von der jeweiligen Inkubationstemperatur ab. *L. monocytogenes* EGD-e wurde aerob in BHI mit und ohne Aktivkohle jeweils bei 37°C und bei 20°C inkubiert, bis sich die Organismen in der logarithmischen Wachstumsphase befanden. Anschließend wurden von jeder Kultur sowohl DNS als auch RNS isoliert. In einer PCR-Reaktion ohne vorherige reverse Transkription wurde die vollständige Entfernung von DNS aus der isolierten RNS nach DNase-Verdau kontrolliert und durch ein negatives Ergebnis gezeigt. DNS aus *L. monocytogenes*-Reinkulturen diente in diesem Fall als Positivkontrolle (s. Abb. 7) und zudem dem

Nachweis einer erfolgreichen PCR-Reaktion während der RT-PCR. Mit Hilfe der RT-PCR (B.17) konnte *prfA*-mRNS jeweils in BHI<sub>Aktivkohle</sub> sowohl bei 37°C als auch bei 20°C nachgewiesen werden (Abb. 9).



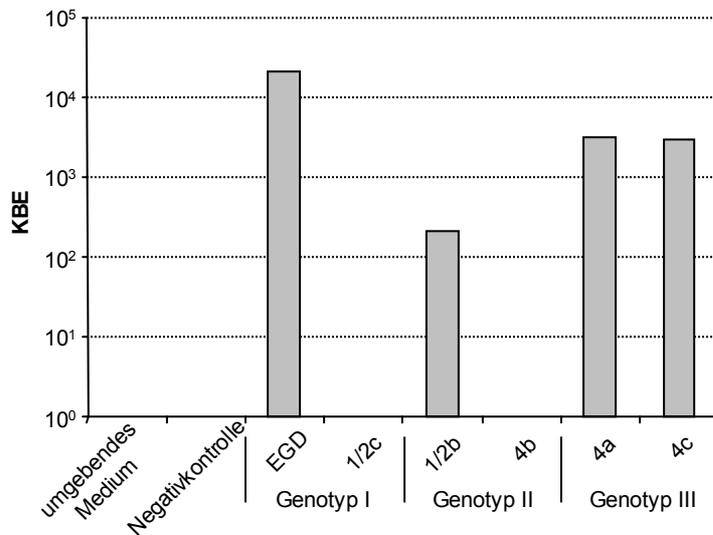
**Abb. 9:** *plcB*-RT-PCR aus *L. monocytogenes* EGD-e  
1, 10: Längenstandard

Spur	Temperatur	Aktivkohle	Nukleinsäure
2	37°C	-	RNS <sub>DNase</sub> -Verdau
3	37°C	+	RNS <sub>DNase</sub> -Verdau
4	20°C	-	RNS <sub>DNase</sub> -Verdau
5	20°C	+	RNS <sub>DNase</sub> -Verdau
6	37°C	-	RNS <sub>DNase/RNase</sub> -Verdau
7	37°C	+	RNS <sub>DNase/RNase</sub> -Verdau
8	37°C	-	DNS
9		-	- (Negativkontrolle)

Die hier mit *L. monocytogenes*-Reinkulturen erhaltenen Ergebnisse belegen die Expression listerieller Virulenzgene bei niedrigen Temperaturen, wie sie auch in der Umwelt vorherrschen. Daher wäre es interessant, die in dieser Arbeit etablierte Methode der RT-PCR in verschiedenen Umweltproben bzw. Protozokulturen zu verwenden und auf weitere Virulenzfaktoren aus *L. monocytogenes* auszuweiten, um deren Expression unter den verschiedensten Umweltbedingungen zu testen. Dies war aber im Rahmen dieser Doktorarbeit aus Zeitgründen nicht mehr möglich.

### C.2.2 Untersuchungen zur Persistenz von *L. monocytogenes* in der Umwelt

Manche Serotypen der Art *L. monocytogenes* werden aus Umwelt- bzw. Lebensmittelproben häufiger isoliert als andere. So sind z.B. Stämme, die dem Serovar 1/2 (Genotyp I) zugeordnet werden, bedeutend häufiger in Lebensmitteln zu finden als dies für Vertreter des Serovars 4b (Genotyp II) der Fall ist (Boerlin und Piffaretti, 1991; Gilot *et al.*, 1996; Schönberg *et al.*, 1989). Andererseits werden Stämme des Genotyps III häufiger aus Umweltproben isoliert (Wiedmann *et al.*, 1997). Daher ist eine eingehende Untersuchung der Persistenz einzelner Stämme in der Umwelt besonders hinsichtlich epidemiologischer Untersuchungen von Interesse. Wie in B.10 beschrieben, wurden sogenannte Enclosures in Umweltproben, die im Labor inkubiert wurden, ausgebracht, in denen sich neben dem umgebenden Medium eine bestimmte Menge an *L. monocytogenes*-Zellen befanden. Die Zellen verblieben im Enclosure, ein Austausch mit dem umgebenden Medium war jedoch durch Bohrungen auf beiden Seiten des Enclosures, die durch bakteriedichte Filter abgedeckt waren, möglich. Die Behälter wurden mit Wasser und Sediment aus einem eutrophen See (Freising, Weihestephan) befüllt, mit  $1 \times 10^9$  *L. monocytogenes*-Zellen versetzt und gut verschlossen in einem Mesokosmos, in dem sich ebenfalls Seewasser und Sediment befanden, bei Raumtemperatur inkubiert. Eine Negativkontrolle, in der das Enclosure nur mit der Umweltprobe befüllt wurde, wurde ebenfalls mit inkubiert. Nach einem Inkubationszeitraum von einer Woche wurden die Enclosures geöffnet, die darin befindlichen Zellen geerntet und in geeigneten Verdünnungsstufen auf Selektivmedien ausplattiert. Interessanterweise konnten manche Stämme nach einer Woche noch detektiert werden, andere waren hingegen nach diesem Inkubationszeitraum nicht mehr nachweisbar. Sowohl das umgebende Seewasser als auch das Enclosure, zu dem keine Listerien zusätzlich zugesetzt worden waren, enthielten keine plattierfähigen *L. monocytogenes*-Zellen. Nach siebentägiger Inkubation waren von den untersuchten Stämmen die meisten lebenden Zellen vom Typstamm *L. monocytogenes* EGD (Genotyp I) vorhanden, ebenfalls signifikant hohe Zellmengen wurden von sv 1/2b (Genotyp II) sowie den beiden Serovaren 4a und 4c aus Genotyp III ermittelt, wohingegen aus den beiden Genotypen I und II die Serotypen 1/2c und 4b nicht mehr detektierbar waren. Die Ergebnisse dieses Versuchs sind in Abb. 10 dargestellt.



**Abb. 10:** Überleben von Vertretern der drei *L. monocytogenes*-Genotypen in einem See-Mesokosmos: Inkubation von *L. monocytogenes*-Stämmen in Seewasser eines eutrophen Sees. KBE = Koloniebildende Einheiten

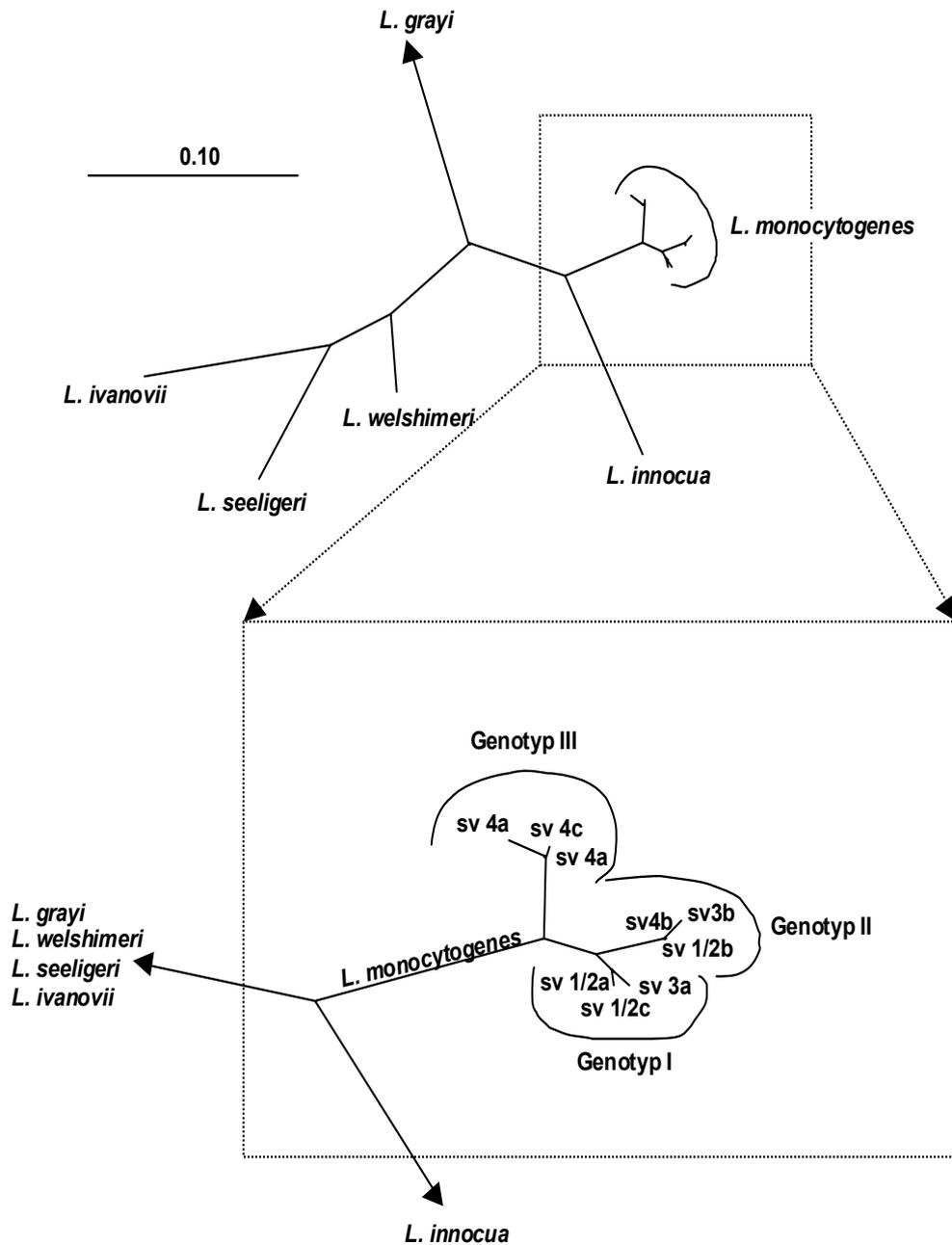
Auf diesem Versuch aufbauend sollten weitere Umweltproben hinsichtlich der Vermehrungsfähigkeit und Persistenz von *L. monocytogenes* getestet werden.

### C.3 Stammspezifische Unterschiede der drei *L. monocytogenes*-Genotypen in Virulenz und Wirtszellspezifität

Die Art *L. monocytogenes* kann phylogenetisch in drei distinkte Gruppen (Genotypen) eingeteilt werden. Dies konnte durch vergleichende Sequenzanalyse einer Vielzahl von Funktions- und Virulenzgenen (Rasmussen *et al.*, 1995; Schmid *et al.*, 2002; Vines und Swaminathan, 1998; Wiedmann *et al.*, 1997) sowie durch Pulsed-Field-Gelelektrophorese nach Restriktionsverdau genomischer *L. monocytogenes*-DNS sowie weiterer geno- und phänotypischer Methoden gezeigt werden (Audurier und Martin, 1989; Bannerman *et al.*, 1996; Bibb *et al.*, 1990; Boerlin und Piffaretti, 1991; Boerlin *et al.*, 1991; Loessner *et al.*, 1996; Loessner *et al.*, 1997; Piffaretti *et al.*, 1989). In zahlreichen Virulenzstudien konnte zusätzlich verschiedenen *L. monocytogenes*-Stämmen ein unterschiedliches pathogenes Potenzial zugeordnet werden (Barbour *et al.*, 1996; Barbour *et al.*, 2001; Farber und Peterkin, 1991; Langendonck *et al.*, 1998; Tabouret *et al.*, 1992). Im Zusammenhang mit der Klassifizierung von *L. monocytogenes* in drei distinkte Genotypen wurde in dieser Arbeit die Korrelation zwischen der Zugehörigkeit eines Stammes zu einem bestimmten Genotyp und dessen pathogenen Eigenschaften eingehend untersucht. Die dafür verwendeten neun *L. monocytogenes*-Stämme sind in Tab. 7 aufgeführt und in ihrer phylogenetischen Beziehung zueinander in Abb. 21 dargestellt.

**Tab. 7:** Verwendete *L. monocytogenes*-Stämme

<b>Verwendete <i>L. monocytogenes</i>-Stämme</b>	<b>Charakteristika</b>
<i>L. monocytogenes</i> EGD-e (sv1/2a)	Genotyp I, Typstamm
<i>L. monocytogenes</i> sv 1/2b	Genotyp I
<i>L. monocytogenes</i> sv 3a	Genotyp I
<i>L. monocytogenes</i> sv 1/2b	Genotyp II
<i>L. monocytogenes</i> sv 3b	Genotyp II
<i>L. monocytogenes</i> sv 4b	Genotyp II
<i>L. monocytogenes</i> sv 4a	Genotyp III
<i>L. monocytogenes</i> sv 4c	Genotyp III
<i>L. monocytogenes</i> sv 4a (SLCC 2374)	Genotyp III



**Abb. 21:** Klassifizierung von *L. monocytogenes*. **A:** Phylogenie der Gattung *Listeria* basierend auf vergleichender Sequenzanalyse des *iap*-Gens. **B:** Unterteilung der verwendeten *L. monocytogenes*-Stämme in drei Genotypen. Der Balken entspricht einer Sequenzhomologie von 10%.

### C.3.1 Bestimmung der Hämolyseaktivität von *L. monocytogenes*

Ein gängiges Merkmal zur Unterscheidung einzelner *L. monocytogenes*-Stämme ist die Aktivität des zelleigenen Listeriolysins O, das eine zentrale Rolle im intrazellulären Lebenszyklus von *L. monocytogenes* spielt. Die hämolytische Aktivität wird zudem als Maß für die Virulenz eines spezifischen Stammes angesehen (Vásquez-Boland *et al.*, 2001).

2 µl von *L. monocytogenes*-Übernachtskulturen der neun zu untersuchenden Stämme sowie von *L. innocua* wurden auf Schafsblutplatten (Oxoid, Wesel) ausgebracht und 12 bis 24 h bei 37°C inkubiert. *L. innocua* als apathogener Vertreter der Gattung *Listeria* gilt als nicht-hämolytisch und wurde entsprechend als Negativkontrolle eingesetzt. Durch einen Vergleich der Durchmesser der entstandenen Lysehöfe konnten die in Tab. 6 angegebenen Näherungen hinsichtlich der Hämolyseaktivität einzelner *L. monocytogenes*-Stämme gezogen werden. Je zwei der drei Stämme aus den Genotypen I und III bildeten deutlich kleinere Lysehöfe als *L. monocytogenes* Genotyp II. Sehr wenig bis nicht hämolytisch zeigten sich zu Genotyp III gehörige Isolate. Ein direkter Zusammenhang zwischen Genotypzugehörigkeit und Hämolyseaktivität war aber in dem hier vorgestellten Versuch nicht ersichtlich.

**Tab. 6:** Aktivität des Listeriolysins O repräsentativer *L. monocytogenes*-Stämme und deren Zugehörigkeit zu drei Genotypen. -: kein Lysehof zu erkennen; +: nur leichte Aufhellung des die *L. monocytogenes*-Kolonie umgebenden Agars, kein deutlicher Lysehof erkennbar; + - +++: in Relation zueinander unterschiedlich große Lysehöfe um eine *L. monocytogenes*-Kolonie auf Schafsblutplatten.

Getestete Stämme		Hämolyseaktivität	
<i>L. innocua</i>		-	
<i>L. monocytogenes</i>	Genotyp I	EGD	+
		sv 1/2c	+++
		sv 3a	+
	Genotyp II	sv 1/2b	++
		sv 4b	+++
		sv 3b	++
	Genotyp III	sv 4a	+
		sv 4c	++
		2374 (sv 4a)	-

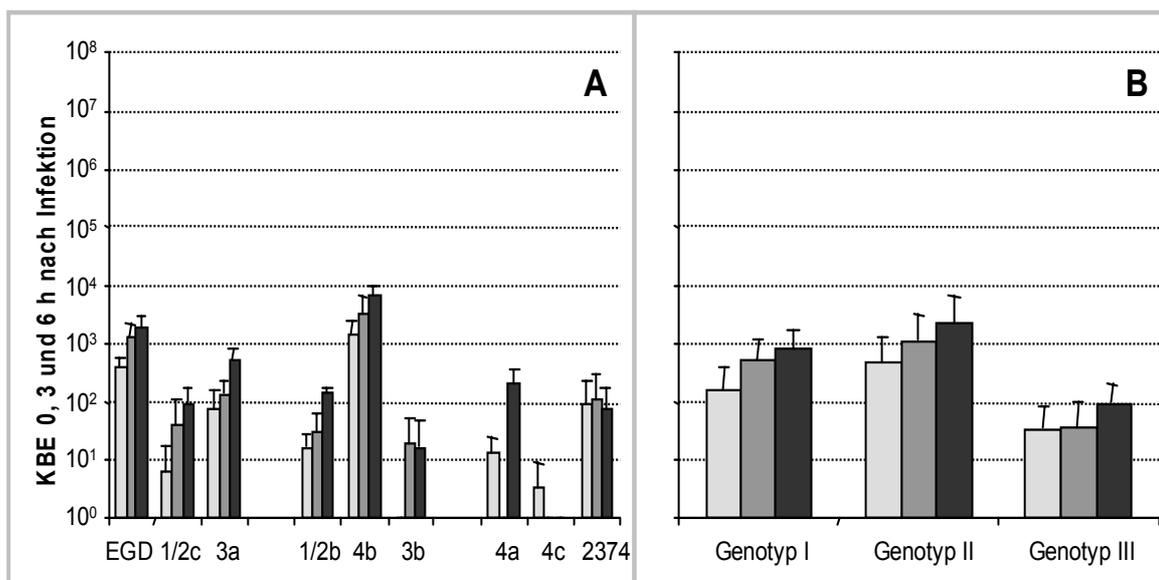
---

### **C.3.2 Infektionsstudien mit Säuger-Zelllinien**

Für Infektionsstudien mit Säugerzellen wurden drei verschiedene Zelllinien, die auch im Körper während einer systemischen *L. monocytogenes*-Infektion von diesen Erregern befallen werden, sowie neun *L. monocytogenes*-Stämme ausgewählt. Bei den Säugierzelllinien handelte es sich um menschliche Endothelzellen (Caco-2), Mausmakrophagen (J774) und Maushepatocyten (Tib73). Von jedem der drei *L. monocytogenes*-Genotypen wurden je drei repräsentative Vertreter unterschiedlichen Serotyps ausgewählt (s. Tab. 7). Alle Stämme wurden jeweils in Triplikaten getestet, und jeder Versuch wurde in mindestens einer weiteren unabhängigen Versuchsreihe wiederholt.

#### **C.3.2.1 Vermehrung der *L. monocytogenes*-Stämme in Tib 73-Hepatocyten**

Alle verwendeten Stämme zeigten ausnahmslos eine sehr geringe Infektionsrate in Tib 73-Hepatocyten. So konnten auch nach sechs Stunden Infektionszeit mit einer multiplicity of infection (MOI) von 10 maximal  $7 \times 10^3$  intrazelluläre *L. monocytogenes*-Zellen im Vergleich zu ca.  $5 \times 10^5$  Wirtszellen detektiert werden (Abb. 22-A). Diese Zellzahlen wurden nur von *L. monocytogenes* sv 4b erreicht, andere *L. monocytogenes*-Stämme waren zu diesem Zeitpunkt teilweise nicht mehr oder nur in geringen Mengen detektierbar. Auffällig ist, dass sich mit Ausnahme von *L. monocytogenes* sv 3b alle untersuchten Stämme aus den Genotypen I und II im getesteten Zeitverlauf in Tib 73-Hepatocyten vermehren können. Im Gegensatz dazu konnte eine Zunahme der Zellzahl bei Stämmen aus Genotyp III nur bei *L. monocytogenes* sv 4a beobachtet werden. Die weiteren getesteten Stämme aus Genotyp III konnten ihre Zellzahl in den Hepatocyten innerhalb des Zeitraums, in dem die Versuchsreihe durchgeführt wurde, nicht erhöhen. Im Allgemeinen wird hier also eine etwas verringerte Virulenz von *L. monocytogenes*-Stämmen aus Genotyp III in Bezug auf Tib 73-Maushepatocyten aufgezeigt. Dies ist in Abb. 22-B besser ersichtlich. Hier ist ein Säulendiagramm dargestellt, das sich aus gemittelten Werten der drei pro Genotyp verwendeten *L. monocytogenes*-Stämme ergibt.



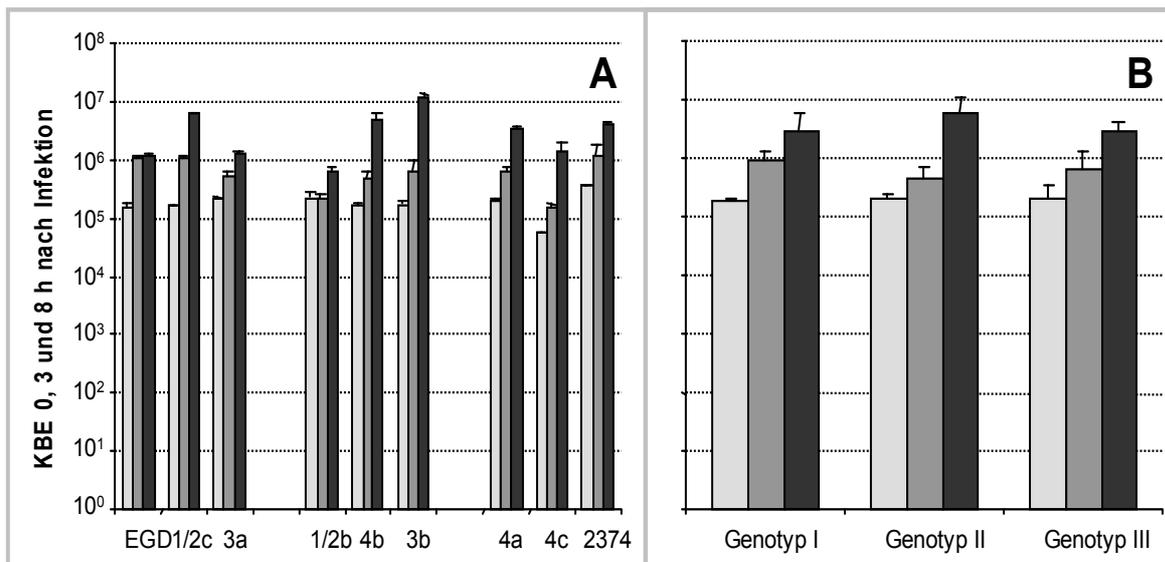
**Abb. 22:** Intrazelluläre *L. monocytogenes* Zellzahlen nach  $\square$  0,  $\blacksquare$  3 bzw.  $\blacksquare$  6h Infektionszeit in Tib73 Hepatocyten. Der Zeitpunkt, an dem Gentamicin zugegeben wurde (60 min nach Infektionsbeginn) wurde als Zeitpunkt 0 definiert.

**A:** Werte jeweils gemittelt aus Triplikaten

**B:** Werte jeweils gemittelt aus Triplikaten und drei Stämmen eines Genotyps

### C.3.2.2 Vermehrung der *L. monocytogenes*-Stämme in J774-Makrophagen

Die hier verwendeten Mausmakrophagen sind ein oft eingesetztes Zellkulturmodell für *L. monocytogenes*, da sich Listerien sehr gut in diesen Makrophagen vermehren können und entsprechend hohe intrazelluläre Zellzahlen erreichen. Auch in dem hier dargestellten Versuch konnte für alle verwendeten Stämme ein sehr hohes Infektionspotenzial festgestellt werden (Abb. 23-A, B). Sowohl Isolate, die durch eine hohe Virulenz charakterisiert sind (z.B. *L. monocytogenes* sv 4b), als auch solche, bei denen ein niedriges Infektionspotenzial postuliert wird (z.B. *L. monocytogenes* sv 4a), waren in sehr großen Mengen in J774-Zellen detektierbar und konnten sich über den untersuchten Zeitraum um teilweise mehr als eine Zehnerpotenz in J774-Makrophagen vermehren. Es konnten keine signifikanten Unterschiede in der Infektiosität der neun *L. monocytogenes*-Stämme gezeigt werden.



**Abb. 23:** Intrazelluläre *L. monocytogenes* Zellzahlen nach □ 0, ■ 3 bzw. ■ 8h Infektionszeit in **J774 Makrophagen**. Der Zeitpunkt, an dem Gentamicin zugegeben wurde (45 min nach Infektionsbeginn) wurde als Zeitpunkt 0 definiert.

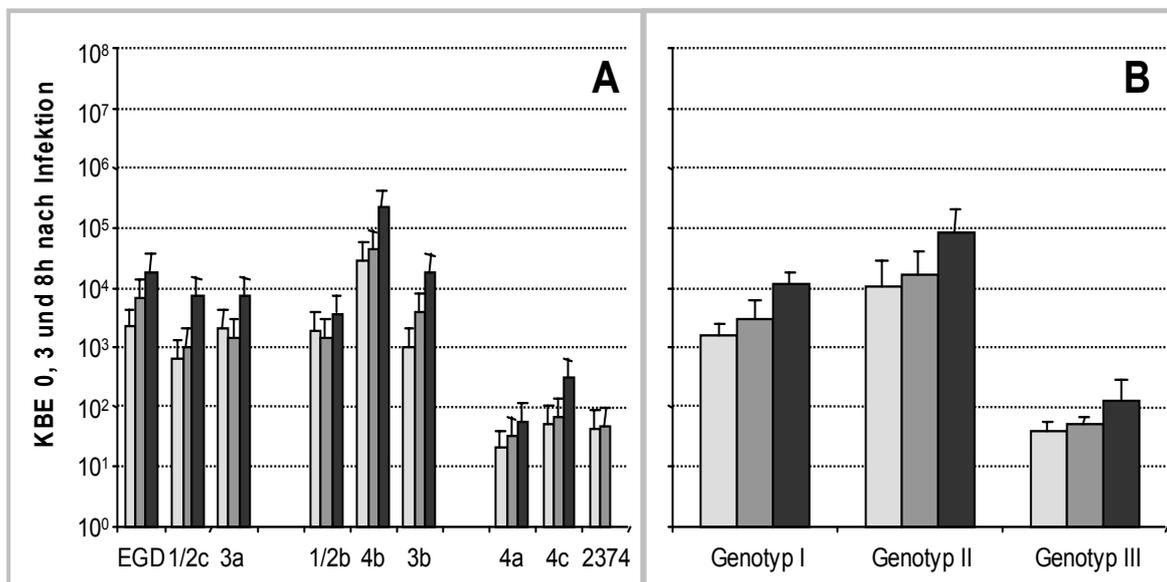
**A:** Werte jeweils gemittelt aus Triplikaten

**B:** Werte jeweils gemittelt aus Triplikaten und drei Stämmen

### C.3.2.3 Vermehrung der *L. monocytogenes*-Stämme in Caco-2-Endothelzellen

Bei Caco-2 Zellen handelt es sich um immortalisierte menschliche Darmendothelzellen aus einem Colonkarzinom. In den letzten Jahren konnte gezeigt werden, dass *L. monocytogenes* neben M-Zellen der Peyer's Patches auch Endothelzellen befallen kann (Daniels *et al.*, 2000). Somit stellen diese Zellen eine weitere Möglichkeit für den Erreger dar, in den betroffenen Körper einzudringen. Auch in diesem Fall wurden die bereits oben erwähnten *L. monocytogenes*-Stämme verwendet. Interessanterweise konnte für Stämme aus Genotyp III eine deutlich reduzierte Infektiosität im Zusammenhang mit Caco-2-Zellen festgestellt werden. Intrazelluläre Zellzahlen der *L. monocytogenes* Serotypen 4a und 4c waren um 1,5 bis 2 Zehnerpotenzen geringer als vergleichbare Werte von Isolaten aus Genotyp I bzw. II (Abb. 24-A,B), was auf ein deutlich erniedrigtes Infektionspotenzial von Genotyp III schließen lässt. Unabhängig von der sehr viel niedrigeren intrazellulären Zellzahl von Stämmen

aus Genotyp III konnten diese sich über den Zeitverlauf ebenso wie Stämme aus den Genotypen I und II in Caco-2-Endothelzellen vermehren und erreichten somit nach 8 h Inkubationszeit deutlich höhere Zellzahlen als zu Beginn des Versuchs.



**Abb. 24:** Intrazelluläre *L. monocytogenes* Zellzahlen nach  $\square$  0,  $\blacksquare$  3 bzw.  $\blacksquare$  6h Infektionszeit in Caco-2 Endothelzellen. Der Zeitpunkt, an dem Gentamicin zugegeben wurde (60 min nach Infektionsbeginn) wurde als Zeitpunkt 0 definiert. Von *L. monocytogenes* 2374 (sv 4a) konnten nach 6 h Inkubation keine lebenden Zellen detektiert werden. Das ist durch die niedrigen Zellzahlen der Stämme aus Genotyp III, die nahe an der Nachweisgrenze liegen, bedingt.  
**A:** Werte jeweils gemittelt aus Triplikaten  
**B:** Werte jeweils gemittelt aus Triplikaten und drei Stämmen

Die Ergebnisse dieser Infektionsstudien sind in den Abbildungen 22 bis 24 dargestellt. Alle Abbildungen mit dem Kürzel B zeigen gemittelte Werte aus je drei Vertretern der drei Genotypen.

---

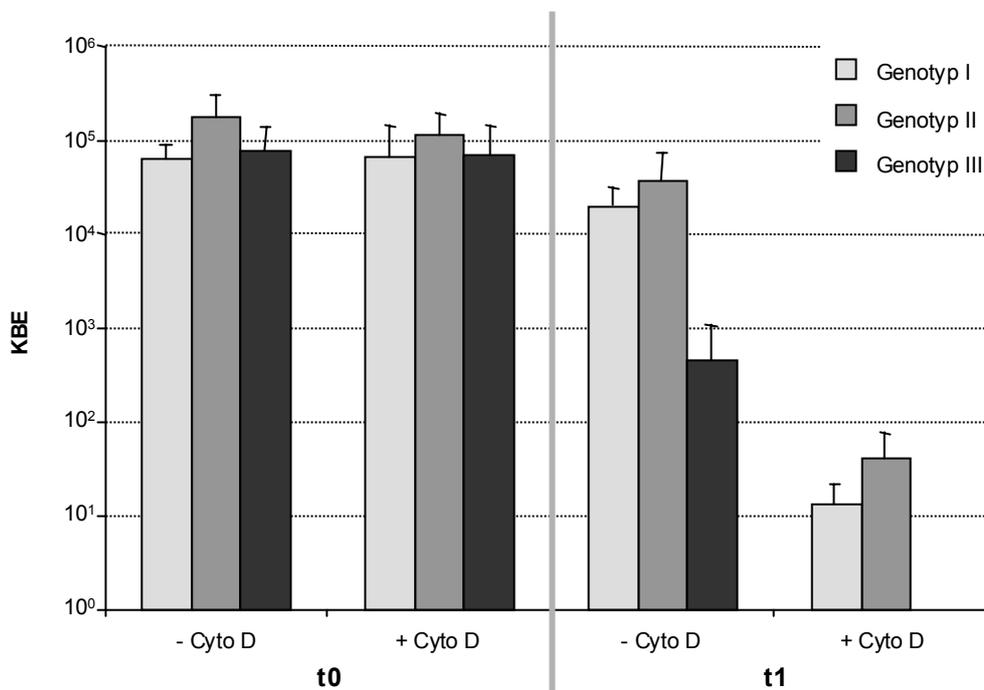
#### **C.3.2.4 Unterscheidung zwischen Adhäsions- und Invasions- bzw. intrazellulärem Verhalten mittels Zugabe von Cytochalasin D**

Die Ursachen für die deutlich verminderte intrazelluläre Zellzahl von *L. monocytogenes*-Stämmen aus Genotyp III in Caco-2-Endothelzellen sollten mit Hilfe eines Cytochalasin D-Assays detaillierter untersucht werden (s. B.8.2). Cytochalasin D ist ein toxisches Reagens, das die Aktinumlagerung in der Wirtszelle verhindert. *L. monocytogenes* kann sich demnach an Cytochalasin D-behandelte Zellen anheften, diese aber nicht infizieren, da die von Listerien ausgelöste Phagozytose von einer vorhergehenden Aktinumlagerung des Cytoskeletts der Wirtszelle abhängig ist (Abedi und Zachary, 1998; Gaillard *et al.*, 1987). Da der Zellernte und Zellzahlbestimmung der Bakterien extensive Waschschriffe vorangehen, wird nach Zellyse der Wirtszellen ausschließlich die Zahl der adhärenen Bakterien bestimmt. Verringerte Bakterienzellzahlen in einem Assay mit Cytochalasin D-behandelten Zellen deuten also auf ein beeinträchtigt Adhäsionsvermögen der entsprechenden *L. monocytogenes*-Stämme hin.

Kontrollen sollten den korrekten Ablauf des Versuchs sowie die quantitative Hemmwirkung des Cytochalasins belegen. Im ersten Fall sollte eine herkömmliche Infektionsreihe ohne die Zugabe von Cytochalasin D Ergebnisse aus vorangegangenen Versuchen bestätigen, und unter gleichzeitiger Verwendung von Cytochalasin D und Gentamicin sollten keinerlei lebensfähige Bakterien detektiert werden können.

Dieser Versuch wurde für J774 sowie Caco-2-Zellen durchgeführt. Hinsichtlich der getesteten Mausmakrophagen (J774) konnten keine Unterschiede im Adhäsionsverhalten der neun verwendeten *L. monocytogenes*-Stämme gezeigt werden (Ergebnisse nicht gezeigt). Auch bei einer Infektion von menschlichen Endothelzellen (Caco-2), die bei herkömmlicher Infektion ohne Cytochalasin D-Behandlung eine deutlich reduzierte Virulenz von *L. monocytogenes* Genotyp III aufzeigten, konnten am Adhäsionsverhalten der drei verwendeten Stämme aus Genotyp III keine Unterschiede zu den Vertretern der beiden anderen Genotypen gezeigt werden. Kontrollexperimente ohne Zugabe von Cytochalasin D bestätigten aber die Ergebnisse vorangegangener Infektionsstudien, bei denen alle drei untersuchten Stämme aus Genotyp III (Serotypen 4a und 4c) deutlich weniger

invasiv gegenüber Caco-2-Zellen waren. Das deutet darauf hin, dass diese Isolate Defekte in Invasion bzw. intrazellulärer Vermehrung zeigen (Abb. 25).



**Abb. 25:** Detektierte *L. monocytogenes*-Zellzahlen im Cytochalasin D-Assay mit Caco-2-Zellen. Dargestellt sind Mittelwerte aus je drei Vertretern der drei Genotypen sowie den in Triplikaten pro Stamm durchgeführten Versuchen. **t0:** *L. monocytogenes*-Zellzahlen von adhärenenten (+Cytochalasin D) sowie adhärenenten und intrazellulären Bakterien (-Cytochalasin D) 1 h nach Zugabe zu den Wirtszellen; hier erfolgte keine Gentamicin-Behandlung. **t1:** *L. monocytogenes*-Zellzahlen nach einstündiger Gentamicin-Behandlung (2 h nach Zugabe der Bakterien); ohne Zugabe von Cytochalasin D: Detektion aller intrazellulären Bakterien. Unter Anwesenheit von Cytochalasin D: Detektion intrazellulärer Bakterien nach Gentamicin-Behandlung (hier wird die korrekte Wirkung des Cytochalasins getestet; wenige noch überlebende bakterielle Zellen wie im vorliegenden Fall können vernachlässigt werden).



## D Diskussion

### D.1 Interaktionen von *Listeria monocytogenes* mit *Acanthamoeba* sp.

Acanthamöben sind im Zusammenhang mit dem Überleben fakultativ intrazellulärer pathogener Mikroorganismen in der Umwelt von großer Bedeutung und werden daher häufig als Modell für die Untersuchung der Interaktionen von Protozoen mit Bakterien eingesetzt. Eine Vielzahl von Bakterien kann sich aktiv in Acanthamöben vermehren, einige – wie z.B. *Legionella pneumophila* oder *Mycobacterium avium* – ziehen daraus sogar den Vorteil, ihr pathogenes Potenzial zu verstärken und damit nach Passage in Amöben leichter den Menschen als Wirt zu befallen (Cirillo *et al.*, 1997; Michel *et al.*, 1998; Rowbotham, 1986; siehe auch A. Einleitung).

In der hier vorliegenden Arbeit wurde ein Infektionsmodell für *L. monocytogenes* ausgearbeitet und optimiert. Hierbei sollten durch eine Vielzahl von Kontrollen die Spezifität des Assays, die quantitative Wirkung des verwendeten Antibiotikums sowie weitere Faktoren, die die Interaktionen zwischen *L. monocytogenes* und *Acanthamoeba* spp. beeinflussen könnten, in Betracht gezogen werden.

#### D.1.1 Einfluss von *L. monocytogenes* auf die Zahl der Amöbenzellen

Die Anwesenheit von *L. monocytogenes* scheint auf die Vermehrungsrate von Acanthamöben laut der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche keinen Einfluss zu haben. Die Zellzahlen der Protozoenzellen, die in den Versuchen mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt wurden, waren über den gesamten Versuchszeitraum gleichbleibend. Unterschiede im Vergleich zu Amöben, die ohne die Anwesenheit von Bakterien oder mit Futterbakterien (*E. aerogenes*) inkubiert worden waren, waren nicht zu verzeichnen. Auch Größe und Form der Amöben war immer ähnlich der der Amöben aus den Kontrollexperimenten. Nach einigen Tagen Inkubation encystierten einige Amöbenzellen, aber auch das war in den Kontrollen gleichermaßen zu beobachten. *L. monocytogenes* übte auf die

---

verwendeten Acanthamöben also weder cytopathogene noch die Vermehrung stimulierende Effekte aus.

### **D.1.2 Überleben von *L. monocytogenes* EGD-e in Acanthamöben**

Als Positivkontrolle diente in allen durchgeführten Versuchen der Typstamm der Art *L. monocytogenes*, EGD-e. In allen Infektionsstudien zeigte *L. monocytogenes* EGD-e den gleichen Kurvenverlauf, der in Abb. 16 dargestellt ist. Nach einer kurzen Reduktion der im Gentamicin-Assay detektierbaren lebenden Zellen steigt die Zellzahl an und erreicht ein stabiles Niveau. Über mehrere Wochen sind dann annähernd identische Zellzahlen von *L. monocytogenes* EGD-e detektierbar. Da die eingesetzten Listerien aus in der logarithmischen Wachstumsphase befindlichen Kulturen, die in Aliquots in Glycerin aufbewahrt wurden (s. B.5), direkt für den Assay verwendet worden waren, war eine vorherige Anpassung der Listerien an das Amöbensystem nicht möglich. Eine anfänglich benötigte Adaptationszeit für die Listerien könnte also Ursache für die zunächst niedrigeren detektierten Zellzahlen im Assay sein. Ebenso könnte aber auch eine reduzierte Aufnahmefähigkeit der Acanthamöben ausschlaggebend für die verminderten Zellzahlen in den ersten Tagen des Assays sein. Acanthamöben werden axenisch, also ohne die Anwesenheit von Futterbakterien, in nährstoffreichen Medien kultiviert. Zu Beginn einer Infektionsstudie wird eine geeignete Menge an Amöbenzellen geerntet und nach mehreren Waschschritten für die Infektion verwendet. Intrazellulär gebundene Speicherstoffe aus dem Medium könnten auch nach dem Waschen noch in den Amöben vorhanden sein und somit die Aufnahme von Bakterien, die unter anderem den Protozoen als Futter dienen könnten, verhindern. Zudem sind die im Labor kultivierten Amöben lange nicht in Kontakt mit Bakterienzellen gewesen. Daher könnte auch für die Acanthamöben eine längere Anpassungszeit an das neue System vonnöten sein.

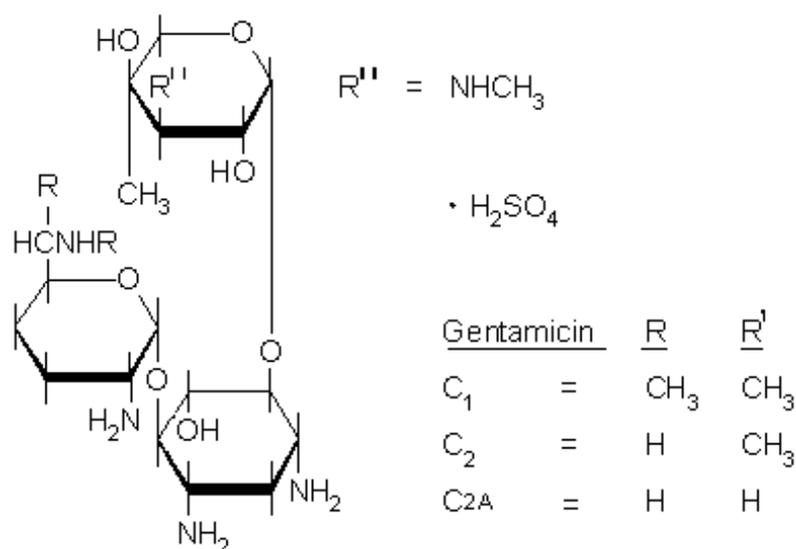
Die Ergebnisse hinsichtlich des Typstammes *L. monocytogenes* EGD-e sind gut reproduzierbar und sprechen für die Verlässlichkeit des Assays. Viele im Rahmen der Optimierung des Amöben-Infektionsassays durchgeführten Kontrollexperimente führten aber zu widersprüchlichen Ergebnissen, die in den folgenden Kapiteln diskutiert werden.

### D.1.3 Probleme bei der Entwicklung des Assays

#### D.1.3.1 Kontrolle der Wirksamkeit des Antibiotikums Gentamicin für die Abtötung aller extrazellulär vorhandener Bakterien

Mit Hilfe von *L. monocytogenes*-Reinkulturen wurde die benötigte Menge an Gentamicin zur Abtötung aller nicht intrazellulär geschützten Bakterien bestimmt (s. C.1.2.2). Die eingesetzte Konzentration des Antibiotikums (500 µg/ml) könnte aber in Anwesenheit von Amöben nicht ausreichen, alle im Assay befindlichen extrazellulären Bakterien abzutöten, da von den Amöben ausgeschiedene Stoffwechselprodukte dessen Funktion einschränken oder an die Amöben adhärierte Bakterien vor der bakteriziden Wirkung des Antibiotikums geschützt sein könnten. Daher wurden in 6-Well-Kulturschalen Acanthamöben wie bereits für den herkömmlichen in 12-Well-Schalen durchgeführten Infektionsassay beschrieben zusammen mit *L. monocytogenes* inkubiert. In diesem Fall war ich auf die Verwendung dieser größeren Schalen angewiesen, da für die in allen weiteren Versuchen eingesetzten 12-Well-Schalen keine entsprechenden bakteriendichten Filter erhältlich waren. In diesem Versuch waren beide Interaktionspartner durch einen bakteriendichten Filter mit einer Porengröße von 0,2 µm voneinander getrennt, durch den kleinere Moleküle diffundieren konnten. Somit konnte ein direkter Kontakt der Organismen und damit die Anwesenheit intrazellulär geschützter Listerien vermieden werden. Interessanterweise waren in den 6-Well-Schalen im Gegensatz zu 12-Well-Schalen sowohl in Kontrollversuchen ohne die Verwendung eines Filters als auch in den Ansätzen, bei denen ein Filter beide Interaktionspartner voneinander trennte, lebende *L. monocytogenes*-Zellen detektierbar. Dies deutet zunächst darauf hin, dass tatsächlich die Anwesenheit von Amöben eine reduzierte Wirksamkeit des Gentamicins bewirkt. Um hier den Einfluss des verwendeten bakteriendichten Filters bestimmen zu können, wurde ein weiterer Versuch durchgeführt, der eine etwaige die Wirkung des Gentamicins einschränkende Funktion des Filters testen sollte. Dazu wurden Listerien wie in den oben beschriebenen Versuchen in 6-Well-Schalen mit einem Filter inkubiert, allerdings in diesem Fall ohne die Zugabe von Acanthamöben. Kontrollversuche wurden in identischen Kulturschalen ohne Filter durchgeführt. Die so behandelten Listerien wurden mit bakteriziden

Konzentrationen des Antibiotikums Gentamicin versetzt und wie in allen Versuchen für vier Stunden inkubiert. Dabei konnte eine bakterizide Wirkung des Antibiotikums nur in Abwesenheit des Filters erreicht werden (Abb. 14). Das verwendete Filtermaterial besteht aus Aluminiumoxid, das in der Chromatographie als hydrophiles, oxidisches Absorbens eingesetzt wird. Bei dem im Versuch vorliegenden pH-Wert von 7,2 ist das verwendete Antibiotikum Gentamicin geladen und kann zudem eventuell durch seine reduzierten Aminogruppen an das Oxid binden (s. Abb. 27). Wahrscheinlich beruht also die reduzierte Wirkung des Antibiotikums auf dessen Adhäsion an das Filtermaterial und erschwert damit die Interpretation des durchgeführten Versuches. Der Einfluss der Anwesenheit von Amöben hinsichtlich der Wirkung des Gentamicins kann also mit den hier beschriebenen Versuchen nicht eindeutig beantwortet werden.



**Abb. 27:** Strukturformel von Gentamicin-Sulfat. Zu beachten ist die große Zahl an Aminogruppen, die wahrscheinlich für die Bindung an das Trägermaterial  $\text{Al}_2\text{O}_3$  verantwortlich sind.

Die in diesen Versuchen verwendeten 6-Well-Schalen erwiesen sich zudem als weniger geeignet für die Durchführung aller weiteren Infektionsstudien, da in den größeren Schalen aus unbekanntem Gründen generell eine schlechtere Wirksamkeit des Gentamicins auf die Listerien erreicht wurde (s. Abb. 14).

### **D.1.3.2 Kontrolle auf Vermehrungsfähigkeit von intrazellulären *L. monocytogenes* in Acanthamoeben durch die Entfernung von extrazellulären Bakterien**

Zu Beginn der Entwicklung des in dieser Arbeit vorgestellten Infektionsassays wurde das optimale Verhältnis zwischen der Zahl bakterieller und Amöbenzellen (MOI, multiplicity of infection) bestimmt. Hierbei erwies sich eine MOI von 100 als optimal für die Durchführung des Assays. Konstant hohe detektierbare Zellzahlen in einem Gentamicin-Assay könnten bei einer so hohen MOI auch aus der ständigen Neuaufnahme noch lebender, extrazellulär vorhandener bakterieller Zellen resultieren. Ein Teil dieser Zellen ist bei Zugabe des Antibiotikums durch Phagozytose bereits von den Amöben aufgenommen und damit vor der bakteriziden Wirkung des Antibiotikums geschützt. Werden die Bakterien während der Antibiotikabehandlung bis zur Zellyse durch „Freeze&Thaw“ von den Amöben nicht abgetötet, so ist immer eine relativ konstante Menge an lebenden Bakterien detektierbar. Diese Zellzahl würde demnach jedoch nicht die tatsächliche intrazelluläre Persistenz der Listerien widerspiegeln, da zu jedem Probenahmezeitpunkt andere gerade phagozytierte *L. monocytogenes*-Zellen detektiert werden würden.

Der typische Kurvenverlauf der *L. monocytogenes*-Zellzahlen in einem Infektionsversuch mit Acanthamoeben weist in den ersten Tagen des Versuches eine charakteristische Abnahme an bakteriellen Zellen auf, danach steigt die Zellzahl aber wieder um mindestens den Faktor zehn an (s. Abb. 16). Dieser Anstieg könnte ein Hinweis auf die intrazelluläre Vermehrung von *L. monocytogenes* in Acanthamoeben sein. Geht man von der oben dargestellten Theorie aus, könnte die anfänglich erniedrigte Zellzahl aber ebenso daraus resultieren, dass die Amöben zu Beginn weniger bakterielle Zellen aufnehmen. Acanthamoeben werden axenisch in nährstoffreichem Vollmedium kultiviert. Zu Beginn des Versuches wird eine geeignete Menge an Amöben geerntet, mit Page's Saline gewaschen und anschließend für den Versuch in Kulturschalen verteilt. Restmengen an Medium, die evtl. intrazellulär in gebundener Form vorliegen und deshalb durch Waschschriffe nicht entfernt werden können, könnten anfangs den Amöben genügend Nährstoffe bieten und damit die Aufnahme von Nahrung in Form von extrazellulären Bakterien unterbinden. So wären zu Beginn

---

des Versuches weniger Bakterienzellen intrazellulär vorhanden und damit auch weniger lebende Bakterien detektierbar.

Um die Aufnahme extrazellulärer *L. monocytogenes*-Zellen nach einer ersten Interaktion im weiteren Verlauf des Versuches zu verhindern, wurden zu Beginn nach erfolgter Infektion sämtliche im Infektionsassay extrazellulär vorhandenen Bakterien durch wiederholte Waschschriffe entfernt und anschließend wie in B.7 beschrieben inkubiert. (Bei Infektionsversuchen mit Säugerzelllinien werden in der Regel kurz vor der Zellernte alle extrazellulären Bakterien durch Waschen entfernt. Dies ist bei langen Inkubationszeiten wie in dem hier beschriebenen Assay nicht möglich, da sich die normalerweise adhärennten Amöben im Zeitverlauf zunehmend vom Schalenboden ablösen und demnach mit weggewaschen würden. Daher musste in diesem Fall auf spätere Waschschriffe verzichtet werden.) Da der genaue Zeitpunkt nicht bekannt ist, bei dem bei Protozoen die Aufnahme von *L. monocytogenes* in den Wirt erfolgt, wurden zwei Zeitpunkte (2 h, 18 h p.i.) gewählt, an denen alle noch extrazellulär vorhandenen Bakterien entfernt wurden. Am ersten Tag nach der Infektion konnten in den nach zwei Stunden gewaschenen Ansätzen keine überlebenden *L. monocytogenes*-Zellen detektiert werden, in den nach 18 Stunden gewaschenen waren hingegen mehr als  $10^2$  lebende Bakterienzellen vorhanden. Nach zwei Stunden Koinkubation könnte also noch keine hinreichend große Menge an Bakterienzellen die Amöben erfolgreich infiziert oder an sie adhärnt haben. Überraschenderweise war aber beim Versuch „2 h“ nach mehreren Tagen ein deutlicher Anstieg der Zellzahlen bis zu  $10^4$  Zellen zu verzeichnen, wohingegen sich die Listerien nach dem Waschschriff bei 18 Stunden nicht dauerhaft intrazellulär etablieren konnten. Nach acht Tagen Inkubation waren hier keine lebenden Zellen mehr detektierbar. Um eine Erklärung für dieses Phänomen zu finden, wurde der Versuch bei identischen Bedingungen wiederholt. Hier konnten nach drei Tagen Inkubation Zellzahlen, wie sie in der ungewaschenen Kontrolle zu verzeichnen waren, auch in den nach 18 Stunden gewaschenen Experimenten erreicht werden.

Unabhängig von den Widersprüchen in beiden Versuchen wurde aber in allen Ansätzen eine Vermehrung um mindestens den Faktor 10 beobachtet. Da alle extrazellulären Bakterien in beiden Versuchen nach zwei bzw. 18 Stunden entfernt worden waren, kann dieser Effekt nur durch die Vermehrung der bereits in

intrazellulären Kompartimenten vor der Antibiotikabehandlung geschützten *L. monocytogenes*-Zellen erklärt werden.

### **D.1.3.3 Einfluss der MOI auf die Zahl der überlebenden *L. monocytogenes*-Zellen**

Die optimale MOI hängt von vielen Parametern ab, primär von den verwendeten Organismen, aber auch vom Alter und Wachstumszustand der jeweiligen Kultur, und muss deshalb für jeden Versuch optimiert werden. Auch bei dem in dieser Arbeit entwickelten Amöbenassay wurde der Einfluss der MOI auf den Versuchsablauf und die zu ermittelnden Zellzahlen untersucht. Dazu wurde die gleiche Menge an Amöben mit unterschiedlichen *L. monocytogenes*-Zellzahlen (MOI  $10^1$ ,  $10^2$  und  $10^3$ ) für 26 Tage inkubiert. Dabei erwies sich eine MOI von 100 als optimal für den Infektionsassay, da bei einer MOI von 10 über den gesamten Zeitverlauf keine stabile Infektion aufrechterhalten werden konnte, wohingegen durch die Zugabe von 1000mal mehr *L. monocytogenes*- als Amöben-Zellen nicht mehr Bakterien detektiert werden konnten als das bei einer MOI von 100 der Fall war.

Bei keinem der bisher dargestellten Versuche konnte zweifelsfrei geklärt werden, ob *L. monocytogenes* befähigt ist, sich in Acanthamöben zu vermehren, da in keinem Fall eine Zunahme der Zellzahlen im Vergleich zur ursprünglich eingesetzten Menge zu verzeichnen war. Es könnte sich also hier ebenso lediglich um die intrazelluläre Persistenz einiger weniger Zellen für einen bestimmten Zeitraum handeln. Daher wurden in einem weiteren Versuch verschiedene MOIs von  $10^{-3}$  bis  $10^4$  verwendet. Hier sollte getestet werden, ob durch die Reduzierung der Menge der zugegebenen Bakterien eine Nettozunahme der bakteriellen Zellzahl erreicht werden könnte. Es sollten also so viele bakterielle Zellen zugegeben werden, dass eine erfolgreiche Infektion noch durch das Vorhandensein lebender Bakterien detektiert werden kann, aber zugleich so wenige, dass eine Vermehrung anhand der Nettozunahme der Zellzahlen erkannt werden kann. Eine Zunahme im Vergleich zur eingesetzten Menge an *L. monocytogenes*-Zellen wäre der direkte Beweis für die Vermehrung von *L. monocytogenes* in Anwesenheit von Acanthamöben. Die Zellzahlen wurden

---

nach einer bzw. zwei Wochen Inkubationszeit bestimmt. Bei keiner der verwendeten MOIs konnte eine Nettozunahme der bakteriellen Zellzahlen ermittelt werden. In allen Fällen war die Zahl der lebenden Listerien um ein Vielfaches erniedrigt, und bei sehr niedrigen MOIs von 1 oder darunter konnten nach zwei Wochen Inkubationszeit keine überlebenden Bakterien mehr detektiert werden. Überraschenderweise wurde eine Zunahme der Zellzahlen zwischen beiden Erntezeitpunkten (7 und 15 Tage nach Infektion) nur bei hohen MOIs ( $\geq 10$ ) beobachtet. Beim Einsatz geringerer Mengen an *L. monocytogenes*-Zellen konnten, wenn überhaupt, nur nach einer Woche Infektionszeit noch lebende Bakterien bestimmt werden. Über längere Zeiträume gleichbleibend hohe bakterielle Zellzahlen sprechen für die bereits oben (D.1.3.2) erwähnte Theorie, dass aus dem extrazellulären Milieu ständig noch lebende Bakterien aufgenommen werden, die dann mit dem verwendeten Plattierungsverfahren erfasst werden. Stehen im umgebenden Medium bei niedriger MOI von Beginn an weniger Bakterien zur Verfügung, kann ein solcher Kreislauf nicht über längere Zeit aufrechterhalten werden und es sind nach ausgedehnten Inkubationszeiträumen und nach Gentamicin-Behandlung keine lebenden Bakterien mehr detektierbar. Dieses Ergebnis steht aber im Widerspruch zu dem oben beschriebenen Versuch, bei dem alle extrazellulären Bakterien durch Waschschriffe aus dem Assay entfernt worden waren (C.1.2.4). Hier war auch nach Entfernung der extrazellulären Bakterien noch eine Zunahme der bakteriellen Zellzahlen zu beobachten. Man kann aber auch hier nicht von einer Nettozunahme der bakteriellen Zellzahlen sprechen, da in diesem Fall eine exakte Angabe der Zahl der *L. monocytogenes*-Zellen, die nach dem Waschvorgang noch im Ansatz vorhanden waren, nicht möglich war.

#### **D.1.4 Einfluss von Virulenzgenen und stammspezifischen Unterschieden auf das Überleben von *L. monocytogenes* in Acanthamöben**

Trotz der oben dargestellten Schwierigkeiten bei der Interpretation der bei der Entwicklung des Infektionsassays erhaltenen Ergebnisse konnten unter Einbeziehung der jeweils mitgeführten Kontrollen reproduzierbare Ergebnisse hinsichtlich der Persistenz verschiedener *L. monocytogenes*-Stämme in Acanthamöben erzielt werden. Die annähernd quantitative Abtötung aller extrazellulären *L. monocytogenes*-Zellen durch das Antibiotikum Gentamicin wurde in allen im Folgenden beschriebenen Infektionsassays mittels entsprechender Kontrollen über den gesamten Versuchszeitraum hinreichend bewiesen. Zudem wurden in keinem Ansatz und bei keiner der untersuchten Inkubationstemperaturen im Gegensatz zu *L. monocytogenes* lebende Zellen von *Enterobacter aerogenes* ermittelt. *E. aerogenes* dient in der Regel als Futterbakterium für nicht axenisch kultivierte Amöben. Daher wurde davon ausgegangen, dass *E. aerogenes* in Kokultur mit Acanthamöben nicht persistieren kann und folglich auch nicht detektierbar ist.

##### **D.1.4.1 Vermehrung verschiedener *L. monocytogenes*-Stämme in Acanthamöben**

Aufgrund der bereits beschriebenen Stammunterschiede von *L. monocytogenes* in Zellkulturstudien mit humanen Zelllinien wurden mittels des Amöben-Infektionsassays spezifische Unterschiede der drei *L. monocytogenes*-Genotypen untersucht. Interessanterweise konnten hier im Gegensatz zu humanen Zellkulturen keine Unterschiede zwischen den untersuchten *L. monocytogenes*-Stämmen gefunden werden. Alle Stämme konnten über einen langen Zeitraum in Acanthamöben persistieren und zeigten nach wenigen Tagen Inkubationszeit den auch bei *L. monocytogenes* EGD zu beobachtenden charakteristischen Anstieg der detektierbaren Zellzahlen. Im Gegensatz zur Vermehrung in humanen Endothelzellen (vgl. C.3.2.3) ist diese Interaktion also charakteristisch für alle getesteten Stämme der Art *L. monocytogenes*.

---

#### D.1.4.2 Der Einfluss von Virulenzgenen auf das Überleben in Acanthamöben

##### Temperaturabhängige Expression listerieller Virulenzgene

Listerielle Virulenzgene unterliegen einer komplexen Regulation, die von zahlreichen Faktoren abhängt. Detailliert untersucht wurde bisher der Einfluss der Temperatur auf die Expression PrfA-regulierter Gene. Die Aktivierung von PrfA und damit die Transkription der Virulenzgene scheint mit erhöhter Temperatur einherzugehen, wie sie auch im homoiothermen Wirt vorherrscht (Leimeister-Wächter *et al.*, 1992). Laut dieser Studie werden diese Gene erst ab einer Temperatur von 30°C exprimiert. Neuere Studien berichten jedoch im Widerspruch dazu von einer Expression listerieller Virulenzgene bei weit niedrigeren Temperaturen. So konnten z.B. Wiedmann *et al.* (persönliche Mitteilung) mit Hilfe einer spezifischen Färbung des im Cytosol der Wirtszelle zu beobachtenden Aktinschweifs zeigen, dass selbst in Fisch-Zellen, deren optimale Wachstumstemperatur bei 14°C liegt, PrfA-regulierte Gene wie in diesem Fall *actA* exprimiert werden. Aus diesem Grund wurde mit Hilfe der RT-PCR in der vorliegenden Arbeit die Expression listerieller Virulenzgene in Abhängigkeit von der Temperatur untersucht. Hierfür wurde ein Teil der mRNA des *plcB*-Gens amplifiziert, das für die Lecithinase kodiert, unter der Kontrolle von PrfA steht und zusammen mit Listeriolysin O die Freisetzung aus dem Phagosom bewirkt. *L. monocytogenes* wurde aerob in BHI-Medium bei 37°C und Raumtemperatur inkubiert und in der spätlogarithmischen Wachstumsphase geerntet. Aufgrund der nährstoffreichen Zusammensetzung dieses Mediums wurden 0,2% Aktivkohle zugesetzt. Aktivkohle fängt einen Großteil der in BHI vorhandenen Wachstumsfaktoren ab und imitiert soweit Minimalbedingungen, dass die chemische Basis für die Expression listerieller Virulenzgene gegeben ist (Ripio *et al.*, 1996). Zudem können bei diesem Versuchsaufbau unbekannte Faktoren, die beispielsweise bei *in vitro*-Zellkulturstudien Einfluss auf die Expression von Virulenzgenen haben, ausgeschlossen werden. Aus den so inkubierten Zellen wurde anschließend die gesamte RNS isoliert und die Transkription von *plcB* mit Hilfe der RT-PCR analysiert. Da bei beiden Inkubationstemperaturen Amplifikate erhalten wurden, konnte zweifelsfrei die Expression von *plcB* bei Raumtemperatur

(ca. 20°C) nachgewiesen werden. Das breite Temperaturspektrum, in dem unter der geeigneten chemischen Zusammensetzung des extrazellulären Milieus listerielle Virulenzgene exprimiert werden, könnte darauf hindeuten, dass Listerien auch in nicht homoiothermen Wirten ihre Virulenzgene einsetzen. Es stellt sich die Frage, ob der Mensch wirklich als der eigentliche Endwirt von *L. monocytogenes* anzusehen ist. In die Betrachtung geht in diesem Zusammenhang vor allem die Tatsache ein, dass sich eine erfolgreiche Infektion in der Regel nur in immunsupprimierten Patienten, Kleinkindern, Schwangeren oder älteren Menschen etabliert, während bei gesunden, immunkompetenten Erwachsenen eine Infektion durch *L. monocytogenes* entweder aufgrund fehlender Symptomatik nicht erkannt oder allenfalls durch das Auftreten leichter gastrointestinaler Beschwerden fehlgedeutet oder unterschätzt wird. Daher könnte der Mensch ein „Fehlwirt“ von *L. monocytogenes* sein, der nur aufgrund des häufigen Kontaktes mit kontaminierten Lebensmitteln so oft von Listeriosefällen heimgesucht wird. In der Umwelt könnten weitere (niedere?) Eukaryonten die Verbreitung von *L. monocytogenes* bewirken und zudem den Verlust listerieller Virulenzgene durch Mutationen verhindern.

### **Einfluss von Virulenzgenen auf das Überleben von *L. monocytogenes* in Acanthamoeben**

Die Bedeutung der bis heute beschriebenen listeriellen Virulenzgene wurde in den letzten Jahren basierend auf *in vitro*- und *in vivo*-Studien mit Säugerzelllinien oder Versuchstieren wie Mäusen, Ratten oder Meerschweinchen aufgeklärt (z.B. Chakraborty *et al.*, 1992; Cossart und Lecuit, 1998; Drevets, 1998; Ireton und Cossart, 1997; Mengaud *et al.*, 1991a; Mengaud *et al.*, 1991c; Raveneau *et al.*, 1992). Bis heute ist aber nichts über den Einfluss der Virulenzfaktoren auf das Überleben von *L. monocytogenes* in niederen eukaryontischen Wirten bekannt. Durch den Besitz sogenannter Pathogenitätsinseln (Hacker und Kaper, 2000) könnte durch die Infektion einzelliger Eukaryonten bereits lange vor der Entstehung des Menschen die Befähigung zum intrazellulären Überleben einiger Mikroorganismen ausgebildet worden sein. Daher ist es von großem Interesse, die Überlebensfähigkeit pathogener Organismen sowie den Einfluss der bakteriellen

---

Virulenzfaktoren in diesen Wirten eingehend zu untersuchen. In der vorliegenden Arbeit wurden *L. monocytogenes*-Mutanten, die durch Funktionsdefekte in verschiedenen am intrazellulären Lebenszyklus beteiligten Genen charakterisiert sind (s. Tab. 5), hinsichtlich ihrer Überlebensfähigkeit und Vermehrung in *Acanthamoeba* sp. UWC1 untersucht. Fast alle Mutanten konnten sich äußerst effektiv in den Amöben vermehren, was darauf schließen lässt, dass die in *L. monocytogenes*, *L. ivanovii* und *L. seeligeri* vorhandenen Virulenzgene nicht für die intrazelluläre Vermehrung von Listerien in Amöben benötigt werden. Eine Ausnahme bilden hier nur die Internaline G, H und E. Eine Nullmutation in diesen Genen bewirkt eine signifikant eingeschränkte Vermehrungsfähigkeit in Amöben (s. Abb. 17-C). Die Funktion von InIGHE in Säugern ist bis heute nicht genau geklärt: Mutanten, die sich durch eine Deletion im *inIGHE*-Gencluster charakterisieren, sind in *in vitro*-Zellkulturversuchen im Vergleich zum Wildtyp nicht beeinträchtigt, können aber nur in bedeutend geringeren Mengen *in vivo* in Leber und Milz detektiert werden (Raffelsbauer *et al.*, 1998). *L. monocytogenes* besitzt zahlreiche membrangebundene und sekretierte Internaline, die alle den Besitz Leucin-reicher Regionen (LRR) gemeinsam haben (Kajava, 1998). Unerlässlich für eine erfolgreiche Infektion des Menschen sind die bisher am detailliertesten untersuchten Internaline A und B, deren Expression für die Adhäsion und Invasion zahlreicher Zelllinien unerlässlich ist (Braun und Cossart, 2000; Drevets, 1998; Lecuit *et al.*, 1997; Lingnau *et al.*, 1995; Mengaud *et al.*, 1996). Die Funktionen aller weiteren Internaline (u.a. auch *inIGHE*) konnten bis heute nur bruchstückhaft aufgedeckt werden, sie scheinen aber nur eine untergeordnete Rolle im Infektionsverlauf zu spielen und könnten demnach weitere Funktionen haben, die nicht ausschließlich dem intrazellulären Überleben im Wirt dienen (Vásquez-Boland *et al.*, 2001).

#### **D.1.5 Mikroskopische Untersuchung der intrazellulären Persistenz von *L. monocytogenes* in Acanthamöben**

Die mittels des quantitativen Gentamicin-Assays erhaltenen Werte deuten trotz der genannten Schwierigkeiten auf ein intrazelluläres Vorkommen der Listerien in Acanthamöben hin. Aus diesem Grund wurde die intrazelluläre Persistenz von

*L. monocytogenes* mit Hilfe mikroskopischer Techniken genauer untersucht. Für diese Fragestellung wurde *L. monocytogenes* intrazellulär in Amöben mit Hilfe eines konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops (CLSM) sowie mittels transmissionselektronenmikroskopischer Bilder nachgewiesen. Anhand der erhaltenen Bilder konnten *L. monocytogenes*-Zellen in Trophozoiten sowie Cysten nachgewiesen werden. Auch nach langen Inkubationszeiträumen von bis zu sechs Wochen waren noch *L. monocytogenes*-Zellen detektierbar. Innerhalb der Cysten konnten die Bakterien in der Cystenwand visualisiert werden, was bisher nur für *Mycobacterium avium* gezeigt werden konnte (Steinert *et al.*, 1998).

Die Persistenz von *L. monocytogenes* in Trophozoiten konnte mit Hilfe des Transmissionselektronenmikroskops genauer untersucht werden. Überraschenderweise befanden sich die bakteriellen Zellen in einer Vakuole. Sie werden dort scheinbar nicht oder nur langsam lysiert und überleben so auch lange Inkubationszeiträume (s. Abb. 19). Im Gegensatz zur dieser Persistenz in Amöben lysieren Listerien das Phagosom von humanen Zelllinien, um sich anschließend im Cytosol der Wirtszelle zu vermehren (Cossart *et al.*, 1989; Gedde *et al.*, 2000; Marquis *et al.*, 1995; Schwarzkopf, 1996). Die dafür benötigten Virulenzgene kommen laut den in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnissen bei Acanthamöben nicht zum Einsatz, d.h. eine Vermehrung im Cytosol der Protozoenzelle ist hier nicht möglich, die Listerien scheinen daher keinen cytopathogenen Effekt auf die Amöben ausüben zu können. Andererseits müssen Listerien ein ausgeklügeltes System entwickelt haben, das es ihnen ermöglicht, im Phagosom der Amöbenzelle zu überleben. Von vielen pathogenen Mikroorganismen wird die Verschmelzung von Phagosom und Lysosom und damit die Lyse der intrazellulären Bakterien in Protozoenzellen verhindert (Molmeret *et al.*, 2002; Russell, 1998), was ebenso bei *L. monocytogenes* in *Acanthamoeba* spp. der Fall sein könnte. Das unterscheidet die Persistenz in den untersuchten Protozoen grundlegend von der Pathogenese von *L. monocytogenes* in Säugerzellen und erklärt auch die lange Überdauerung der Listerien innerhalb der Amöben.

Im Gegensatz zu *L. monocytogenes* befinden sich *E. aerogenes*-Zellen in Acanthamöben in dicht gepackten Vakuolen, die Bakterien sind hier deutlich geschädigt, was im Einklang mit den quantitativen Untersuchungsergebnissen aus den Infektionsassays steht. Hier konnten nie lebende *E. aerogenes*-Zellen nachgewiesen werden.

---

### D.1.6 Zusammenfassende Betrachtungen und Ausblick

- Mit den in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnissen kann von einer dauerhaften Persistenz von *L. monocytogenes* in Acanthamöben ausgegangen werden, die intrazelluläre Vermehrung der Listerien konnte jedoch nicht zweifelsfrei gezeigt werden. Mit Hilfe der Transmissionselektronenmikroskopie wurden im Gegensatz zu *E. aerogenes* über mehrere Wochen intakte Listerienzellen in den Amöben nachgewiesen, was auf die Überlebensfähigkeit von *L. monocytogenes* in den Amöben hindeutet.
- Da annähernd alle Virulenzgenmutanten der Art *L. monocytogenes* dazu befähigt sind, in Amöben zu persistieren, ist dieses Überleben wohl nicht von der Präsenz listerieller Virulenzgene, die für die Pathogenese im Menschen verantwortlich sind, abhängig. Die Interaktionen zwischen Amöben und Listerien sind also anderer Natur als dies bei Säugern der Fall ist. Acanthamöben sind demnach für die Untersuchung der Evolution von Pathogenität und den daran beteiligten Virulenzgenen und Pathogenitätsinseln nicht das geeignete System. Weitere Protozoen und andere niedere Eukaryonten (z.B. *Caenorhabditis elegans*), die im Labor der Untersuchung von Virulenzmerkmalen pathogener Mikroorganismen dienen, könnten hier Aufschluss über das Wirtsspektrum von *L. monocytogenes* und den Einfluss der vorhandenen Virulenzgene geben.
- Eine Nettozunahme der Zahl an intrazellulären *L. monocytogenes* in Acanthamöben konnte in den durchgeführten Assays nicht beobachtet werden. Die Listerien ziehen demnach in der Umwelt keinen Vorteil aus dem intrazellulären Vorhandensein in Amöben durch eine Vermehrung ihrer Zahl im entsprechenden Habitat. Sie sind aber durch ihr Überleben sowohl vor dem Verdau durch Amöben als auch vor dem Fraßdruck weiterer Protozoen geschützt.

## D.2 Enclosure-Experimente zur Untersuchung der Umweltpersistenz von *L. monocytogenes*

Die Art *L. monocytogenes* kann aus äußerst vielen Habitaten isoliert werden. Neben Lebensmitteln kann *L. monocytogenes* auch in signifikanten Zellzahlen aus diversen Umweltproben wie z.B. Boden, Süßwasser oder Belebtschlamm isoliert werden. Interessanterweise werden aus Lebensmitteln meistens *L. monocytogenes*-Stämme, die dem Serotyp 1/2 zugehörig sind, isoliert (Schönberg *et al.*, 1989), wohingegen Listeriosefälle, die in der Regel auf den Verzehr kontaminierter Lebensmittel zurückgeführt werden, häufig durch das Serovar 4b ausgelöst werden (Farber und Peterkin, 1991; Mead *et al.*, 1999). Ein bevorzugtes Vorkommen bestimmter *L. monocytogenes*-Stämme in Lebensmitteln und/oder der Umwelt wäre neben Unterschieden in der Virulenz einzelner Isolate ein möglicher Grund für die Beobachtung, dass nur wenige Serovare Erkrankungen oder sogar ganze Epidemien auslösen. Daher ist eine Untersuchung hinsichtlich der Umweltpersistenz der einzelnen *L. monocytogenes*-Stämme von großem Interesse. In dieser Arbeit wurde Wert gelegt auf Unterschiede in der Persistenz der drei *L. monocytogenes*-Genotypen. Je zwei Vertreter der drei Genotypen wurden mit Hilfe der in B.10 beschriebenen Enclosures in einem Mesokosmos ausgebracht, die mit Seewasser sowie Sediment aus einem eutrophen See befüllt war (s. Abb. 26). Interessanterweise waren große Unterschiede in der Umweltpersistenz der sechs untersuchten Stämme zu verzeichnen, die aber nicht strikt mit der Zugehörigkeit zu einem bestimmten Genotyp korrelierten. Beide untersuchten Stämme des Genotyps III konnten nach sieben Tagen in hohen Zellzahlen aus den Enclosures isoliert werden, wohingegen nur jeweils ein Vertreter aus den Genotypen I und II (*L. monocytogenes* EGD bzw. *L. monocytogenes* sv 1/2b) detektiert werden konnte. Stämme des Genotyps III (sv 4a, sv 4c) zeichnen sich durch eine deutlich erniedrigte Virulenz aus (Wiedmann *et al.*, 1997; diese Arbeit), könnten aber laut den in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnissen womöglich länger in der Umwelt persistieren als viele Stämme der anderen beiden Genotypen. Interessanterweise konnte sich *L. monocytogenes* sv 4b im Enclosure nicht etablieren. Dieser Befund deutet darauf hin, dass dieser Serotyp ein hochvirulenter Vertreter der Art

---

*L. monocytogenes* ist, der an das Überleben im Wirt bedeutend besser angepasst ist als an das Überleben in der Umwelt.

### **D.3 *In vitro* Infektionsstudien mit Säugerzelllinien**

#### **D.3.1 Die pathogenen Eigenschaften von *L. monocytogenes*-Geno- und Serotypen**

*L. monocytogenes* kann aufgrund zahlreicher Charakteristika in drei Genotypen eingeteilt werden. Dies ist anhand vergleichender Sequenzanalyse einer Reihe listerieller Gene, aber auch mittels Analyse des gesamten Genoms bzw. Proteoms aus *L. monocytogenes* durch Pulsed-Field-Gelelektrophorese oder Multilocus-Enzymelektrophorese ersichtlich (Boerlin und Piffaretti, 1991; Brosch *et al.*, 1996; Piffaretti *et al.*, 1989; Rasmussen *et al.*, 1995; Schmid *et al.*, 2002; Vines und Swaminathan, 1998; Wiedmann *et al.*, 1997; s. Abb. 3). Die drei Genotypen können mit der stärker auflösenden Methode der Serotypisierung zur Deckung gebracht werden. So werden Genotyp I basierend auf Flagellenantigenen (in der Angabe des Serovars dargestellt als Buchstaben; (Seeliger und Höhne, 1979) die Serotypen a bzw. c zugeordnet, während zu Genotyp II Stämme, die die Flagellenantigene b, d oder e besitzen, gehören. Selten auftretende Stämme, die durch den Serotyp 4a bzw. 4c charakterisiert sind, bilden eine dritte, eigene Gruppe (Schmid *et al.*, 2002; Wiedmann *et al.*, 1997). Interessanterweise wird einzelnen Serovaren auf der Basis epidemiologischer Untersuchungen ein unterschiedliches pathogenes Potenzial zugeordnet. Die letztgenannten *L. monocytogenes*-Serovare 4a bzw. 4c wurden beispielsweise bisher aus erkrankten Patienten höchstens als Begleitflora eines weiteren Serotyps ko-isoliert und werden deshalb als weniger virulent eingestuft (Chakraborty *et al.*, 1994), wohingegen Serotyp 4b aus Genotyp II einen der virulentesten Vertreter darstellt. Auch hier basiert diese Erkenntnis hauptsächlich auf epidemiologischen Daten, da alle größeren, in den letzten Jahren dokumentierten *L. monocytogenes*-Epidemien ausnahmslos auf diesen Serotyp zurückzuführen sind (Espaze *et al.*, 1989; Goulet *et al.*, 1998; Jacquet *et al.*, 1995; Linnan *et al.*, 1988). Sogenannte Plaque-Assays

in Zellkulturversuchen wiesen zudem verschiedenen *L. monocytogenes*-Serovaren Unterschiede hinsichtlich ihres pathogenen Potenzials zu (Wiedmann *et al.*, 1997). Eine eventuelle Dominanz des Serotyps 4b gegenüber weiteren *L. monocytogenes*-Serovaren in kontaminierten Lebensmitteln könnte neben der postulierten erhöhten Virulenz ein Grund für die häufige Zuordnung von Serotyp 4b-Stämmen zu Listeriose-Ausbrüchen sein. Der am häufigsten aus kontaminierten Quellen isolierte Serotyp gehört aber der Gruppe von *L. monocytogenes*-Stämmen an, die durch die somatischen Antigene 1/2 charakterisiert ist (Boerlin und Piffaretti, 1991; Schönberg *et al.*, 1989), was die Vermutung nahe legt, dass *L. monocytogenes* sv 4b besser an das intrazelluläre Überleben im Menschen angepasst ist als dies bei anderen Serotypen der Fall ist. Die Zuordnung eines *L. monocytogenes*-Isolats zu einem bestimmten Serotyp spiegelt jedoch nicht zwingend das pathogene Potenzial dieses Stammes wider. Verschiedene *L. monocytogenes*-Isolate, die alle dem hochvirulenten Serovar 4b zugeordnet sind, verhalten sich beispielsweise im Mausmodell sehr unterschiedlich im Hinblick auf die Effizienz der Kolonisierung von Leber bzw. Milz (Barbour *et al.*, 1996; Barbour *et al.*, 2001). Daher ist die Serotypisierung, obwohl zahlreich angewendet, besonders für epidemiologische und klinische Fragestellungen nicht das geeignete System zur Bestimmung des pathogenen Potenzials eines bestimmten *L. monocytogenes*-Isolats, da sich dessen Serotyp nicht zwingend mit der Virulenz des Stammes zur Deckung bringen lässt. Im Gegensatz dazu lässt die zwar relativ grobe, dafür aber auf weitere Stämme übertragbare Zuordnung eines Stammes zu einem Genotyp Rückschlüsse auf dessen pathogene Eigenschaften zu.

### **D.3.2 Die Funktion listerieller Virulenzgene und deren eventuelle Beteiligung an der Attenuation bestimmter Stämme**

In den in dieser Arbeit vorgestellten quantitativen Infektionsstudien wurde den drei *L. monocytogenes*-Genotypen hinsichtlich ihrer Vermehrung in Makrophagen sowie Leberzellen ein annähernd identisches pathogenes Potenzial zugeordnet, wohingegen signifikante Unterschiede in der intrazellulären Zellzahl der Stämme in menschlichen epithelialen Colonkarzinom-Zellen (Caco-2) beobachtet wurden

---

(s. C.3.2.3). Alle Stämme des Genotyps III waren lediglich in geringen Mengen intrazellulär in Caco-2-Zellen detektierbar und somit mehr oder weniger avirulent für diese spezielle Zelllinie: Durchschnittlich war nur eine *L. monocytogenes*-Zelle in 1000 Wirtszellen vorhanden. Mittels Cytochalasin D-Studien mit den oben genannten Zelllinien konnte jedoch kein Defekt im Adhäsionsverhalten des Genotyps III beobachtet werden (s. C.3.2.4). Vertreter dieses Clusters sind also ebenso wie alle weiteren *L. monocytogenes*-Stämme fähig, an die Endothelzellen zu adhären, können aber im weiteren Verlauf ihres intrazellulären Lebenszyklus keine stabile Infektion aufrechterhalten (siehe Abb. 25).

Das attenuierte Virulenzverhalten von *L. monocytogenes*-Stämmen des Genotyps III in menschlichen Darmendothelzellen könnte einer Reihe von Virulenzgenen zugeschrieben werden. Daher ist eine genauere Betrachtung der Funktion der einzelnen Gene, die für das intrazelluläre Überleben von *L. monocytogenes* im Menschen verantwortlich sind, vonnöten. Unterschiede in der Primärsequenz einzelner Gene aus verschiedenen *L. monocytogenes*-Stämmen spiegeln eventuell teilweise deren Funktionalität wider. Ist also ein bestimmtes Virulenzgen eines zu untersuchenden *L. monocytogenes*-Stammes in seiner Primärsequenz grundlegend verschieden von den Nukleinsäuresequenzen dieses Gens in hochvirulenten Stämmen, und zeigt es im Gegensatz dazu starke Ähnlichkeiten zur Sequenz eines apathogenen Stammes, so könnte das ein Hinweis auf den Einfluss dieses Gens auf eine reduzierte Virulenz sein. Treten beispielsweise bei *L. monocytogenes* Genotyp III im Vergleich zu den Genotypen I und II Unterschiede in der Sequenz eines bestimmten Virulenzgens auf, so wäre dessen Einfluss auf die reduzierte Pathogenität wahrscheinlich. Betrachtet man alle bis heute in diesem Zusammenhang untersuchten Gene, so sind jedoch in jeder Sequenz signifikante Unterschiede zu finden, die eine Einteilung in die beschriebenen Untergruppen erlauben. In diesem Zusammenhang untersucht wurden bisher die auf dem Virulenzgencluster liegenden Gene *actA* (Wiedmann *et al.*, 1997), *plcA* und *plcB* (Schmid *et al.*, 2002), sowie an anderer Stelle auf dem Chromosom lokalisierte Virulenzgene (*inlB*, Ericsson *et al.*, 2000; *iap*, Schmid *et al.*, 2002). Die zu beobachtende reduzierte Pathogenität des Genotyps III in menschlichen Caco-2-Zellen kann also durch diesen Ansatz nicht eindeutig einem bestimmten Virulenzfaktor zugeschrieben werden.

Zahlreiche weitere Virulenzgene aus *L. monocytogenes* sind für dessen intrazellulären Lebenszyklus verantwortlich. Eine zentrale Rolle spielt hier das Listeriolysin O, ein Hämolyisin, das die Freisetzung der Listerien aus dem Phagosom bewirkt. Transposon-Mutagenese in diesem Gen führt zu avirulenten Stämmen, deren in Tierversuchen bestimmte LD<sub>50</sub> um mehr als vier Zehnerpotenzen erhöht ist (Cossart *et al.*, 1989; Gaillard und Finlay, 1996; Kathariou *et al.*, 1987). Ähnliche Effekte werden auch bei Stämmen beobachtet, die aufgrund einer Mutation im *actA*-Gen nicht mehr befähigt sind, sich durch „cell-to-cell-spread“ *in vivo* im Gewebe auszubreiten (Kocks *et al.*, 1992). Nullmutationen in weiteren Virulenzgenen wie z.B. der Lecithinase (kodiert durch das *plcB*-Gen) haben dagegen bedeutend weniger Einfluss auf die Pathogenität von *L. monocytogenes* (Raveneau *et al.*, 1992). Die in der vorliegenden Arbeit dargestellten Ergebnisse belegen jedoch drastische Unterschiede von bis zu drei Größenordnungen in den intrazellulär bestimmten Zellzahlen der untersuchten Stämme. Dies deutet auf eine Mutation in einem bzw. mehreren „essentiellen“ Virulenzgenen hin.

Ein geeigneter Ansatz zur Aufklärung der Funktionalität listerieller Virulenzgene in menschlichen Darmendothelzellen könnte unter Umständen darauf beruhen, *L. monocytogenes*-Stämme des Genotyps III mit auf Plasmiden lokalisierten Virulenzgenen aus hochvirulenten Stämmen (z.B. sv 4b) zu komplementieren und damit vergleichende Infektionsstudien mit humanen Zellkulturen durchzuführen. Sollte hier mit einem bestimmten Protein die Attenuation des verwendeten Stammes aufgehoben werden können, so könnte so die eingeschränkte Funktion des zelleigenen Gens gezeigt werden. Eine andere Möglichkeit, Defekte des Genotyps III hinsichtlich seines intrazellulären Lebenszyklus aufzudecken, besteht in der mikroskopischen Untersuchung im Zeitverlauf eines *in vitro* durchgeführten Infektionsassays. Je nach Lokalisation des *L. monocytogenes*-Stammes können Rückschlüsse auf das jeweilige Protein gezogen werden, das in diesem Moment gerade benötigt wird.

Die eingeschränkte Funktion eines Virulenzgens aus *L. monocytogenes* erklärt aber nicht die Unterschiede hinsichtlich der Cytopathogenität von Stämmen gegenüber verschiedenen Zelllinien. Vertreter des Genotyps III können sich, wie erwähnt, kaum in Darmendothelzellen vermehren, zeichnen sich aber durch ein

---

hohes pathogenes Potenzial gegenüber Makrophagen aus. Die Signaltransduktion in Wirtszellen, die durch eine *L. monocytogenes*-Infektion ausgelöst wird, ist in beiden Zelllinien identisch (Kuhn und Goebel, 1998), Makrophagen sind jedoch im Gegensatz zu Darmendothelzellen aktiv phagozytierende Zellen. Virulente Vertreter der Art *L. monocytogenes* können in der Regel ihre eigene Aufnahme auch in nicht-phagozytische Zellen auslösen. Diese Induktion der Phagozytose wird vor allem durch die beiden Internaline A und B hervorgerufen (Dramsi *et al.*, 1993; Gaillard *et al.*, 1991; Lingnau *et al.*, 1995), die zusammen mit mindestens sieben weiteren Internalinen (InIC, InIC2, InID, InIE, InIF, InIG und InIH) einer großen Proteinfamilie angehören (Dramsi *et al.*, 1997; Engelbrecht *et al.*, 1996; Raffelsbauer *et al.*, 1998). Hauptsächlich InIA und InIB scheinen für die Aufnahme in nicht-phagozytische Säugerzelllinien verantwortlich zu sein (Dramsi *et al.*, 1997; Engelbrecht *et al.*, 1996), die InIA-vermittelte Aufnahme ist aber zusätzlich von der Präsenz weiterer Internaline abhängig (Bergmann *et al.*, 2002). Daher ist es wahrscheinlich, dass diese Virulenzfaktoren eine bedeutende Rolle in der Infektiosität von *L. monocytogenes* in den in dieser Arbeit untersuchten nicht-phagozytischen Darmendothelzellen spielen. Stämme aus Genotyp III könnten also durch einen Defekt in einem der benötigten Internaline nicht befähigt sein, die Phagozytose auszulösen, und können so ihre Wirtszelle auch nicht infizieren. *In vitro*-Infektionsstudien, bei denen extern zugesetzte Internaline aus hochvirulenten Stämmen der Art *L. monocytogenes* diesen Defekt aufheben sollen, könnten hier Aufschluss über die tatsächliche Funktion von InIA und InIB liefern.

### **D.3.3 Auswirkungen der Attenuation in Endothelzellen auf die Entwicklung einer systemischen Listeriose**

Aufgrund der beschriebenen Stammunterschiede wurden in dieser Arbeit basierend auf den drei *L. monocytogenes* Genotypen spezifische Unterschiede in Virulenz und Wirtszellspektrum in *in vitro*-Pathogenitätsstudien genauer untersucht. Hierzu dienten Darmepithelzellen, Makrophagen und Hepatocyten als untersuchte Zelllinien. Diese Zellen wurden ausgewählt, da sie im Patienten während einer systemischen Listeriose von *L. monocytogenes* befallen werden: Listerien gelangen in den Wirt unter anderem durch die Passage durch

Darmepithelzellen (Daniels *et al.*, 2000; Racz *et al.*, 1972), außerdem sind sie durch die erfolgreiche Infektion von Makrophagen und weiteren immunologisch aktiven Zellen vor der Immunabwehr des Wirts durch Antikörper geschützt (Vásquez-Boland *et al.*, 2001). Schließlich manifestiert sich eine systemische Listeriose unter anderem durch den Befall von Leber und Milz. Bakterielle Vermehrung findet in der Leber hauptsächlich in Hepatocyten statt, in denen die Listerien vor der Phagozytose durch Kupffer'sche Zellen geschützt sind. (Conlan und North, 1992).

Die Fähigkeit der drei *L. monocytogenes*-Genotypen, menschliche Endothelzellen in unterschiedlicher Ausprägung zu befallen bzw. sich in diesen zu vermehren, macht eine genauere Betrachtung des Verlaufs einer Listeriose-Erkrankung nötig. Da *L. monocytogenes* in der Regel durch kontaminierte Nahrungsmittel oral aufgenommen wird, befindet sich die Eintrittspforte in den menschlichen Körper im Darm des Wirtes. Bisher wurden hauptsächlich M-Zellen aus den Peyerschen Plaques für die Aufnahme von *L. monocytogenes* verantwortlich gemacht (Marco *et al.*, 1997; Pron *et al.*, 1998). Eine deutliche Konzentration des Inokulums an ebendiesen Peyerschen Plaques, wie sie beispielsweise für *Salmonella*, *Shigella* oder *Yersinia* spp. beschrieben ist (Autenrieth und Firsching, 1996; Clark *et al.*, 1994; Jones *et al.*, 1994; Perdomo *et al.*, 1994), konnte aber bei *L. monocytogenes* nicht beobachtet werden. Jüngste Veröffentlichungen berichten zudem von einer Assoziation von *L. monocytogenes* mit Endothelzellen des Darms (Daniels *et al.*, 2000). Die Autoren bedienten sich hier eines neuartigen *in vitro* Zellkulturverfahrens, in dem die Bildung von M-Zellen aus differenzierten Caco-2-Zellen durch Koinkubation mit aus Peyerschen Plaques stammenden Lymphocyten induziert wird (Kerneis *et al.*, 1997). Somit können *in vitro* Bedingungen simuliert werden, wie sie auch im Darmendothel vorherrschen. Daniels *et al.* konnten so den Einfluss von Endothelzellen hinsichtlich der Passage von *L. monocytogenes* aus dem Lumen des Darms in den Körper deutlich machen. Bereits 1972 konzentrierte sich eine weitere Studie auf die "epitheliale Phase" einer *L. monocytogenes*-Infektion (Racz *et al.*, 1972); hier stützt sich die Assoziation von Listerien mit Endothelzellen auf elektronenmikroskopische Untersuchungen. Der Ort des Eintritts von *L. monocytogenes* in den menschlichen Körper ist also bis heute nicht eindeutig geklärt, man ist sich jedoch des Einflusses

---

von Endothelzellen neben M-Zellen der Peyerschen Plaques in diesem Zusammenhang durchaus bewusst.

Die oben dargestellten Ergebnisse werfen ein völlig neues Bild auf die in dieser Arbeit ermittelten Virulenzunterschiede der drei *L. monocytogenes*-Genotypen in Bezug auf menschliche Caco-2-Zellen. Geht man von der Vermutung aus, dass diese Wirtszellen für den Eintritt von *L. monocytogenes* vonnöten sind, so sind auch die sowohl *in vivo* als auch mittels epidemiologischer Untersuchungen beobachteten Virulenzunterschiede leicht erklärbar. Da Listerien der Gruppe der intrazellulären pathogenen Organismen zugeordnet werden, können sie eine erfolgreiche Infektion des Wirtes nur dann etablieren, wenn sie befähigt sind, die erste Pforte, die in den Körper des Menschen führt, erfolgreich zu passieren.

Daraus ergeben sich auch hinsichtlich der Interpretation von *in vitro*-Zellkulturstudien Konsequenzen. Die starke Virulenz aller untersuchten *L. monocytogenes*-Stämme in J774-Makrophagen (siehe Abb. 23) muss beispielsweise nicht zwangsläufig auf die Pathogenität der entsprechenden Isolate hinweisen, da *in vivo* der Zugang zu weiteren Zellen des Körpers durch die schlechte Passage durch das Darmendothel verhindert wird.

## E Zusammenfassung

Die Art *Listeria monocytogenes* ist in erster Linie durch ihr pathogenes Potenzial im Menschen charakterisiert. Ihre nur fakultativ intrazelluläre Lebensweise ermöglicht es den Listerien aber auch, in diversen Habitaten in der Umwelt zu persistieren.

In der vorliegenden Arbeit wurde das Überleben von *L. monocytogenes* in Protozoen der Gattung *Acanthamoeba* untersucht. Ein Assay, der es erlaubt, Infektionsstudien über mehrere Wochen durchzuführen, wurde entwickelt, für die Art *L. monocytogenes* optimiert und mit zahlreichen Kontrollen abgesichert. Interessanterweise konnten alle untersuchten zur Verfügung stehenden Virulenzgenmutanten ebenso wie Vertreter aus allen drei *L. monocytogenes*-Genotypen in Acanthamöben überleben. Das Überleben in Umweltprotozoen ist also ein Charakteristikum, das nicht von der Aktivität bekannter Virulenzgene abhängt. Durch Transmissionselektronenmikroskopie infizierter Amöbenzellen konnte gezeigt werden, dass sich *L. monocytogenes*-Zellen in Trophozoiten, dem teilungsfähigen und stoffwechselaktiven Stadium der Acanthamöben, im Gegensatz zur menschlichen Wirtszelle in Vakuolen befinden, während mittels konfokaler Laserscanning-Mikroskopie die Persistenz der Listerien in Amöbencysten in der Cystenwand nachgewiesen wurde.

Der Verlust listerieller Virulenzgene wird in Umweltisolaten, die unter Umständen über längere Zeit nicht mit Wirtszellen in Kontakt waren, nicht beobachtet. Auch wenn für die Persistenz in Acanthamöben diese Virulenzfaktoren nicht benötigt werden, so könnte doch eine Erklärung darin liegen, dass diese Gene für das Überleben in weiteren niederen Eukaryonten benötigt werden. In dieser Arbeit konnte die Virulenzgenexpression in *L. monocytogenes* auch bei niedrigen Temperaturen durch einen RT-PCR-Ansatz und die damit verbundene Amplifikation von mRNA des listeriellen Virulenzgens *plcB* gezeigt werden.

Zudem wurde mit Hilfe von sogenannten Enclosures die Persistenz von *L. monocytogenes* in der Umwelt hinsichtlich stammspezifischer Unterschiede der drei *L. monocytogenes*-Genotypen untersucht. In diesem Zusammenhang konnten Vertreter des Genotyps III, die sich durch eine niedrige Virulenz in Säugerzellen auszeichnen, durch ihre hohe Umweltpersistenz charakterisiert werden. Im Gegensatz dazu sind einige hochvirulente Vertreter der Art *L. monocytogenes* aus den Genotypen I und II nach längeren Inkubationsperioden nicht mehr in der Umwelt detektierbar. Diese Stämme sind demnach möglicherweise stärker auf den Menschen als Wirt spezialisiert und können in anderen Habitaten nicht gegen niedriger virulente Stämme konkurrieren.

---

In einem weiteren Versuch wurden in dieser Arbeit Genotyp-spezifische Unterschiede innerhalb der Art *L. monocytogenes* hinsichtlich ihrer Virulenz in Säugerzelllinien untersucht. Interessanterweise sind Stämme des Genotyps III annähernd avirulent gegenüber menschlichen Darmendothelzellen, wohingegen in allen untersuchten Stämmen die gleiche Virulenz für Hepatocyten und Makrophagen bestimmt werden konnte. Die Attenuation von Vertretern des Genotyps III könnte also bereits zu Beginn einer Infektion des Wirtes *in vivo* auf eine beeinträchtigte Infektiosität im Darmepithel, mit dem die Listerien durch die Aufnahme kontaminierter Nahrung in Kontakt kommen, zurückzuführen sein. Die untersuchten Stämme sind zwar attenuiert im intrazellulären Überleben in den entsprechenden Endothelzellen, können aber ebenso wie Vertreter aus den Genotypen I und II gleichermaßen effektiv an diese Wirtszellen adhären. Dies wurde durch Untersuchungen mit dem die Aktinumlagerung verhindernden, toxischen Agens Cytochalasin D gezeigt.

## F Literaturverzeichnis

Abedi, H. & Zachary, I. (1998). Cytochalasin D stimulation of tyrosine phosphorylation and phosphotyrosine-associated kinase activity in vascular smooth muscle cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **245**, 646-650.

Amann, R., Springer, N., Schönhuber, W., Ludwig, W., Schmid, E. N., Müller, K. D. & Michel, R. (1997). Obligat intracellular bacterial parasites of acanthamoebae related to *Chlamydia* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 115-121.

Armstrong, M. (2000). The pathogenesis of human *Acanthamoeba* infection. *Infect. Dis. Rev.* **2**, 65-73.

Audurier, A. & Martin, C. (1989). Phage typing of *Listeria monocytogenes* and related species. *International Journal of Food Microbiology* **8**, 251-257.

Autenrieth, I. B. & Firsching, R. (1996). Penetration of M cells and destruction of Peyer's patches by *Yersinia enterocolitica*: an ultrastructural and histological study. *J. Med. Microbiol.* **44**, 285-294.

Bannerman, E., Boerlin, P. & Bille, J. (1996). Typing of *Listeria monocytogenes* by monocin and phage receptors. *Int. J. Food Microbiol.* **31**, 245-262.

Barbour, A. H., Rampling, A. & Hormaeche, C. E. (1996). Comparison of the infectivity of isolates of *Listeria monocytogenes* following intragastric and intravenous inoculation in mice. *Microb. Pathog.* **20**, 247-253.

Barbour, A. H., Rampling, A. & Hormaeche, C. E. (2001). Variation in the infectivity of *Listeria monocytogenes* isolates following intragastric inoculation of mice. *Infect. Immun.* **69**, 4657-4660.

Barker, J. & Brown, M. R. (1994). Trojan horses of the microbial world: protozoa and the survival of bacterial pathogens in the environment. *Microbiology* **140**, 1253-1259.

Barker, J., Lambert, P. A. & Brown, M. R. (1993). Influence of intra-amoebic and other growth conditions on the surface properties of *Legionella pneumophila*. *Infect. Immun.* **61**, 3503-3510.

Barker, J., Scaife, H. & Brown, M. R. (1995). Intraphagocytic growth induces an antibiotic-resistant phenotype of *Legionella pneumophila*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**, 2684-2688.

Barlow, R. M. & McGorum, B. (1985). Ovine listerial encephalitis, analysis, hypothesis, and synthesis. *Vet. Rec.* **116**, 223-236.

Bergmann, B., Raffelsbauer, D., Kuhn, M., Goetz, M., Hom, S. & Goebel, W. (2002). InIA- but not InIB-mediated internalization of *Listeria monocytogenes* by

---

non-phagocytic mammalian cells needs the support of other internalins. *Mol. Microbiol.* **43**, 557-570.

Bibb, W. F., Gellin, B. G., Weaver, R., Schwartz, B., Plikaytis, B. D., Reeves, M. W., Pinner, R. W. & Broome, C. V. (1990). Analysis of clinical and foodborne isolates of *Listeria monocytogenes* in the United States by multilocus enzyme electrophoresis and application of the method to epidemiological investigations. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 2133-2141.

Bibb, W. F., Schwartz, B., Gellin, B. G., Plikaytis, B. D. & Weaver, R. E. (1989). Analysis of *Listeria monocytogenes* by multilocus enzyme electrophoresis and application of the method to epidemiologic investigations. *Int. J. Food Microbiol.* **8**, 233-239.

Birtles, R. J., Rowbotham, T. J., Storey, C., Marrie, T. J. & Raoult, D. (1997). *Chlamydia*-like obligate parasite of free-living amoebae. *Lancet* **349**, 925-926.

Bizet, C. & Rocourt, J. (1988). Listeriose et SIDA, Rareté paradoxale de cette association. *Med. Malad. Infect.* **12**, 900-.

Boerlin, P. & Piffaretti, J. C. (1991). Typing of human, animal, food and environmental isolates of *Listeria monocytogenes* by multilocus enzyme electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 1624-1629.

Boerlin, P., Rocourt, J. & Piffaretti, J. C. (1991). Taxonomy of the genus *Listeria* by using multilocus enzyme electrophoresis. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **41**, 59-64.

Bohne, J., Kestler, H., Uebele, C., Sokolovic, Z. & Goebel, W. (1996). Differential regulation of the virulence genes of *Listeria monocytogenes* by the transcriptional activator PrfA. *Mol. Microbiol.* **20**, 1189-1198.

Bohne, J., Sokolovic, Z. & Goebel, W. (1994). Transcriptional regulation of *prfA* and PrfA-regulated virulence genes in *Listeria monocytogenes*. *Mol. Microbiol.* **11**, 1141-1150.

Bowers, B. & Korn, E. D. (1968). The fine structure of *Acanthamoeba castellanii*. *J. Cell Biol.* **39**, 95-111.

Braun, L. & Cossart, P. (2000). Interactions between *Listeria monocytogenes* and host mammalian cells. *Microbes Infect.* **2**, 803-11.

Brosch, R., Brett, M., Catimel, B., Luchansky, J. B., Ojeniyi, B. & Rocourt, J. (1996). Genomic fingerprinting of 80 strains from the WHO multicenter international typing study of *Listeria monocytogenes* via pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). *Int. J. Food Microbiol.* **32**, 343-355.

Brosch, R., Chen, J. & 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.

Bubert, A., Kohler, S. & Goebel, W. (1992). The homologous and heterologous regions within the *iap* gene allow genus- and species-specific identification of *Listeria* spp. by polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 2625-2632.

Bubert, A., Sokolovic, Z., Chun, S. K., Papatheodorou, L., Simm, A. & 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. & Rocourt, J. (1993). Pulsed-field gel electrophoresis applied for comparing *Listeria monocytogenes* strains involved in outbreaks. *Can. J. Microbiol.* **39**, 395-401.

Buncic, S., Avery, S. M., Rocourt, J. & Dimitrijevic, M. (2001). Can food-related environmental factors induce different behaviour in two key serovars, 4b and 1/2a, of *Listeria monocytogenes*? *Int. J. Food Microbiol.* **65**, 201-212.

Caugant, D. A., Ashton, F. E., Bibb, W. F., Boerlin, P., Donachie, W., Low, C., Gilmour, A., Harvey, J. & Norrung, B. (1996). Multilocus enzyme electrophoresis for characterization of *Listeria monocytogenes* isolates: results of an international comparative study. *Int. J. Food Microbiol.* **32**, 301-311.

Chakraborty, T., Ebel, F., Wehland, J., Dufrenne, J. & Notermans, S. (1994). Naturally occurring virulence-attenuated isolates of *Listeria monocytogenes* capable of inducing long term protection against infection by virulent strains of homologous and heterologous serotypes. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **10**, 1-9.

Chakraborty, T., Leimeister-Wachter, M., Domann, E., Hartl, M., Goebel, W., Nichterlein, T. & Notermans, S. (1992). Coordinate regulation of virulence genes in *Listeria monocytogenes* requires the product of the *prfA* gene. *J. Bacteriol.* **174**, 568-574.

Cirillo, J. D., Falkow, S., Tompkins, L. S. & Bermudez, L. E. (1997). Interaction of *Mycobacterium avium* with environmental amoebae enhances virulence. *Infect. Immun.* **65**, 3759-3767.

Cirillo, S. L., Yan, L., Littman, M., Samrakandi, M. M. & Cirillo, J. D. (2002). Role of the *Legionella pneumophila rtxA* gene in amoebae. *Microbiology* **148**, 1667-1677.

Clark, M. A., Jepson, M. A., Simmons, N. L. & Hirst, B. H. (1994). Preferential interaction of *Salmonella typhimurium* with mouse Peyer's patch M cells. *Res. Microbiol.* **145**, 543-552.

Conlan, J. W. & North, R. J. (1992). Early pathogenesis of infection in the liver with the facultative intracellular bacteria *Listeria monocytogenes*, *Francisella tularensis*, and *Salmonella typhimurium* involves lysis of infected hepatocytes by leukocytes. *Infect. Immun.* **60**, 5164-5171.

Conte, M. P., Longhi, C., Polidoro, M., Petrone, G., Buonfiglio, V., Di Santo, S., Papi, E., Seganti, L., Visca, P. & Valenti, P. (1996). Iron availability affects entry of

---

*Listeria monocytogenes* into the enterocytelike cell line Caco-2. Infect. Immun. **64**, 3925-3929.

Cossart, P. & Lecuit, M. (1998). Interactions of *Listeria monocytogenes* with mammalian cells during entry and actin-based movement: bacterial factors, cellular ligands and signaling. 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. Infect. Immun. **57**, 3629-3636.

Daniels, J. J., Autenrieth, I. B. & Goebel, W. (2000). Interaction of *Listeria monocytogenes* with the intestinal epithelium. FEMS Microbiol. Lett. **190**, 323-328.

Datta, A. R. & Kothary, M. H. (1993). Effects of glucose, growth temperature, and pH on listeriolysin O production in *Listeria monocytogenes*. Appl. Environ. Microbiol. **59**, 3495-3497.

Dramsi, S., Biswas, I., Maguin, E., Braun, L., Mastroeni, P. & Cossart, P. (1995). Entry of *Listeria monocytogenes* into hepatocytes requires expression of *inlB*, a surface protein of the internalin multigene family. Mol. Microbiol. **16**, 251-261.

Dramsi, S., Dehoux, P., Lebrun, M., Goossens, P. L. & Cossart, P. (1997). Identification of four new members of the internalin multigene family of *Listeria monocytogenes* EGD. Infect. Immun. **65**, 1615-1625.

Dramsi, S., Kocks, C., Forestier, C. & Cossart, P. (1993). Internalin-mediated invasion of epithelial cells by *Listeria monocytogenes* is regulated by the bacterial growth state, temperature and the pleiotropic activator *prfA*. Mol. Microbiol. **9**, 931-941.

Drevets, D. A. (1998). *Listeria monocytogenes* virulence factors that stimulate endothelial cells. Infect. Immun. **66**, 232-238.

Drevets, D. A. (1999). Dissemination of *Listeria monocytogenes* by infected phagocytes. Infect. Immun. **67**, 3512-3517.

Durand, M. L., Calderwood, S. B., Weber, D. J., Miller, S. I., Southwick, F. S., Caviness, V. S., Jr. & Swartz, M. N. (1993). Acute bacterial meningitis in adults. A review of 493 episodes. N. Engl. J. Med. **328**, 21-28.

Engelbrecht, F., Chun, S.-K., Ochs, C., Hess, J., Lottspeich, F., Goebel, W. & Sokolovic, Z. (1996). A new PrfA-regulated gene of *Listeria monocytogenes* encoding a small, secreted protein which belongs to the family of internalins. Mol. Microbiol. **21**, 823-837.

Ericsson, H., Unnerstad, H., Mattsson, J. G., Danielsson-Tham, M. L. & Tham, W. (2000). Molecular grouping of *Listeria monocytogenes* based on the sequence of the *inlB* gene. J. Med. Microbiol. **49**, 73-80.

Espaze, E. P., Gautreau, D., Catimel, B., Miegerville, A. 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. (1989). Thermal resistance of *Listeria monocytogenes* in foods. *Int. J. Food Microbiol.* **8**, 285-291.

Farber, J. M. & Peterkin, P. I. (1991). *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiol. Rev.* **55**, 476-511.

Fleming, D. W., Cochi, S. L., MacDonald, K. L., Brondum, J., Hayes, P. S., Plikaytis, B. D., Holmes, M. B., Audurier, A., Broome, C. V. & Reingold, A. L. (1985). Pasteurized milk as a vehicle of infection in an outbreak of listeriosis. *N. Engl. J. Med.* **312**, 404-407.

Freitag, N. E., Rong, L. & Portnoy, D. A. (1993). Regulation of the *prfA* transcriptional activator of *Listeria monocytogenes*: multiple promoter elements contribute to intracellular growth and cell-to-cell spread. *Infect. Immun.* **61**, 2537-2544.

Fritsche, T. R., Horn, M., Seyedirashti, S., Gautom, R. K., Schleifer, K. H. & Wagner, M. (1999). In situ detection of novel bacterial endosymbionts of *Acanthamoeba* spp. phylogenetically related to members of the order Rickettsiales. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 206-212.

Fritsche, T. R., Horn, M., Wagner, M., Herwig, R. P., Schleifer, K. H. & Gautom, R. K. (2000). Phylogenetic diversity among geographically dispersed Chlamydiales endosymbionts recovered from clinical and environmental isolates of *Acanthamoeba* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 2613-2619.

Fritsche, T. R., Sobek, D. & Gautom, R. K. (1998). Enhancement of *in vitro* cytopathogenicity by *Acanthamoeba* spp. following acquisition of bacterial endosymbionts. *FEMS Microbiol. Lett.* **166**, 231-236.

Gaillard, J. L., Berche, P., Frehel, C., Gouin, E. & 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. & Sansonetti, P. (1987). In vitro model of penetration and intracellular growth of *Listeria monocytogenes* in the human enterocyte-like cell line Caco-2. *Infect. Immun.* **55**, 2822-2829.

Gaillard, J. L. & Finlay, B. B. (1996). Effect of cell polarization and differentiation on entry of *Listeria monocytogenes* into the enterocyte-like Caco-2 cell line. *Infect. Immun.* **64**, 1299-1308.

Gedde, M. M., Higgins, D. E., Tilney, L. G. & Portnoy, D. A. (2000). Role of listeriolysin O in cell-to-cell spread of *Listeria monocytogenes*. *Infect. Immun.* **68**, 999-1003.

---

Gellin, B. G. & Broome, C. V. (1989). Listeriosis. JAMA **261**, 1313-1320.

Geoffroy, C., Gaillard, J. L., Alouf, J. E. & Berche, P. (1987). Purification, characterization, and toxicity of the sulfhydryl-activated hemolysin listeriolysin O from *Listeria monocytogenes*. Infect. Immun. **55**, 1641-1646.

Geuenich, H. H., Muller, H. E., Schretten-Brunner, A. & Seeliger, H. P. (1985). The occurrence of different *Listeria* species in municipal waste water. Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg. [B] **181**, 563-565.

Geuenich, H.-H. & Müller, H. E. (1984). Isolierung und Keinzahlbestimmung von *Listeria monocytogenes* in ungeklärtem und biologisch gereinigtem Abwasser. Zentralbl. bakt. Hygiene **179**, 266-273.

Gilot, P., Genicot, A. & Andre, P. (1996). Serotyping and esterase typing for analysis of *Listeria monocytogenes* populations recovered from foodstuffs and from human patients with listeriosis in Belgium. J. Clin. Microbiol. **34**, 1007-1010.

Goulet, V., Rocourt, J., Rebiere, I., Jacquet, C., Moyse, C., Dehaumont, P., Salvat, G. & Veit, P. (1998). Listeriosis outbreak associated with the consumption of rillettes in France in 1993. J. Infect. Dis. **177**, 155-160.

Gustafsson, K. (1989). Growth and survival of four strains of *Francisella tularensis* in a rich medium preconditioned with *Acanthamoeba palestinensis*. Can. J. Microbiol. **35**, 1100-1104.

Hacker, J. & Kaper, J. B. (2000). Pathogenicity islands and the evolution of microbes. Annu. Rev. Microbiol. **54**, 641-679.

Harvey, J. & Gilmour, A. (1993). Occurrence and characteristics of *Listeria* in foods produced in Northern Ireland. Int. J. Food Microbiol. **19**, 193-205.

Harvey, J. & Gilmour, A. (1994). Application of multilocus enzyme electrophoresis and restriction fragment length polymorphism analysis to the typing of *Listeria monocytogenes* strains isolated from raw milk, nondairy foods, and clinical and veterinary sources. Appl. Environ. Microbiol. **60**, 1547-1553.

Herbert, K. C. & Foster, S. J. (2001). Starvation survival in *Listeria monocytogenes*: characterization of the response and the role of known and novel components. Microbiology **147**, 2275-2284.

Hof, H. (1990). Pathogenese und Therapie der Listeriose. Deut. Med. Wochenschrift **115**, 1639-1646.

Horn, M., Fritsche, T. R., Gautom, R. K., Schleifer, K. H. & Wagner, M. (1999). Novel bacterial endosymbionts of *Acanthamoeba* spp. related to the *Paramecium caudatum* symbiont *Caedibacter caryophilus*. Environ. Microbiol. **1**, 357-367.

Horn, M., Harzenetter, M. D., Linner, T., Schmid, E. N., Muller, K. D., Michel, R. & Wagner, M. (2001). Members of the Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides phylum as intracellular bacteria of acanthamoebae: proposal of 'Candidatus *Amoebophilus asiaticus*'. *Environ. Microbiol.* **3**, 440-449.

Horn, M., Wagner, M., Muller, K. D., Schmid, E. N., Fritsche, T. R., Schleifer, K. H. & Michel, R. (2000). *Neochlamydia hartmannellae* gen. nov., sp. nov. (Parachlamydiaceae), an endoparasite of the amoeba *Hartmannella vermiformis*. *Microbiology* **146**, 1231-1239.

Inglis, T. J., Rigby, P., Robertson, T. A., Dutton, N. S., Henderson, M. & Chang, B. J. (2000). Interaction between *Burkholderia pseudomallei* and *Acanthamoeba* species results in coiling phagocytosis, endamebic bacterial survival, and escape. *Infect. Immun.* **68**, 1681-1686.

Ireton, K. & Cossart, P. (1997). Host-pathogen interactions during entry and actin-based movement of *Listeria monocytogenes*. *Annu. Rev. Genet.* **31**, 113-138.

Jacquet, C., Catimel, B., Brosch, R., Buchrieser, C., Dehaumont, P., Goulet, V., Lepoutre, A., Veit, P. & Rocourt, J. (1995). Investigations related to the epidemic strain involved in the French listeriosis outbreak in 1992. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 2242-2246.

Jones, B. D., Ghori, N. & Falkow, S. (1994). *Salmonella typhimurium* initiates murine infection by penetrating and destroying the specialized epithelial M cells of the Peyer's patches. *J. Exp. Med.* **180**, 15-23.

Jones, D. & Seeliger, H. P. R. (1992). The genus *Listeria*. In *The Prokaryotes*, pp. 1595-1616. Edited by A. Balows, H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder & K.-H. Schleifer. Berlin: Springer-Verlag.

Jurado, R. L., Farley, M. M., Pereira, E., Harvey, R. C., Schuchat, A., Wenger, J. D. & Stephens, D. S. (1993). Increased risk of meningitis and bacteremia due to *Listeria monocytogenes* in patients with human immunodeficiency virus infection. *Clin. Infect. Dis.* **17**, 224-227.

Kahane, S., Dvoskin, B., Mathias, M. & Friedman, M. G. (2001). Infection of *Acanthamoeba polyphaga* with *Simkania negevensis* and *S. negevensis* survival within amoebal cysts. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 4789-4795.

Kajava, A. V. (1998). Structural diversity of leucine-rich repeat proteins. *J. Mol. Biol.* **277**, 519-527.

Kathariou, S., Metz, P., Hof, H. & Goebel, W. (1987). Tn916-induced mutations in the hemolysin determinant affecting virulence of *Listeria monocytogenes*. *J. Bacteriol.* **169**, 1291-1297.

Kerneis, S., Bogdanova, A., Kraehenbuhl, J. P. & Pringault, E. (1997). Conversion by Peyer's patch lymphocytes of human enterocytes into M cells that transport bacteria. *Science* **277**, 949-952.

---

Khan, N. A. (2001). Pathogenicity, morphology, and differentiation of *Acanthamoeba*. *Curr. Microbiol.* **43**, 391-395.

Kocks, C., Gouin, E., Tabouret, M., Berche, P., Ohayon, H. & Cossart, P. (1992). *L. monocytogenes*-induced actin assembly requires the actA gene product, a surface protein. *Cell* **68**, 521-31.

Kolb-Mäurer, A., Pilgrim, S., Kampgen, E., McLellan, A. D., Brocker, E. B., Goebel, W. & Gentschev, I. (2001). Antibodies against listerial protein 60 act as an opsonin for phagocytosis of *Listeria monocytogenes* by human dendritic cells. *Infect. Immun.* **69**, 3100-3109.

Kuhn, M. & Goebel, W. (1995). Molecular studies on the virulence of *Listeria monocytogenes*. In *Genetic Engineering* Plenum Press, pp. 31-51. Edited by J. K. Setlow. New York: Plenum Press.

Kuhn, M. & Goebel, W. (1998). Host cell signalling during *Listeria monocytogenes* infection. *Trends Microbiol.* **6**, 11-15.

Langendonck, N. V., Bottreau, E., Bailly, S., Tabouret, M., Marly, J., Pardon, P. & Velge, P. (1998). Tissue culture assays using Caco-2 cell line differentiate virulent from non-virulent *Listeria monocytogenes* strains. *J. Appl. Microbiol.* **85**, 337-346.

Larsson, S., Cronberg, S. & Winblad, S. (1979). Listeriosis during pregnancy and neonatal period in Sweden 1958--1974. *Acta Paediatr. Scand.* **68**, 486-493.

Lecuit, M., Ohayon, H., Braun, L., Mengaud, J. & Cossart, P. (1997). Internalin of *Listeria monocytogenes* with an intact leucine-rich repeat region is sufficient to promote internalization. *Infect. Immun.* **65**, 5309-5319.

Leimeister-Wächter, M., Domann, E. & Chakraborty, T. (1992). The expression of virulence genes in *Listeria monocytogenes* is thermoregulated. *J. Bacteriol.* **174**, 947-952.

Lingnau, A., Domann, E., Hudel, M., Bock, M., Nichterlein, T., Wehland, J. & Chakraborty, T. (1995). Expression of the *Listeria monocytogenes* EGD *inIA* and *inIB* genes, whose products mediate bacterial entry into tissue culture cell lines, by PrfA-dependent and -independent mechanisms. *Infect. Immun.* **63**, 3896-3903.

Linnan, M. J., Mascola, L., Lou, X. D., Goulet, V., May, S., Salminen, C., Hird, D. W., Yonekura, M. L., Hayes, P. & Weaver, R. (1988). Epidemic listeriosis associated with Mexican-style cheese. *N. Engl. J. Med.* **319**, 823-8.

Litwin, C. M. & Calderwood, S. B. (1993). Role of iron in regulation of virulence genes. *Clin. Microbiol. Rev.* **6**, 137-49.

Loessner, M. J., Rees, C. E., Stewart, G. S. & Scherer, S. (1996). Construction of luciferase reporter bacteriophage A511::luxAB for rapid and sensitive detection of viable *Listeria* cells. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 1133-1140.

Loessner, M. J., Rudolf, M. & Scherer, S. (1997). Evaluation of luciferase reporter bacteriophage A511::*luxAB* for detection of *Listeria monocytogenes* in contaminated foods. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 2961-2965.

Louie, M., Jayaratne, P., Luchsinger, I., Devenish, J., Yao, J., Schlech, W. & Simor, A. (1996). Comparison of ribotyping, arbitrarily primed PCR, and pulsed-field gel electrophoresis for molecular typing of *Listeria monocytogenes*. *J. Clin. Microbiol.* **34**, 15-19.

Ludwig, W., Schleifer, K.-H. & Stackebrandt, E. (1984). 16S rRNA analysis of *Listeria monocytogenes* and *Brochothrix thermosphacta*. *FEMS Microbiol. Lett.* **25**, 199-204.

Ly, T. M. & Müller, H. E. (1990). Ingested *Listeria monocytogenes* survive and multiply in protozoa. *J. Med. Microbiol.* **33**, 51-54.

Marco, A. J., Altimira, J., Prats, N., Lopez, S., Dominguez, L., Domingo, M. & Briones, V. (1997). Penetration of *Listeria monocytogenes* in mice infected by the oral route. *Microb. Pathog.* **23**, 255-263.

Marolda, C. L., Hauröder, B., John, M. A., Michel, R. & Valvano, M. A. (1999). Intracellular survival and saprophytic growth of isolates from the *Burkholderia cepacia* complex in free-living amoebae. *Microbiology* **145**, 1509-1517.

Marquis, H., Doshi, V. & Portnoy, D. A. (1995). The broad-range phospholipase C and a metalloprotease mediate listeriolysin O-independent escape of *Listeria monocytogenes* from a primary vacuole in human epithelial cells. *Infect. Immun.* **63**, 4531-4534.

Marshall, M. M., Naumovitz, D., Ortega, Y. & Sterling, C. R. (1997). Waterborne protozoan pathogens. *Clin. Microbiol. Rev.* **10**, 67-85.

McLauchlin, J. (1987). *Listeria monocytogenes*, recent advances in the taxonomy and epidemiology of listeriosis in humans. *J. Appl. Bacteriol.* **63**, 1-11.

McLauchlin, J., Audurier, A., Frommelt, A., Gerner-Smidt, P., Jacquet, C., Loessner, M. J., van der Mee-Marquet, N., Rocourt, J., Shah, S. & Wilhelms, D. (1996). WHO study on subtyping *Listeria monocytogenes*: results of phage-typing. *Int. J. Food Microbiol.* **32**, 289-299.

McLauchlin, J., Crofts, N. & Campbell, D. M. (1989). A possible outbreak of listeriosis caused by an unusual strain of *Listeria monocytogenes*. *J. Infect.* **18**, 179-187.

McLauchlin, J., Hall, S. M., Velani, S. K. & Gilbert, R. J. (1991). Human listeriosis and pate: a possible association. *Bmj* **303**, 773-775.

---

Mead, P. S., Slutsker, L., Dietz, V., McCaig, L. F., Bresee, J. S., Shapiro, C., Griffin, P. M. & Tauxe, R. V. (1999). Food-related illness and death in the United States. *Emerg. Infect. Dis.* **5**, 607-625.

Mengaud, J., Braun-Breton, C. & Cossart, P. (1991a). Identification of phosphatidylinositol-specific phospholipase C activity in *Listeria monocytogenes*: a novel type of virulence factor? *Mol. Microbiol.* **5**, 367-372.

Mengaud, J., Dramsi, S., Gouin, E., Vazquez-Boland, J. A., Milon, G. & Cossart, P. (1991b). Pleiotropic control of *Listeria monocytogenes* virulence factors by a gene that is autoregulated. *Mol. Microbiol.* **5**, 2273-2283.

Mengaud, J., Geoffroy, C. & Cossart, P. (1991c). Identification of a new operon involved in *Listeria monocytogenes* virulence: its first gene encodes a protein homologous to bacterial metalloproteases. *Infect. Immun.* **59**, 1043-1049.

Mengaud, J., Ohayon, H., Gounon, P., Mege, R.-M. & Cossart, P. (1996). E-cadherin is the receptor for internalin, a surface protein required for entry of *L. monocytogenes* into epithelial cells. *Cell* **84**, 923-932.

Michel, R., Burghardt, H. & Bergmann, H. (1995). *Acanthamoeba*, naturally intracellularly infected with *Pseudomonas aeruginosa*, after their isolation from a microbiologically contaminated drinking water system in a hospital. *Zentralbl. Hyg. Umweltmed.* **196**, 532-544.

Michel, R., Muller, K. D., Amann, R. & Schmid, E. N. (1998). *Legionella*-like slender rods multiplying within a strain of *Acanthamoeba* sp. isolated from drinking water. *Parasitol. Res.* **84**, 84-88.

Milenbachs, A. A., Brown, D. P., Moors, M. & Youngman, P. (1997). Carbon-source regulation of virulence gene expression in *Listeria monocytogenes*. *Mol. Microbiol.* **23**, 1075-1085.

Molmeret, M., Alli, O. A., Radulic, M., Susa, M., Doric, M. & Kwaik, Y. A. (2002). The C-terminus of IcmT is essential for pore formation and for intracellular trafficking of *Legionella pneumophila* within *Acanthamoeba polyphaga*. *Mol. Microbiol.* **43**, 1139-1150.

Murray, E. G. D., Webb, R. A. & Swann, M. B. R. (1926). A disease of rabbits characterised by a large mononuclear leucocytosis, caused by a hitherto undescribed bacillus *Bacterium monocytogenes* (n. sp.). *J. Pathol. Bacteriol.* **29**, 407-439.

Norton, D. M., McCamey, M. A., Gall, K. L., Scarlett, J. M., Boor, K. J. & Wiedmann, M. (2001a). Molecular studies on the ecology of *Listeria monocytogenes* in the smoked fish processing industry. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 198-205.

Norton, D. M., Scarlett, J. M., Horton, K., Sue, D., Thimothe, J., Boor, K. J. & Wiedmann, M. (2001b). Characterization and pathogenic potential of *Listeria*

*monocytogenes* isolates from the smoked fish industry. Appl. Environ. Microbiol. **67**, 646-653.

Nyfelt, A. (1929). Etiologie de la mononucléose infectieuse. C. R. Soc. Biol. **101**, 806-809.

Oelmüller, U., Krüger, N., Steinbüchel, A. & Friedrich, C. G. (1990). Isolation of procaryotic RNA and detection of specific mRNA with biotinylated probes. J. Microbiol. Methods **11**, 73-84.

Parida, S. K., Domann, E., Rohde, M., Muller, S., Darji, A., Hain, T., Wehland, J. & Chakraborty, T. (1998). Internalin B is essential for adhesion and mediates the invasion of *Listeria monocytogenes* into human endothelial cells. Mol Microbiol **28**, 81-93.

Perdomo, J. J., Gounon, P. & Sansonetti, P. J. (1994). Polymorphonuclear leukocyte transmigration promotes invasion of colonic epithelial monolayer by *Shigella flexneri*. J. Clin. Invest. **93**, 633-643.

Piffaretti, J. C., Kressebuch, H., Aeschbacher, M., Bille, J., Bannerman, E., Musser, J. M., Selander, R. K. & Rocourt, J. (1989). Genetic characterization of clones of the bacterium *Listeria monocytogenes* causing epidemic disease. Proc Natl Acad Sci U S A **86**, 3818-3822.

Poyart, C., Abachin, E., Razafimanantsoa, I. & Berche, P. (1993). The zinc metalloprotease of *Listeria monocytogenes* is required for maturation of phosphatidylcholine phospholipase C: direct evidence obtained by gene complementation. Infect. Immun. **61**, 1576-1580.

Pron, B., Boumaila, C., Jaubert, F., Sarnacki, S., Monnet, J. P., Berche, P. & Gaillard, J. L. (1998). Comprehensive study of the intestinal stage of listeriosis in a rat ligated ileal loop system. Infect. Immun. **66**, 747-755.

Racz, P., Tenner, K. & Mero, E. (1972). Experimental *Listeria* enteritis. I. An electron microscopic study of the epithelial phase in experimental *Listeria* infection. Lab. Invest. **26**, 694-700.

Raffelsbauer, D., Bubert, A., Engelbrecht, F., Scheinpflug, J., Simm, A., Hess, J., Kaufmann, S. H. & Goebel, W. (1998). The gene cluster *inlC2DE* of *Listeria monocytogenes* contains additional new internalin genes and is important for virulence in mice. Mol. Gen. Genet. **260**, 144-158.

Rasmussen, O. F., Beck, T., Olsen, J. E., Dons, L. & Rossen, L. (1991). *Listeria monocytogenes* isolates can be classified into two major types according to the sequence of the listeriolysin gene. Infect. Immun. **59**, 3945-3951.

Rasmussen, O. F., Skouboe, P., Dons, L., Rossen, L. & Olsen, J. E. (1995). *Listeria monocytogenes* exists in at least three evolutionary lines: evidence from flagellin, invasive associated protein and listeriolysin O genes. Microbiology **141**, 2053-2061.

---

Raveneau, J., Geoffroy, C., Beretti, J. L., Gaillard, J. L., Alouf, J. E. & Berche, P. (1992). Reduced virulence of a *Listeria monocytogenes* phospholipase-deficient mutant obtained by transposon insertion into the zinc metalloprotease gene. *Infect. Immun.* **60**, 916-921.

Renzoni, A., Klarsfeld, A., Dramsi, S. & Cossart, P. (1997). Evidence that PrfA, the pleiotropic activator of virulence genes in *Listeria monocytogenes*, can be present but inactive. *Infect. Immun.* **65**, 1515-1518.

Reynolds, E. S. (1962). The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol.* **17**, 208-212.

Ripio, M. T., Dominguez-Bernal, G., Suarez, M., Brehm, K., Berche, P. & Vazquez-Boland, J. A. (1996). Transcriptional activation of virulence genes in wild-type strains of *Listeria monocytogenes* in response to a change in the extracellular medium composition. *Res. Microbiol.* **147**, 371-384.

Rivera, F., Lares, F., Gallegos, E., Ramirez, E., Bonilla, P., Calderon, A., Martinez, J. J., Rodriguez, S. & Alcocer, J. (1989). Pathogenic amoebae in natural thermal waters of three resorts of Hidalgo, Mexico. *Environ. Res.* **50**, 289-295.

Rohr, U., Weber, S., Michel, R., Selenka, F. & Wilhelm, M. (1998). Comparison of free-living amoebae in hot water systems of hospitals with isolates from moist sanitary areas by identifying genera and determining temperature tolerance. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 1822-1824.

Rowbotham, T. J. (1980). Preliminary report on the pathogenicity of *Legionella pneumophila* for freshwater and soil amoebae. *J. Clin. Pathol.* **33**, 1179-1183.

Rowbotham, T. J. (1983). Isolation of *Legionella pneumophila* from clinical specimens via amoebae, and the interaction of those and other isolates with amoebae. *J. Clin. Pathol.* **36**, 978-986.

Rowbotham, T. J. (1986). Current views on the relationships between amoebae, legionellae and man. *Isr. J. Med. Sci.* **22**, 678-689.

Russell, D. G. (1998). What does 'inhibition of phagosome-lysosome fusion' really mean? *Trends Microbiol.* **6**, 212-214.

Ryser, E. T. & Marth, E. H. (1988). Growth of *Listeria monocytogenes* at different pH values in uncultured whey or whey cultured with *Penicillium camemberti*. *Can. J. Microbiol.* **34**, 730-734.

Ryser, E. T. & Marth, E. H. (1989). Behavior of *Listeria monocytogenes* during manufacture and ripening of brick cheese. *J. Dairy Sci.* **72**, 838-853.

Schlech, W. F. (1984). New perspectives on the gastrointestinal mode of transmission in invasive *Listeria monocytogenes* infection. *Clin. Invest. Med.* **7**, 321-324.

Schlech, W. F., Luo, Q., Faulkner, G. & Galsworthy, S. (1994). Interaction of *Listeria* species with human cell monolayers. Clin. Invest. Med. **17**, 9-17.

Schmid, M., Walcher, M., Bubert, A., Wagner, M., Wagner, M. & Schleifer, K.-H. (2002). Nucleic acid based, cultivation independent detection of *Listeria* spp. and genotypes of *L. monocytogenes*. FEMS Immunol. Med. Microbiol. **submitted for publication**.

Schönberg, A., Bannerman, E., Courtieu, A. L., Kiss, R., McLauchlin, J., Shah, S. & Wilhelms, D. (1996). Serotyping of 80 strains from the WHO multicentre international typing study of *Listeria monocytogenes*. Int. J. Food Microbiol. **32**, 279-287.

Schönberg, A., Teufel, P. & Weise, E. (1989). Serovars of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* in food. Acta Microbiol. Hung. **36**, 249-253.

Schuchat, A., Swaminathan, B. & Broome, C. V. (1991). Epidemiology of human listeriosis. Clin. Microbiol. Rev. **4**, 169-183.

Schwarzkopf, A. (1996). *Listeria monocytogenes*-- aspects of pathogenicity. Pathol. Biol. (Paris) **44**, 769-774.

Seeliger, H. P. R. & Höhne, K. (1979). Serotyping of *Listeria monocytogenes* and related species. In Methods in Microbiology, pp. 31-39. Edited by T. Bergen & J. R. Norris. New York: Academic press.

Sheehan, B., Klarsfeld, A., Msadek, T. & Cossart, P. (1995). Differential activation of virulence gene expression by PrfA, the *Listeria monocytogenes* virulence regulator. J. Bacteriol. **177**, 6469-6476.

Sokolovic, Z., Schuller, S., Bohne, J., Baur, A., Rdest, U., Dickneite, C., Nichterlein, T. & Goebel, W. (1996). Differences in virulence and in expression of PrfA and PrfA-regulated virulence genes of *Listeria monocytogenes* strains belonging to serogroup 4. Infect. Immun. **64**, 4008-4019.

Southwick, F. S. & Purich, D. L. (1996). Intracellular pathogenesis of listeriosis. N. Engl. J. Med. **334**, 770-776.

Spencer, J. A. (1987). Perinatal listeriosis. Br. Med. J. (Clin. Res. Ed.) **295**, 349.

Spurr, A. R. (1969). A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. J. Ultrastruct. Res. **26**, 31-43.

Steinert, M., Birkness, K., White, E., Fields, B. & Quinn, F. (1998). *Mycobacterium avium* bacilli grow saprozoically in coculture with *Acanthamoeba polyphaga* and survive within cyst walls. Appl. Environ. Microbiol. **64**, 2256-2261.

---

Steinert, M., Emody, L., Amann, R. & Hacker, J. (1997). Resuscitation of viable but nonculturable *Legionella pneumophila* Philadelphia JR32 by *Acanthamoeba castellanii*. Appl. Environ. Microbiol. **63**, 2047-2053.

Strahl, E. D., Gillaspay, G. E. & Falkinham, J. O., 3rd (2001). Fluorescent acid-fast microscopy for measuring phagocytosis of *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, and *Mycobacterium scrofulaceum* by *Tetrahymena pyriformis* and their intracellular growth. Appl. Environ. Microbiol. **67**, 4432-4439.

Tabouret, M., de Rycke, J. & Dubray, G. (1992). Analysis of surface proteins of *Listeria* in relation to species, serovar and pathogenicity. J. Gen. Microbiol. **138**, 743-753.

Thom, S., Warhurst, D. & Drasar, B. S. (1992). Association of *Vibrio cholerae* with fresh water amoebae. J. Med. Microbiol. **36**, 303-306.

Tilney, L. G. & Portnoy, D. A. (1989). Actin filaments and the growth, movement, and spread of the intracellular bacterial parasite, *Listeria monocytogenes*. J. Cell. Biol. **109**, 1597-1608.

Tompkin, R. B. (2002). Control of *Listeria monocytogenes* in the food-processing environment. J. Food Prot. **65**, 709-725.

Traub, W. H., Spohr, M., Arnold, M. & Klotz, M. (1983). Bactericidal activity of antimicrobial drugs in simulated urine specimens at various temperatures of incubation. Zentralbl. Bakteriolog. Mikrobiol. Hyg. **255**, 494-502.

Vásquez-Boland, J.-A., Kuhn, M., Berche, P., Chakraborty, T., Domínguez-Bernal, G., Goebel, W., González-Zorn, B., Wehland, J. & Kreft, J. (2001). *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. Clin. Microbiol. Rev. **14**, 584-640.

Vazquez-Boland, J. A., Kocks, C., Dramsi, S., Ohayon, H., Geoffroy, C., Mengaud, J. & 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.

Vega, Y., Dickneite, C., Ripio, M.-T., Böckmann, R., González-Zorn, B., Novella, S., Domínguez-Bernal, G., Goebel, W. & Vásquez-Boland, J.-A. (1998). Functional similarities between the *Listeria monocytogenes* virulence regulator PrfA and cyclic AMP receptor protein: the PrfA\* (Gly145Ser) mutation increases binding affinity for target DNA. J. Bacteriol. **180**, 6655-6660.

Vines, A. & Swaminathan, B. (1997). Nucleotide sequence analysis of two virulence-associated genes in *Listeria monocytogenes* serotype 1/2b and comparison with the same genes in other serotypes important in human disease. Lett. Appl. Microbiol. **24**, 166-168.

Vines, A. & Swaminathan, B. (1998). Identification and characterization of nucleotide sequence differences in three virulence-associated genes of *Listeria*

*monocytogenes* strains representing clinically important serotypes. *Curr. Microbiol.* **36**, 309-318.

Watkins, J. & Sleath, K. P. (1981). Isolation and enumeration of *Listeria monocytogenes* from Sewage, Sewage Sludge and River Water. *J. Appl. Bacteriol.* **50**, 1-9.

Welshimer, H. J. (1968). Isolation of *Listeria monocytogenes* from vegetation. *J. Bacteriol.* **95**, 300-303.

White, D. G., Zhao, S., Simjee, S., Wagner, D. D. & McDermott, P. F. (2002). Antimicrobial resistance of food borne pathogens. *Microbes Infect.* **4**, 405-412.

Wiedmann, M., Bruce, J. L., Keating, C., Johnson, A. E., McDonough, P. L. & Batt, C. A. (1997). Ribotypes and virulence gene polymorphisms suggest three distinct *Listeria monocytogenes* lineages with differences in pathogenic potential. *Infect. Immun.* **65**, 2707-2716.

Winiecka-Krusnell, J. & Linder, E. (2001). Bacterial infections of free-living amoebae. *Res. Microbiol.* **152**, 613-619.

Winiecka-Krusnell, J., Wreiber, K., von Euler, A., Engstrand, L. & Linder, E. (2002). Free-living amoebae promote growth and survival of *Helicobacter pylori*. *Scand. J. Infect. Dis.* **34**, 253-256.

Winn, W. C. (1986). Legionnaires' disease: a historical perspective. *Clin. Microbiol. Rev.* **1**, 60-81.

Wisniewski, J. M. & Bielecki, J. E. (1999). Intracellular growth of *Listeria monocytogenes* insertional mutant deprived of protein p60. *Acta Microbiol. Pol.* **48**, 317-329.

Woese, C. R. (1987). Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* **51**, 221-271.



Die vorliegende Arbeit wurde am Lehrstuhl für Mikrobiologie der Technischen Universität München unter der Leitung von Dr. Michael Wagner im Zeitraum von Mai 1999 bis September 2002 angefertigt.

**An dieser Stelle möchte ich allen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit direkt oder indirekt beigetragen haben:**

Zunächst gilt mein herzlichster Dank meinem Betreuer, Dr. Michael Wagner, der durch alle Höhen und Tiefen in unerklärlichsten Situationen stets eine Erklärung gefunden hat.

Prof. Dr. Karl-Heinz Schleifer, der seinem Namen gottseidank nie gerecht wurde, für viele schöne Jahre am Lehrstuhl für Mikrobiologie.

Meiner „Diplomandin“ Astrid Collingro, die es nicht immer leicht hatte, ihr Engagement und ihre gute Laune aber trotzdem nie verloren hat und mir nicht nur dadurch viel geholfen hat. Die Platten vermissen Dich...

Matthias Horn für viele nicht nur fachliche Gespräche und Tips und seine verständnisvolle Art.

All meinen Labor-Jungs, die in all den Jahren kamen und gingen: Justyna Adamczyk (was...?), Uli Purkhold, Kilian Stecker (es geht noch flacher!), Angelika Lehner, Lotte Bjerrum (der Rasiergummi), Regina Nogueira (How can I know, I didn't touch!) und Helga Gaenge, die ausnahmslos eine nette Stimmung verbreitet haben und den Laboralltag aufgefrischt haben.

Und natürlich allen weiteren Mitgliedern aus dem Wagner-Labor, Stephan Schmitz-Esser (vielleicht klappt's ja doch nochmal mit Griechenland), Alex Loy (räum's aber wieder auf!), Holgi Daims, Natuscka Lee, Cora Beier, Mike Klein, Stefane Juretschko, Markus Schmid und Sibylle Schadhauser, es war eine schöne Zeit.

Allen Eberls und Luckis, von denen mich die meisten die gesamte Zeit meiner Arbeit durch begleitet haben und die oft für ein nettes Gespräch da waren.

Und allen „Würzburgern“ aus der Arbeitsgruppe Prof. Kreft, besonders Silke Weber, die mir mit ihrer großen Hilfe und sehr viel guter Laune die Zellkulturen näher brachte. Den „Gelben Wagen“ werd' ich nicht so schnell vergessen.

Dr. Michael Schweikert von der Universität Stuttgart, ohne dessen große Hilfe die Elektronenmikroskopie nicht möglich gewesen wäre.

Nicht vergessen möchte ich natürlich meine Freunde und Familie, die immer für mich da sind und waren und mir durch so vieles geholfen haben.

Zuletzt Dir, Nicki, für elends lange Gespräche, sei es am Telefon oder direkt, in denen Du es immer verstanden hast, mich auch in schwierigen Situationen wieder aufzubauen und mir die Motivation zu geben, weiterzumachen.

DANKE!!!

# LEBENS LAUF

## Marion Walcher

**Geschäftsadresse**            Lehrstuhl für Mikrobiologie, TU München  
Am Hochanger 4  
85350 Freising  
Deutschland  
Tel.: +49-8161-715468  
Fax.: +49-8161-715475  
e-mail: walcher@mikro.biologie.tu-muenchen.de

**Heimatanschrift**            Dr. Hofmeister Str. 20  
85764 Oberschleißheim  
Deutschland  
Tel.: +49-89-3150538

### Persönliche Daten

Geburtsdatum                21. November 1973

Geburtsort                    Dachau

Staatsangehörigkeit        Deutsch

### Schulbildung

1980 - 1984                    Grundschule, Jahnstraße, Oberschleißheim

1984 - 1993                    Dom-Gymnasium, Freising, Abiturnote: 2,3

### Studium und beruflicher Werdegang

November 1993 –              Studium der Diplom-Biologie an der Technischen Universität  
April 1999                      München. Hauptfach Mikrobiologie; Nebenfächer Virologie,  
Ökotoxikologie und Limnologie  
Diplomabschluß mit Auszeichnung

Thema der Diplomarbeit:    Vergleichende Sequenzanalyse des *iap*-Gens als Grundlage für  
die Differenzierung von *Listeria monocytogenes*-Stämmen und  
für die Entwicklung eines stammspezifischen PCR-  
Nachweisverfahrens

Seit Mai 1999                 Promotion an der Technischen Universität München, Betreuer:  
PD Dr. habil. Michael Wagner  
Thema: Auswirkungen stammspezifischer Unterschiede auf  
Ökologie und Virulenz von *Listeria monocytogenes*