

**Vergleichende Untersuchung der Internaline und PrfA-
abhängigen Transkription in *Listeria monocytogenes*,
L. ivanovii und *L. seeligeri***



DISSERTATION

zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Norman Mauder

aus

Dettelbach

Würzburg, September 2006

Erklärung

Die vorliegende Arbeit wurde von mir selbständig und nur unter der Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt.

Diese Dissertation hat weder in gleicher noch in ähnlicher Form in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen.

Ich habe früher, außer den mit dem Zulassungsgesuch urkundlich vorgelegten Graden, keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Würzburg, September 2006

Norman Mauder

Eingereicht am: 2006.09.15

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender: **Prof. Dr. Martin Müller**

im Kolloquium vertreten durch: **Prof. Dr. Wolfgang Rössler**

Erstgutachter: **Prof. Dr. Werner Goebel**

Zweitgutachter: **Prof. Dr. Friedrich Grummt**

Tag des Promotionskolloquiums: 2007.02.07

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Danksagung

Zuerst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Werner Goebel für die Betreuung dieser Arbeit und die Bereitstellung des Arbeitsplatzes bedanken. Mein Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. Friedrich Grummt für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Bedanken möchte ich mich weiter bei den Mitarbeitern des Instituts, welche diese Arbeit auf die eine oder andere Art unterstützt haben, und sei es "nur" durch das Heben meiner Stimmung. Insbesondere möchte ich hier meine Kollegen aus den Laboren C228/229 hervorheben, namentlich Dr. Stefanie Müller-Altrock (ihr danke ich an dieser Stelle nochmals für das Korrekturlesen dieser Arbeit), Sonja Mertins, Regina Ecke und Dr. Biju Joseph, die mich "adoptiert" haben und mir mit Rat und Tat zur Seite standen. Michael Pflock und Victor Weidmann danke ich für viele interessante Gespräche. Auch danken möchte ich Dr. Sabine Pilgrim für die Hilfe bei der Herstellung der poly- und monoklonalen Antikörper.

Nicht zuletzt möchte ich meinen Eltern danken, die mich während des gesamten Studiums unterstützt und damit auch zum Gelingen diese Arbeit beigetragen haben.

A	ZUSAMMENFASSUNG/ABSTRACT	4
A.1	Zusammenfassung	4
A.2	Abstract	6
B	EINLEITUNG	9
B.1	Die Gattung <i>Listeria</i>	9
B.2	<i>Listeria monocytogenes</i>	10
B.2.1	Pathogenese	10
B.2.2	Der zentrale Regulator PrfA	12
B.2.3	Internaline	17
B.3	Zielsetzung	20
C	MATERIAL UND METHODEN	22
C.1	Verwendete Mikroorganismen	22
C.2	Verwendete Zelllinien	22
C.3	Plasmide	22
C.4	Oligonukleotide	23
C.4.1	für Klonierung in pQE	23
C.4.2	für Sequenzierung von pQE Vektoren plus Inserts	24
C.4.3	für Klonierung in pUC18	25
C.4.4	für Klonierung in pLSV101	26
C.4.5	für Primer Extension	26
C.4.6	für in vitro Transkription	26
C.5	Allgemeine Puffer und Reagenzien	27
C.6	Bakterienmedien und Antibiotika	28
C.6.1	Bakterienmedien	28
C.6.2	Antibiotika, Stammlösungen	29
C.7	Zellkultur	29
C.7.1	Zellkulturmedien, und -puffer	29
C.7.2	Kultivierung der Zellen	30
C.8	Klonierungsmethoden	30
C.8.1	PCR-Mix (100 µl Ansatz)	30
C.8.2	Gelladepuffer (für DNA Agarosegele), 6×	30
C.8.3	Anwendung von Ethidiumbromid	30
C.8.4	Isolierung chromosomaler DNA (aus <i>Listerien</i>)	30
C.8.5	Herstellung kompetenter Bakterien	31
C.8.6	Restriktionsverdau	32
C.8.7	Ligation	32
C.8.8	Transformation	32
C.8.9	DNA/RNA-Messung	32
C.8.10	DNA-Reinigung mit Phenol/Chloroform	33
C.8.11	DNA-Präzipitation	33
C.8.12	Mutagenese durch homologe Rekombination	33

C.9	DNA Sequenzierung	35
C.9.1	Automatische Sequenzierung	35
C.9.2	Sequenzierung mit T7 Sequencing Kit	35
C.10	Proteinreinigung mittels His-Tag und Ni-NTA-Agarose	36
C.10.1	Liste der isolierten His ₆ -markierten Proteine	36
C.10.2	Klonierung	36
C.10.3	Aufreinigung	36
C.10.4	ÄKTAprime	37
C.10.5	Photometrische Proteinkonzentrationsbestimmung	37
C.11	Präparation von listeriellen Proteinen	38
C.11.1	Zellwandassoziierte Proteine	38
C.11.2	Zytosolische Proteine	39
C.11.3	Überstandsproteine	39
C.12	Photometrischer Hämolyseassay	39
C.13	Polyacrylamid Gelelektrophorese (PAGE)	39
C.13.1	Material	39
C.13.2	Herstellung von Trenn- und Sammelgel	40
C.14	Gelfärbung	40
C.14.1	Coomassie Färbung	40
C.14.2	Silberfärbung	41
C.15	Western Blot	41
C.15.1	Blotting	42
C.15.2	Dekoration und ECL	42
C.15.3	Stripping	43
C.16	Beschichtung von MaxiSorp™ Mikrotiterplatten	43
C.16.1	Material	43
C.16.2	Durchführung	44
C.17	Hexosaminidase-Assay	44
C.17.1	Material	44
C.17.2	Durchführung	45
C.18	Herstellung von Antikörpern in Mäusen	45
C.18.1	Polyklonale Antikörper	45
C.18.2	Monoklonale Antikörper	45
C.19	RNA Methoden	48
C.19.1	DEPC-Behandlung	48
C.19.2	6% Polyacrylamid-/ 8M Harnstoffgel	48
C.20	Aufreinigung von RNA-Polymerase	49
C.20.1	Material	49
C.20.2	Durchführung	49
C.21	"run off" in vitro Transkription	50
C.21.1	Reagenzien	50
C.21.2	<i>in vitro</i> Transkriptionsansatz	51
C.22	Primer Extension	52
C.22.1	Material	52
C.22.2	Durchführung	52
C.23	Optische Quantifizierung von Produktmengen	53

C.23.1	Digitale Bildvermessung mit ImageQuant™	53
C.23.2	Storage Phosphor Screen	53
D	ERGEBNISSE	54
D.1	Untersuchung von InlG, InlH und InlE	54
D.1.1	Antikörper	54
D.1.2	Expression der Internaline G, H und E	57
D.2	Interaktionspartner von Internalin C (InlC)	60
D.2.1	Untersuchungen der Zelladhärenz mittels Hexosaminidase Assay	60
D.3	Untersuchung listerieller Promotoren	63
D.3.1	Aufreinigung von PrfA Proteinen	63
D.3.2	Internalin Promotoren von <i>L. ivanovii</i>	64
D.3.3	Untersuchung des <i>plcA/hly</i> Promotors	69
D.3.4	Aktivität verschiedener PrfA Proteine	72
E	DISKUSSION	81
E.1	Untersuchung der Internaline G, H, E und C	81
E.1.1	Immunoblots	82
E.1.2	Zelladhärenzassays	83
E.2	Untersuchung PrfA-abhängiger Promotoren	85
E.2.1	Internalin Promotoren von <i>L. ivanovii</i>	85
E.2.2	Untersuchung des <i>plcA/hly</i> Promotors	88
E.2.3	Artspezifische Unterschiede in der Aktivität von PrfA	91
E.2.4	Ausblick	97
F	QUELLEN	99
G	ANHANG	108
G.1	Zusatzmaterial	108
G.1.1	Promotorsequenzen in pUC18	108
G.1.2	ClustalW Alignments	110
G.2	Akronyme	112
G.2.1	Gebräuchliche Abkürzungen	112
G.2.2	Dezimale Größenangaben	114
G.3	Lebenslauf	114
G.4	Publikationen	115
G.5	Posterpräsentationen	115

A Zusammenfassung/Abstract

A.1 Zusammenfassung

Die Gattung *Listeria* umfasst sechs bekannte Arten ubiquitär vorkommender Gram-positiver, nicht sporulierender Stäbchenbakterien. Von diesen Spezies sind *Listeria monocytogenes* und *L. ivanovii* in der Lage bei Mensch und Tier das Krankheitsbild der Listeriose zu verursachen (Rocourt & Seeliger, 1985; Vázquez-Boland *et al.*, 2001b; Weis & Seeliger, 1975), wobei *L. ivanovii* vorwiegend bei Tieren als Krankheitserreger vorkommt (Cummins *et al.*, 1994; Hof & Hefner, 1988). *L. monocytogenes* gilt als wichtiges Modell für ein intrazelluläres Pathogen, das mit Hilfe seiner Internaline auch in nicht-professionelle Phagozyten invadieren (Gaillard *et al.*, 1991; Lingnau *et al.*, 1995) und sich dank einer Reihe weiterer Virulenzfaktoren im Zytoplasma vermehren, fortbewegen und Nachbarzellen infizieren kann (Tilney & Portnoy, 1989). Die beiden pathogenen Arten und das apathogene *L. seeligeri* besitzen eine als LIPI-1 bezeichnete Pathogenitätsinsel (Gouin *et al.*, 1994; Kreft *et al.*, 2002). Internalingene sind bei *L. monocytogenes* teilweise geclustert und bei *L. ivanovii* zu einem großen Teil in einer LIPI-2 genannten Pathogenitätsinsel organisiert (Domínguez-Bernal *et al.*, 2006; Dramsi *et al.*, 1997; Gaillard *et al.*, 1991; Raffelsbauer *et al.*, 1998). Die Expression vieler dieser Virulenzgene wird durch das zentrale Regulatorprotein PrfA gesteuert, dessen Gen *prfA* selbst Teil der LIPI-1 ist (Domínguez-Bernal *et al.*, 2006; Leimeister-Wächter *et al.*, 1990; Lingnau *et al.*, 1995; Mengaud *et al.*, 1991a).

Im Rahmen dieser Arbeit sollten die Internaline InlC, InlE, InlG und InlH von *L. monocytogenes* näher untersucht werden. Dazu wurden rekombinante His₆-markierte Internaline aufgereinigt und polyklonale Antiseren gegen die Internaline A, B, E, G und H hergestellt. Darüber hinaus gelang die Herstellung zweier monoklonaler Antikörper gegen InlG.

Obwohl die Antikörper gegen InlG und InlE ihre rekombinanten Antigene gut dekorieren, konnten mit ihnen keine Proteine in Zellwand- oder Überstandspräparaten von *L. monocytogenes* EGD und EGDe detektiert werden. Das Antiserum gegen InlH kreuzreagierte mit InlA und auch schwach mit anderen Internalinen. In Zellwandpräparaten von *L. monocytogenes* dekorierte es ein ~50 kDa schweres Protein, welches mit InlH identisch sein könnte. Es fehlt in *inlG/H/E* Deletionsmutanten und wird in einer *inlA/B* Deletionsmutante stärker exprimiert. Im Kulturüberstand ist es etwas schwerer, wie man es von einem Protein mit LPXTG Motiv erwartet, das nicht von Sortase (Bierne *et al.*, 2002; Garandeau *et al.*, 2002) prozessiert wurde. In *L. monocytogenes* EGDe wird dieses ~50 kDa Protein um ein bis zwei dekadische Größenordnungen stärker exprimiert als in *L. monocytogenes* EGD. Die Expression des Proteins war bei 30 und 37 °C gleich stark und wurde nicht durch PrfA reguliert.

In Zellwandpräparaten von *L. ivanovii* ATCC 19119 dekorierten die Seren gegen InlA und InlH ein Protein das in seiner Größe dem InlA von *L. monocytogenes* entspricht.

Mit Hexosaminidase Assays zur Untersuchung von Zelladhärenz (nach Landegren, 1984) an rekombinante His₆-markierte Internaline konnte keine Interaktion der Internaline InlE, InlG oder InlH mit Oberflächenfaktoren von Caco-2, HeLa oder HepG2 Zellen nachgewiesen werden, während Positivkontrollen mit InlA und InlB weitestgehend erwartungsgemäß ausfielen. InlC besitzt jedoch offenbar einen bisher noch nicht genauer identifizierten Rezeptor auf der Zelloberfläche. An InlC und EGF adhärerten Caco-2 Zellen stark wachstumsphasenabhängig und etwa tausendfach schwächer als an InlA. Die beste Bindung erfolgte bei semikonfluent gewachsenen Zellen, die am Vortag ausgesät wurden. Unter diesen

Bedingungen war auch die von Bergmann *et al.* beobachtete unterstützende Wirkung von InlC auf die InlA-abhängige Invasion am größten (Bergmann *et al.*, 2002).

In dieser Arbeit wurden außerdem die Promotoren von Internalingenen aus *L. ivanovii*, sowie weitere Virulenzgene (*plcA*, *hly*, *actA*) der Spezies *L. monocytogenes*, *L. ivanovii* und *L. seeligeri* mit Hilfe eines zellfreien *in vitro* Transkriptionssystems (Lalic-Mülthaler *et al.*, 2001) untersucht, um deren PrfA-Abhängigkeit und Aktivität unabhängig von physiologischen Faktoren analysieren zu können, da die PrfA-Aktivität *in vivo* pleiotrop reguliert wird (Dickneite *et al.*, 1998; Ermolaeva *et al.*, 2004; Milenbachs *et al.*, 1997; Milenbachs Lukowiak *et al.*, 2004; Renzoni *et al.*, 1997; Ripio *et al.*, 1996). Dafür wurde in dieser Arbeit RNA-Polymerase aus *L. monocytogenes* $\Delta prfA \Delta sigB$ (Stritzker *et al.*, 2005) isoliert. Gleichzeitig wurde die Aktivität von rekombinanten His₆-markierten PrfA Proteinen untersucht. Dazu wurden die PrfA Proteine von *L. monocytogenes* (m-PrfA und hyperaktives m-PrfA* (Ripio *et al.*, 1997b)), *L. ivanovii* (i-PrfA) und *L. seeligeri* (s-PrfA), so wie ein Hybridprotein (sm-PrfA) aufgereinigt. Das Hybridprotein sm-PrfA entspricht s-PrfA bis auf die letzten 38 Aminosäurereste, die durch jene von m-PrfA ersetzt wurden.

Alle in dieser Arbeit untersuchten Promotoren mit putativen PrfA-Boxen zeigten PrfA-abhängige Transkription. Darunter auch Promotoren, deren PrfA-Boxen drei Abweichungen zur Konsensussequenz TTAACANNTGTTAA aufweisen (*Pi-inlA* und *Pi-inlK*). Für die Aktivität und die Transkriptionsprodukte von PrfA-abhängigen Promotoren haben sich dabei nicht nur die PrfA-Box sondern auch deren flankierenden Regionen als potentiell wichtig herausgestellt. So ist der *Pi-inlK* sehr ähnliche Promotor *Pi-inlB1* *in vitro* nicht PrfA-abhängig (Stefanie Müller-Altrock, persönliche Mitteilung), unterscheidet sich von diesem aber vor allem stromaufwärts der PrfA-Box, einem Bereich in dem PrfA ebenfalls bindet (Dickneite *et al.*, 1998; Vega *et al.*, 1998). Auch bei den Promotoren für *plcA* und *hly* von *L. monocytogenes*, *L. ivanovii* und *L. seeligeri* ergaben sich *in vitro* trotz der hohen Sequenzähnlichkeiten (92,8%) Unterschiede in der Transkription, die aufgrund identischer PrfA- und nahezu identischer -10-Boxen am besten mit den abweichenden flankierenden Regionen erklärt werden können.

Die Transkriptionsaktivität des *plcA/hly* Promotors nimmt bei kürzeren DNA-Templates, die auf die scheinbar wesentlichen Sequenzen reduziert sind, ab, wobei für *Phly* die stromaufwärts gelegene Region vor der PrfA-Box wichtiger ist als für *PplcA*.

Der Promotor *Pi-inlE* hat eine perfekte PrfA-Box, besitzt jedoch ein hohes Basistranskriptionslevel, das vermutlich von einem PrfA-unabhängigem Promotor verursacht wird, der mit dem PrfA-abhängigem überlappt und den gleichen Transkriptionsstart besitzt.

In silico wurde im Genom von *L. ivanovii* ein Gen gefunden (Robert Lampidis, persönliche Mitteilung), das dem *inlA* von *L. monocytogenes* ähnelt (77% Ähnlichkeit in den Aminosäuresequenzen, 80% Identität im Promotorbereich). Wie in Primer Extension Studien nachgewiesen werden konnte, besitzt dieses hier *i-inlA* genannte Gen wie *inlA* funktionierende SigB- und PrfA-abhängige Promotoren. Wahrscheinlich ist i-InlA das Pendant für InlA in *L. ivanovii*, welches in Zellwandpräparaten von den Antiseren gegen InlA und InlH dekoriert wird.

Die Proteine m-PrfA, m-PrfA*, i-PrfA, s-PrfA und sm-PrfA sind alle in der Lage die Transkription bei den untersuchten PrfA-abhängigen Promotoren zu aktivieren. Dabei sind m-PrfA und i-PrfA etwa gleich aktiv, während s-PrfA mindestens zwanzigfach weniger aktiv ist als m-PrfA oder i-PrfA. Das hyperaktive m-PrfA* ist höchstens doppelt so aktiv wie m-PrfA oder i-PrfA. Das Hybridprotein sm-PrfA ist zwar dreimal so aktiv wie s-PrfA, doch wird damit die Aktivität von m-PrfA nicht erreicht, weshalb Gründe für die geringe Aktivität auch im N-terminalen Teil von s-PrfA zu suchen sind.

Diese Daten werden durch EMSA Versuche von Regina Ecke unterstützt, bei denen der geschlossene Transkriptionskomplex von DNA, PrfA und RNA-Polymerase in Abhängigkeit von der PrfA-Konzentration gemessen wurde. Diese EMSA Versuche zeigten auch, dass i-

PrfA weit besser an DNA bindet als m-PrfA, weshalb zu vermuten ist, dass neben der DNA-Bindung auch die Interaktion mit der RNA-Polymerase eine wichtige Rolle bei der Gesamtaktivität hat.

Bei keinem der untersuchten Promotoren konnten speziesspezifische Anpassungen von PrfA Proteinen an arteigene Promotoren festgestellt werden. Die PrfA Proteine sind für jeden Promotor beliebig austauschbar, wobei ihre spezifischen Aktivitätsunterschiede unabhängig davon sind, aus welcher Spezies der Promotor stammt.

Die Untersuchungen in dieser Arbeit konnten zeigen, dass die Promotoren der Virulenzgene *plcA*, *hly* und *actA* aus der LIPI-1 von *L. seeligeri* voll funktionsfähig sind. Es ist also anzunehmen, dass ein wichtiger Punkt für die Apathogenität von *L. seeligeri* auch die geringe (spezifische) Aktivität von s-PrfA ist.

A.2 Abstract

The genus *Listeria* comprises six known species of ubiquitous Gram-positive, non-sporulating, rod-shaped bacteria. Of these species *Listeria monocytogenes* and *L. ivanovii* are able to cause the clinical picture of listeriosis in humans and animals (Rocourt & Seeliger, 1985; Vázquez-Boland *et al.*, 2001b; Weis & Seeliger, 1975) with *L. ivanovii* predominantly occurring in animals (Cummins *et al.*, 1994; Hof & Hefner, 1988). *L. monocytogenes* is considered as important model of an intracellular pathogen that can also invade non-professional phagocytes with the aid of internalins (Gaillard *et al.*, 1991; Lingnau *et al.*, 1995) and can multiply and spread due to a set of virulence factors (Tilney & Portnoy, 1989). The two pathogenic species and the apathogenic *L. seeligeri* possess a pathogenicity island termed LIPI-1 (Gouin *et al.*, 1994; Kreft *et al.*, 2002). In *L. monocytogenes* internalin genes are partially clustered and mainly form a pathogenicity island termed LIPI-2 in *L. ivanovii* (Domínguez-Bernal *et al.*, 2006; Dramsi *et al.*, 1997; Gaillard *et al.*, 1991; Raffelsbauer *et al.*, 1998). The expression of many virulence genes is controlled by the central regulatory protein PrfA which gene *prfA* is part of LIPI-1 (Domínguez-Bernal *et al.*, 2006; Leimeister-Wächter *et al.*, 1990; Lingnau *et al.*, 1995; Mengaud *et al.*, 1991a).

In the context of this work the internalins InlC, InlE, InlG and InlH of *L. monocytogenes* should be further investigated. Therefore recombinant His₆-tagged internalins were purified and polyclonal antisera against the internalins A, B, E, G and H were raised. In addition the creation of two monoclonal antibodies against InlG succeeded.

While the antibodies against InlG and InlE decorated well their recombinant antigens, they could not detect proteins in cell wall preparations or culture supernatant of *L. monocytogenes* EGD and EGDe. The antiserum against InlH cross-reacted with InlA and weakly also with other internalins. In cell wall preparations of *L. monocytogenes* it decorated a ~50 kDa protein which could be identical with InlH. This protein is missing in *inlG/H/E* deletion mutants and is stronger expressed in *inlA/B* deletion mutants. It is slightly bigger in the supernatant as expected for a protein with LPXTG motif that was not processed by sortase (Bierne *et al.*, 2002; Garandeau *et al.*, 2002). In *L. monocytogenes* EGDe the ~50 kDa protein was expressed stronger than in *L. monocytogenes* EGD by two orders of magnitude. The expression of this protein was equal at 30 and 37 °C and was not regulated by PrfA.

In cell wall preparations of *L. ivanovii* ATCC 19119 the antisera against InlA and InlH decorated a protein matching the size of InlA of *L. monocytogenes*.

Hexosaminidase assays for analysis of cell adherence (after Landegren, 1984) with recombinant His₆-tagged internalins showed no interaction of the internalins InlE, InlG or InlH with surface factors of Caco-2, HeLa or HepG2 cells while positive controls with InlA and InlB mainly resulted as expected. However InlC has a not yet identified receptor on the eukaryotic cell surface. Caco-2 cells adhered to InlC and EGF in a strongly growth phase dependent manner and roughly thousand fold weaker than to InlA. Best binding was

observed with semi confluent grown cells which were prepared one day before the assay. Under these conditions the supportive effect of InlC in InlA-dependent invasion reported by Bergmann *et al.* was also maximal (Bergmann *et al.*, 2002).

Furthermore in this work the promoters of internalin genes from *L. ivanovii* and other virulence genes (*plcA*, *hly*, *actA*) from the species *L. monocytogenes*, *L. ivanovii* and *L. seeligeri* were investigated with the aid of the cell free *in vitro* transcription assay (Lalic-Mülthaler *et al.*, 2001) to analyze their PrfA-dependency and activity independent of metabolic factors because PrfA activity is pleiotropically regulated *in vivo* (Dickneite *et al.*, 1998; Ermolaeva *et al.*, 2004; Milenbachs *et al.*, 1997; Milenbachs Lukowiak *et al.*, 2004; Renzoni *et al.*, 1997; Ripio *et al.*, 1996). Therefore RNA polymerase from *L. monocytogenes* $\Delta prfA \Delta sigB$ (Stritzker *et al.*, 2005) was isolated in this work. Simultaneously the activity of recombinant His₆-tagged PrfA proteins was investigated. For this purpose PrfA proteins of *L. monocytogenes* (m-PrfA and hyperactive m-PrfA* (Ripio *et al.*, 1997b)), *L. ivanovii* (i-PrfA), *L. seeligeri* (s-PrfA) and the hybrid protein (sm-PrfA) were purified. The hybrid protein sm-PrfA corresponds to s-PrfA except for the last 38 amino acid residues which were substituted by those of m-PrfA.

All promoters with putative PrfA boxes investigated showed PrfA-dependent transcription. Among them promoters (*Pi-inlA* und *Pi-inlK*) which have PrfA boxes with three mismatches compared to the consensus sequence TTAACANNTGTTAA. It turned out that for activity and transcription products of PrfA-dependent promoters the flanking regions of the PrfA box may be also important. Unlike *Pi-inlK* the very similar promoter *Pi-inlB1* is not PrfA-dependent *in vitro* (Stefanie Müller-Altrock, personal communication) and differs mainly upstream of the PrfA box, a region where PrfA is also binding (Dickneite *et al.*, 1998; Vega *et al.*, 1998). In spite of high sequence homologies (92.8%) the promoters of *plcA* and *hly* of *L. monocytogenes*, *L. ivanovii* and *L. seeligeri* showed transcriptional differences which can be best explained by their varying adjacent gene regions because they possess identical PrfA boxes and nearly identical -10 boxes.

The transcriptional activity of the *plcA/hly* promoter decreases with shorter DNA templates which are reduced to the essential sequences while the region upstream of the PrfA box appear to be more important for *Phly* than for *PplcA*.

The promoter *Pi-inlE* has a perfect PrfA box and a high basic level of transcription which is perhaps due to a PrfA-independent promoter that overlaps the PrfA-dependent one sharing the same transcriptional start point.

In silico a gene was found in the *L. ivanovii* genome (Robert Lampidis, personal communication) that resembles *inlA* of *L. monocytogenes* (77% similarity of amino acid sequence, 80% identity of promoter region). As shown by primer extension analysis this gene termed *i-inlA* has functioning SigB- and PrfA-dependent promoters like *inlA*. So *i-InlA* is probably the *L. ivanovii* counterpart of *InlA* and is also decorated in cell wall preparations by antisera against *InlA* and *InlH*.

The proteins m-PrfA, m-PrfA*, i-PrfA, s-PrfA and sm-PrfA are all able to activate transcription of the tested PrfA-dependent promoters. While m-PrfA and i-PrfA are quite equal in activity s-PrfA is at least twenty-fold less active. The hyperactive m-PrfA* is at most double as active as m-PrfA or i-PrfA. The hybrid protein sm-PrfA is indeed three times as active as s-PrfA but does not reach the activity level of m-PrfA, so the low activity is perhaps due to the N-terminal part of s-PrfA.

These data are supported by EMSA studies of Regina Ecke that show the closed transcription complex of DNA, PrfA and RNA polymerase dependent on PrfA concentration. These EMSA studies also show that i-PrfA binds to DNA much better than m-PrfA does why one can think that besides the DNA binding the interaction with RNA polymerase plays also an important role.

With none of the analyzed promoters a species specific adaption of PrfA proteins to their native promoters could be observed. The PrfA proteins are arbitrarily exchangeable and their specific differences in activity are independent of the species the promoters derived from. This study shows that the promoters of the virulence genes *plcA*, *hly* and *actA* from the LIPI-1 of *L. seeligeri* are fully functional. One could assume that the weak specific activity of s-PrfA is also an important factor for the apathogenicity of *L. seeligeri*.

B Einleitung

B.1 Die Gattung *Listeria*

Listerien sind eine Gruppe Gram-positiver, stäbchenförmiger, nicht sporulierender Bakterien, die in der Lage sind fakultativ anaerob zu wachsen. Sie sind verwandt mit Bakterien wie *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterococcus*, *Streptococcus* und *Staphylococcus* (Abbildung 1) und besitzen DNA mit niedrigem GC-Gehalt (36-42%) (Collins *et al.*, 1991; Rocourt, 1996; Seeliger & Jones, 1986).

Bisher sind in der Gattung *Listeria* sechs Arten bekannt: *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, *L. innocua*, *L. welshimeri* und *L. grayi* (Seeliger & Jones, 1986). Die ersten beiden genannten Spezies sind dafür bekannt das Krankheitsbild der Listeriose verursachen zu können. Während *L. monocytogenes* sowohl als human- als auch tierpathogen eingestuft wird, befällt *L. ivanovii* hauptsächlich Schafe und Rinder (Cummins *et al.*, 1994). Die dritte Spezies, *L. seeligeri*, konnte nur in einem bekannten Fall aus dem Liquor eines menschlichen Meningitispatienten isoliert werden und wird allgemein als apathogen bezeichnet (Rocourt *et al.*, 1986). Die übrigen drei Spezies gelten als harmlose Umweltkeime.

Listerien lassen sich anhand ihrer O-Antigene (Lipoteichonsäuren) und H-Antigene (Flagellen) in verschiedene Serotypen einteilen, wobei die Serotypen *L. monocytogenes* 1/2a, 1/2b und 4b in den meisten Fällen von Listeriose nachgewiesen werden konnten (Farber & Peterkin, 1991). Ein wichtiges Indiz für potentielle Pathogenität bei Listerien ist ein β -hämolytischer Phänotyp, für den Listeriolysin O (LLO, kodiert vom Gen *hly*) verantwortlich ist. Nicht hämolytische Stämme sind im Mausmodell avirulent (Cossart *et al.*, 1989).

Listerien sind in der Natur weit verbreitet und konnten aus den verschiedensten Quellen, wie dem Wasser, dem Boden, von Pflanzenoberflächen, sowie aus den Fäkalien von Mensch und Tier, isoliert werden (Gray & Killinger, 1966; Watkins & Sleath, 1981; Weis & Seeliger, 1975). Sie können unter – für Eubakterien – extremen Umweltbedingungen überleben und evtl. sogar noch wachsen. Temperaturen von 1 °C bis 50 °C, pH-Werte von 4,5 bis 9,6 und Kochsalzkonzentrationen bis 7% (w/v) werden toleriert. Optimale Wachstumsbedingen für Listerien sind jedoch 30 bis 35 °C und ein neutraler bis leicht alkalischer pH (Collins *et al.*, 1991; Junttila *et al.*, 1988; Lou & Yousef, 1997). Bei 10 bis 25 °C sind Listerien peritrich begeißelt und motil (Peel *et al.*, 1988). Da Listerien Kühlschranktemperaturen tolerieren und viele Konservierungsmethoden überstehen, stellen sie für die Lebensmittelindustrie und natürlich die Verbraucher ein gefährliches Problem dar (Donnelly, 1990; Schuchat *et al.*, 1991).

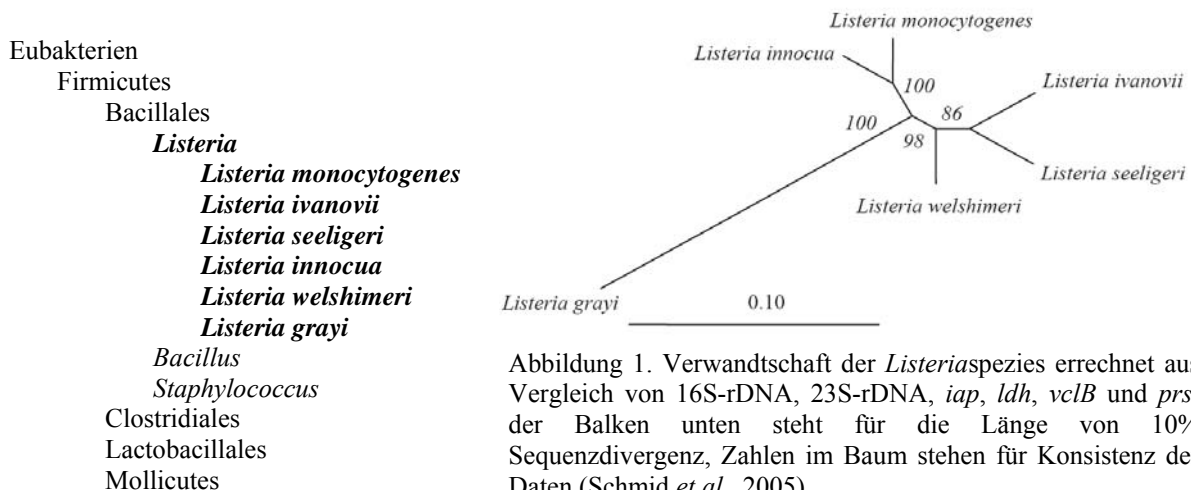


Abbildung 1. Verwandtschaft der *Listeria*spezies errechnet aus Vergleich von 16S-rDNA, 23S-rDNA, *iap*, *ldh*, *vclB* und *prs*; der Balken unten steht für die Länge von 10% Sequenzdivergenz, Zahlen im Baum stehen für Konsistenz der Daten (Schmid *et al.*, 2005).

B.2 *Listeria monocytogenes*

L. monocytogenes ist sehr gut untersucht. Neben der Tatsache, dass es sich um den für den Menschen gefährlichsten Verursacher der Listeriose handelt, ist *L. monocytogenes* vor allem für Immunologen bei der Untersuchung der zellvermittelten Immunantwort ein Paradigma. Eine der interessantesten Fähigkeiten von *L. monocytogenes* ist es in eukaryotische Wirtszellen eindringen, sich in deren Zytoplasma vermehren zu können und direkt benachbarte Zellen zu infizieren, womit sie dem Immunsystem des Wirtes ausweichen. *L. monocytogenes* gilt deshalb als wichtiges Modell für ein intrazelluläres Pathogen.

B.2.1 Pathogenese

Eine Listeriose beginnt gewöhnlich mit der Aufnahme kontaminierter Nahrung, wobei vor allem Rohmilchprodukte, Weichkäse, Fleischwaren, Meeresfrüchte und Gemüseprodukte (Kraut-, Reis-, Feldsalat) als besonders risikobehaftet gelten müssen (Schlech, 2000). Ob es bei einer Infektion mit *Listeria* jedoch zum Ausbruch einer Listeriose kommt, hängt von verschiedenen Faktoren ab, wie der Anzahl der aufgenommenen Keime, deren Virulenz, sowie der Immunkompetenz des Wirtes (Farber & Peterkin, 1991). Bei etwa jedem zehnten Individuum findet man *Listeria monocytogenes* in der Darmflora, ohne dass es zum Ausbruch einer Listeriose oder anderen gesundheitlichen Auffälligkeiten kommt (Gray & Killinger, 1966). Übersteigt die Keimzahl einen kritischen Wert (etwa 10^6 bis 10^9) so werden die ersten immunologischen Barrieren des Wirtes überwunden. Bei ansonsten immunkompetenten Menschen ähneln die Symptome dieser Infektion einem grippalen Infekt, während bei immungeschwächten Patienten Gastroenteritis, Septikämie, Meningitis, Enzephalitis und Meningoenzephalitis vorkommen können. Ein besonderes Risiko besteht in der Schwangerschaft, da der Erreger die Plazentaschranke überwinden, den Fötus infizieren und es infolgedessen zu einem Abort kommen kann (Benshushan *et al.*, 2002; Rouquette & Berche, 1996).

Der Infektionsverlauf wurde im Mausmodell eingehend untersucht. Die Listerien infizieren zunächst das Darmepithel und dringen dann durch die Enterozyten und so genannte M-Zellen in das dahinter liegende lymphoide Gewebe vor (Jensen *et al.*, 1998; Karunasagar *et al.*, 1994). Dort werden die Bakterien von professionellen Phagozyten wie Makrophagen und dendritischen Zellen phagozytiert. Über Blut oder Lymphe gelangen die Listerien in ihren motilen Wirtszellen schließlich in Leber und Milz. In der Leber wird ein Großteil der Listerien von Kupfferschen Zellen phagozytiert und getötet. Dieses Stadium der Infektion ist für den weiteren Verlauf entscheidend. Gelangen die Listerien ins Blut können sie sich auch auf andere Organe ausbreiten. Sind sie in der Lage die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden, so kommt es zu einer Entzündung der Gehirnhaut (Meningitis) und/oder des Gehirns (Enzephalitis, zusammen: Meningoenzephalitis oder auch Enzephalomeningitis). Bei Schwangeren können die Listerien zudem nach Überwindung der Plazentaschranke den Fötus infizieren (Abram *et al.*, 2003; Redline & Lu, 1988).

B.2.1.1 Adhäsion und Invasion

Listerien werden über Phagozytose in ihre Wirtszellen aufgenommen. Während dies bei professionellen Phagozyten wie etwa Makrophagen normal ist, kann *L. monocytogenes* auch bei nicht-professionellen Phagozyten seine Aufnahme durch Phagozytose induzieren.

Für die Adhäsion der Listerien an die Wirtszellen sind neben allgemeinen und relativ unspezifischen Wechselwirkungen vor allem spezifische Interaktionen zwischen listeriellen und eukaryotischen Oberflächenmolekülen verantwortlich. Hier sind auf listerieller Seite zuvorderst die Internaline A und B zu nennen (siehe B.2.3.1 und B.2.3.2), sowie ActA, das an Proteoglykane bindet (Alvarez-Domínguez *et al.*, 1997b; Suárez *et al.*, 2001). Die Internaline

A und B sind auch hauptverantwortlich für die Induktion der Phagozytose in nicht-professionelle Phagozyten, wie Epi- und Endothelzellen (Abbildung 2, Punkt 1). Mutanten bei denen das Hitzestressprotein ClpC nicht erzeugt wird, exprimieren weniger InlA, InlB und ActA und sind in ihrer Adhäsions- sowie Invasionsfähigkeit eingeschränkt (Nair *et al.*, 2000).

B.2.1.2 Verlassen des Phagosoms

Etwa eine halbe Stunde nachdem die Listerien phagozytiert wurden, zerstören sie die sie umgebende phagosomale Membran mit Hilfe von Hämolyysin, im Falle von *L. monocytogenes* Listeriolysin O (LLO, kodiert von *hly*), und der phosphoinositol-spezifischen Phospholipase C PlcA (kodiert von *plcA*) und gelangen auf diese Weise ins Zytosol der Wirtszelle (Abbildung 2, Punkt 2). Listerien verzögern zudem auf noch nicht geklärte Weise die Reifung des Phagosoms zum Phagolysosom, so dass ihnen mehr Zeit bleibt, das Phagosom zu lysieren und zu verlassen (Alvarez-Domínguez *et al.*, 1997a). Gelingt dies nicht, so werden die Listerien im Phagolysosom abgetötet.



Abbildung 2. Darstellung des Infektionsverlaufs von *L. monocytogenes* (nach J. Kreft, 1997). Listerien (rote Stäbchen) induzieren Phagozytose in Epithelzellen (1), lysieren das Phagosom und vermehren sich im Zytoplasma (2), bewegen sich mittels Aktinpolymerisation (3) und werden schließlich von professionellen Phagozyten aufgenommen (4).

B.2.1.3 Intrazelluläre Vermehrung und Bewegung

Im Zytosol vermehren sich Listerien mit einer Generationszeit von etwa einer Stunde (Gaillard *et al.*, 1987; Portnoy *et al.*, 1988; Slaghuis *et al.*, 2004), wobei sie als wichtigste Kohlenstoff- und Energiequelle vermutlich Hexosephosphate verwenden. Die Aufnahme dieser Zucker erfolgt mit Hilfe des Hexosephosphat-Transporters Hpt (kodiert von *hpt*), einem Homolog der mikrosomalen Glukose-6-phosphat-Translokase (Chico-Calero *et al.*, 2002).

Zirka zwei Stunden nach der Invasion polymerisieren die Listerien an einem Pol wirtszelleigenes Aktin mit Hilfe von ActA (kodiert von *actA*). Dadurch entstehen kometenschweifähnliche Aktinpolymere, auf deren Basis sich die Listerien mit einer Geschwindigkeit von etwa 0,3 $\mu\text{m/s}$ durch das Zytosol bewegen (Dabiri *et al.*, 1990; Sokolovic *et al.*, 1996). Gelangen sie an die Zellmembran, stülpt sich diese pseudopodienartig aus. Das Pseudopodium wird von der benachbarten Zelle phagozytiert. Aus der Doppelmembran (Membran der alten Wirtszelle plus phagosomale Membran der neuen Wirtszelle) entkommen die Listerien wiederum durch Lyse mit Hilfe von LLO und der phosphatidylcholin-spezifische Phospholipase C (PC-PLC) PlcB (kodiert von *plcB*) (Marquis *et al.*, 1997; Smith *et al.*, 1995). PlcB und PlcA können sich gegenseitig zum Teil substituieren, denn nur ein Fehlen beider PLC führt zu einer starken Einschränkung der intrazellulären Vermehrung (Drevets, 1998; Smith *et al.*, 1995).

Diese Ausbreitung von Zelle zu Zelle, durch welche die Listerien der humoralen und der zellulären Immunabwehr ausweichen, wird auch als "Spreading" bezeichnet (Tilney & Portnoy, 1989).

B.2.2 Der zentrale Regulator PrfA

Differentielle Genregulation in Antwort auf eine sich verändernde Umwelt, ist für einen Organismus wichtig, um seine Ressourcen effektiv einsetzen zu können. Für die Pathogenese von *L. monocytogenes* ist der **positive Regulationsfaktor A** (PrfA) als zentraler Regulator der Virulenzgene von entscheidender Bedeutung. Vor der kürzlichen Entdeckung des Regulationsfaktors VirR war PrfA der einzige bekannte zentrale Regulationsfaktor von Virulenzgenen und ist molekular gut charakterisiert (Kreft & Vázquez-Boland, 2001; Leimeister-Wächter *et al.*, 1990; Mandin *et al.*, 2005).

B.2.2.1 PrfA ist ein Protein der Crp/Fnr-Familie

PrfA zeigt sowohl in Struktur als auch Funktion große Ähnlichkeiten mit Proteinen der so genannten Crp/Fnr-Familie (Lampidis *et al.*, 1994). Diese Proteinfamilie von DNA bindenden Transkriptionsregulatoren hat ihren Namen vom **cAMP-Rezeptor-Protein** (Crp) (auch **catabolite gene activator protein** (CAP) genannt) aus *Escherichia coli*, und der **Fumarat-Nitrat-Reduktase** (Fnr). Crp ist der zentrale Regulator der Katabolitrepression, während Fnr für die Anpassung an anaerobe Umweltbedingungen verantwortlich ist (Spiro & Guest, 1990). Bei den meisten Vertretern dieser Proteinfamilie, die vorwiegend in Gram-negativen Bakterien zu finden sind, handelt es sich um positiv regulierende Faktoren. Sie zeichnen sich durch eine N-terminal lokalisierte Nukleotid-Bindungsdomäne und ein C-terminal befindliches HTH-Motiv (helix-turn-helix motif) aus, das für die Bindung an die Ziel-DNA verantwortlich ist. Mit Hilfe der Crp-Fnr Regulatoren können Bakterien auf eine große Auswahl von inneren Signalen und Umweltreizen reagieren, wie z.B. cAMP, Sauerstoffmangel, Redoxpotential, oxidativen und nitrosativen Stress, Stickoxide, Kohlenmonoxid, 2-Oxoglutarat oder die Temperatur (Körner *et al.*, 2003).

B.2.2.1.1 Crp

Struktur und Funktion von Crp sind sehr gut untersucht und Erkenntnisse darüber auch für die Betrachtung von PrfA hilfreich. Crp ist ein 47 kDa schweres Homodimer aus jeweils 209 Aminosäureresten (Aiba *et al.*, 1982). Konformation und Aktivität von Crp sind von der intrazellulären cAMP-Konzentration abhängig (Heyduk & Lee, 1989; Takahashi *et al.*, 1989), bei deren Anstieg das Crp-Dimer zwei Moleküle cAMP bindet, und eine allosterische Konformationsänderung durchläuft. Der Crp:cAMP-Komplex besitzt im Gegensatz zum cAMP-freien Apo-Crp eine hohe Spezifität für seine DNA-Zielsequenz, ein 22 bp langes Palindrom mit der Konsensussequenz AAATGTGA-N₆-TCACATTT (Berg & von Hippel, 1988; Harman, 2001). Die N-terminale Domäne, bestehend aus den Aminosäureresten 1 bis 133 (Abbildung 3, blaue und grüne Strukturen), ist sowohl für die Bindung von cAMP als auch die Dimerisierung verantwortlich. Die C-terminale Domäne mit den Aminosäureresten 139 bis 209 enthält das HTH-Motiv (Abbildung 3, rosa und rote Strukturen), welches an die DNA binden kann. Beide Domänen sind über eine als Gelenk fungierende Region (AS 134 bis 138) verbunden (Harman, 2001; Weber & Steitz, 1987). Die Bindung von cAMP an Apo-Crp führt im N-terminalen Teil des Proteins zu einer

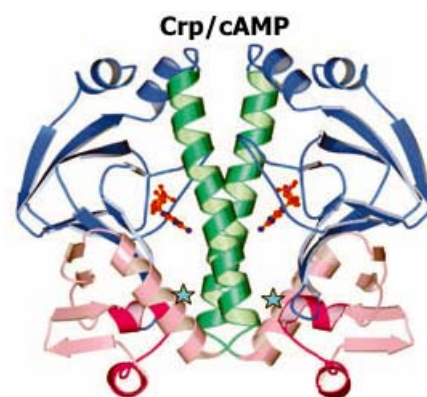


Abbildung 3. Struktur von Crp und Position von cAMP (PDB-ID: 1G6N; cAMP-Molekül als Ball&Stick Modell). Der blaue Stern zeigt die Position der A144T Mutation an. Beschreibung siehe Text (modifiziert nach Eiting *et al.*, 2005).

Konformationsänderung, die in den C-terminalen Teil weitergeleitet wird, und dort die DNA-Spezifität durch Verschiebung der α -Helix F (Abbildung 3, E- und F-Helix in rot) verändert. Abhängig von der cAMP-Konzentration entsteht so aus dem inaktiven Apo-Crp, das DNA nur unspezifisch bindet (Katouzian-Safadi *et al.*, 1993), bei mittlerer Konzentration das aktive und spezifisch DNA bindende Crp:cAMP₁ oder bei höherer Konzentration das weniger aktive Crp:cAMP₂ (Garges & Adhya, 1985; Weber & Steitz, 1987; Wu *et al.*, 1974). Crp:cAMP₁ bindet *in vitro* außerdem an RNA-Polymerase und zwar sowohl mit als auch ohne DNA (Harman, 2001). Für die Bindung an die Polymerase sind die so genannten Aktivierungsregionen AR1 (AS 156 bis 164), AR2 (AS 19, 21, 96 und 101) und AR3 (AS 52-58) verantwortlich (Niu *et al.*, 1994; Niu *et al.*, 1996; Rhodius & Busby, 2000a, 2000b; Zhou *et al.*, 1993). Crp kann unter bestimmten Umständen auch als negativer Regulator fungieren, indem es die Bindung der RNA-Polymerase blockiert. Bei CytR-regulierten Genen wirkt Crp:cAMP zusammen mit CytR als Corepressor (Kolb *et al.*, 1993).

Crp-abhängige Promotoren können in drei Klassen eingeteilt werden (reviewed von Busby & Ebright, 1994, , 1997; reviewed von Ebright, 1993). Bei Promotoren der Klasse I liegt die Bindungsstelle für Crp stromaufwärts der RNA-Polymerase-Bindungsstelle. Hierbei interagiert die α -Untereinheit der Polymerase mit der Aktivierungsregion AR1 von Crp (siehe Abbildung 4). Ein Beispiel für einen solchen Klasse I Promotor ist P1 des *lac*-Gens in *E. coli*, bei dem die Bindungsstelle für Crp relativ zum Transkriptionsstartpunkt an Position -61,5 liegt. Bei Klasse II Promotoren (wie z.B. P1 von *gal*) überlappt die Bindestelle für Crp mit der -35 Region, wodurch Crp in engen Kontakt mit der RNA-Polymerase kommt. In einem ersten Schritt, der so genannten Anti-Inhibition, hebt die stromaufwärts gelegene Crp-Untereinheit den inhibitorischen Effekt der α -Untereinheit auf, indem AR1 mit deren C-terminaler Domäne interagiert. Im zweiten Schritt bindet die AR2 der stromabwärts gelegenen Crp-Untereinheit mit der N-terminalen Domäne der α -Untereinheit und es kommt zur Isomerisierung vom geschlossenen (CC) in den offenen Transkriptionskomplex (OC). Klasse III Promotoren (z.B. der von *malk*) benötigen neben Crp zusätzliche Aktivatoren und die Bindungsstelle von Crp ist recht variabel.

B.2.2.1.2 PrfA

PrfA ist ein 27 kDa schweres Protein aus 237 Aminosäureresten. Es besitzt, wie auch Crp, ein für DNA-Bindung verantwortliches HTH-Motiv in der C-terminalen Domäne (Lampidis *et al.*, 1994). Ebenso erkennt PrfA als Homodimer eine palindromische Sequenz, die so genannte PrfA-Box. Diese 14 bp lange Sequenz mit dem Konsensus TTAACA NN TGTTAA (N ist normalerweise A oder T) liegt etwa bei Position -41,5 und überschneidet sich mit der -35 Region. Für die Bindung des PrfAs

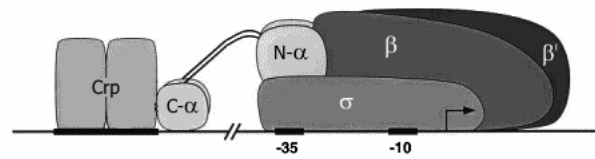


Abbildung 4. Transkriptionsaktivierung eines Crp-abhängigen Promotors der Klasse I. β , β' und α bezeichnen die Untereinheiten der RNA-Polymerase, wobei N- α und C- α für die N- und C-terminalen Domänen der α -Untereinheit stehen. σ steht für den σ -Faktor. (modifiziert nach Busby & Ebright, 1999)

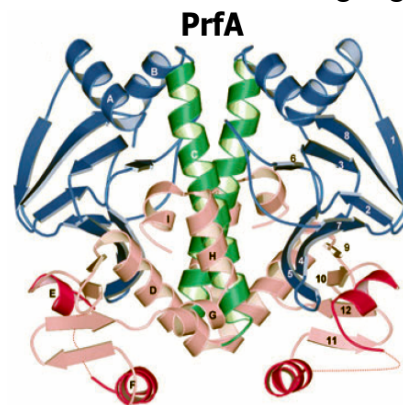


Abbildung 5. Struktur des wildtypischen PrfA Dimers (PDB-ID: 2BEO). Die N-terminale Domäne ist blau, Dimerisierungshelices grün, C-terminale Domäne rosa gefärbt. Das C-terminale HTH-Motiv ist rot gefärbt (aus Eiting *et al.*, 2005).

an diese Sequenz sind anscheinend keine zusätzlichen Faktoren nötig (Dickneite *et al.*, 1998; Mengaud *et al.*, 1989). Im N-terminalen Bereich besitzt PrfA wie Crp β -Faltblattstrukturen, doch ist dort keine Region für cAMP-Bindung konserviert (Vega *et al.*, 1998), da cAMP in Gram-positiven Bakterien nicht vorkommt (Hueck & Hillen, 1995). Mindestens eine Aktivierungsregion (AR1) von Crp, die für die Bindung der RNA-Polymerase zuständig ist, findet sich auch in PrfA wieder (Vázquez-Boland *et al.*, 2001b).

Im Unterschied zu Crp besitzt PrfA ein zusätzliches HTH-Motiv in der N-terminalen Domäne und eine 25 AS lange zusätzliche Region am C-Terminus, deren Fehlen PrfA inaktiviert (Herler *et al.*, 2001).

B.2.2.1.3 PrfA Mutanten

Verschiedene Mutationen des PrfA Proteins wurden untersucht, um dessen genaue Funktionsweise besser zu verstehen. Eine Substitution des Serinrestes 184 durch ein Alanin (S184A) verringert die Fähigkeit zur DNA-Bindung und führt damit zu einem Rückgang der Virulenzgenaktivierung. Eine Substitution des benachbarten Serinrestes S183A bewirkt jedoch das Gegenteil (Sheehan *et al.*, 1996). Die Mutation M58I führt zu einer Schwächung der DNA-Bindung, deren Spezifität bleibt jedoch erhalten. R188I und A218PLN* (das Stopcodon führt zum Verlust der C-terminalen 17 AS) zeigen keine DNA-Bindung mehr (Herler *et al.*, 2001). Analog der Mutation A144T in der D-Helix von Crp (siehe Abbildung 3), bei der Crp unabhängig von cAMP aktiv bleibt, versetzt die G145S Mutation PrfA in eine konstitutiv aktive Form und führt zu einer Überexpression der Virulenzgene (Eiting *et al.*, 2005; Garges & Adhya, 1985; Ripio *et al.*, 1997b).

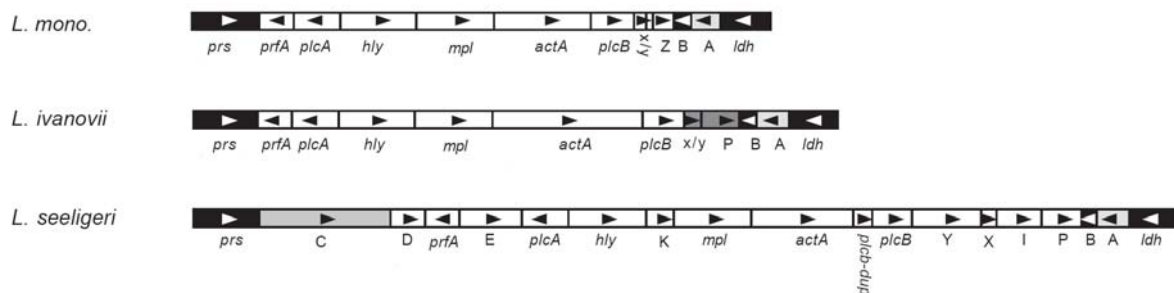


Abbildung 6. Vergleich der listeriellen Pathogenitätsinseln LIPI-1 in den drei (potentiell) pathogenen Listerienspezies *L. monocytogenes*, *L. ivanovii* und *L. seeligeri*. Weiße Boxen bezeichnen PrfA-abhängig transkribierte Gene (Schmid *et al.*, 2005).

B.2.2.2 Virulenzgenorganisation und PrfA-abhängige Promotoren

B.2.2.2.1 Organisation der Virulenzgene

Für eine effiziente Besiedlung des Wirtes im Verlaufe einer Infektion ist eine geordnete Regulation der Virulenzgene von entscheidender Bedeutung. Ein großer Teil der Virulenzgene in (pathogenen) Listerien ist in Clustern angeordnet und wird durch PrfA reguliert, welches selbst in einem solchen Cluster kodiert wird (Chakraborty *et al.*, 1992; Portnoy *et al.*, 1992). Das Virulenzgencluster ist zwischen den beiden Genen *prs* und *ldh* (kodieren für Phosphoribosyl-Pyrophosphat-Synthetase bzw. Laktatdehydrogenase) in den drei *Listeria*spezies *L. monocytogenes*, *L. ivanovii* und dem apathogenen *L. seeligeri* zu finden, und wird als *Listeria* Pathogenitätsinsel (LIPI-1) bezeichnet (siehe Abbildung 6). In *L. monocytogenes* hat LIPI-1 eine Größe von 9,6 kb (Kreft *et al.*, 2002; Schmid *et al.*, 2005; Vázquez-Boland *et al.*, 2001a). LIPI-1 von *L. ivanovii* ist vor allem wegen des längeren *i-actA* Gens etwas größer und besitzt etwa 75% Identität zu LIPI-1 von *L. monocytogenes* (Gouin *et al.*, 1994; Vázquez-Boland *et al.*, 2001a). LIPI-1 von *L. seeligeri* weist einige Besonderheiten

auf. Die einzelnen Virulenzgene sind zwar intakt, werden jedoch aufgrund verschiedener Insertionen nicht ausreichend transkribiert (Gouin *et al.*, 1994). Hier ist vor allem der ORF E zu nennen, der in entgegengesetzter Leserichtung zwischen *plcA* und *prfA* liegt und damit die Synthese des bicistronischen *plcA/prfA*-Transkripts verhindert. Durch die Einführung eines plasmidkodierten *plcA/prfA*-Gens von *L. monocytogenes* in *L. seeligeri* können auch dort die Virulenzgene exprimiert werden (Karunasagar *et al.*, 1997).

Die Virulenzgene werden folgendermaßen transkribiert: *plcA* und *prfA* sind als Operon organisiert, wobei die Transkription von *plcA* entweder monocistronisch oder zusammen mit *prfA* bicistronisch erfolgt (siehe auch B.2.2.3). Das Gen *hly* wird monocistronisch von zwei PrfA-abhängigen und einem PrfA-unabhängigen Promotor transkribiert, wobei letzterer nur zu einer geringen Produktion an *hly*-Transkript führt (Domann *et al.*, 1993). Das Lecithinase-Operon wird von den Genen *mpl*, *actA* und *plcB*, sowie den offenen Leserastern ORF X/Y und ORF Z gebildet (Mengaud *et al.*, 1991b; Vázquez-Boland *et al.*, 1992). Im Wesentlichen gibt es drei Transkripte aus diesem Operon: eine polycistronische mRNA unter Kontrolle des *mpl*-Promotors, ein monocistronisches *mpl*-Transkript, sowie eine bicistronische mRNA von *actA* und *plcB* (Bohne *et al.*, 1994; Freitag & Portnoy, 1994; Mengaud *et al.*, 1991a).

Andere Virulenzgene bei *L. monocytogenes* befinden sich außerhalb von LIPI-1. Die Gene für die großen Internaline A und B sind in einem Operon organisiert. Die Transkription erfolgt bicistronisch oder in Form monocistronischer *inlA*-mRNA über mehrere Promotoren, die nur zum Teil PrfA-abhängig sind. (Dramsi *et al.*, 1993; Lingnau *et al.*, 1995). Die Expression von InlA wird zudem noch posttranskriptionell reguliert (Stritzker *et al.*, 2005). Das Gen für das kleine Internalin *inlC* wird monocistronisch vorwiegend PrfA-abhängig aber auch PrfA-unabhängig transkribiert (Domann *et al.*, 1997; Engelbrecht *et al.*, 1996; Luo *et al.*, 2004).

In *L. ivanovii* finden sich eine Reihe von meist PrfA-abhängig transkribierten Internalingenen, die häufig gruppiert (z.B. *i-inlC/D*, LIPI-2) im Genom vorliegen (Domínguez-Bernal *et al.*, 2006; Engelbrecht *et al.*, 1998a; Engelbrecht *et al.*, 1998b).

Das *iap*-Gen wird im Gegensatz zu den übrigen Virulenzgenen nicht durch PrfA reguliert, sondern posttranskriptionell durch einen bisher unbekanntenen Mechanismus (Bubert *et al.*, 1992; Köhler *et al.*, 1991).

Gen (Promotor)	PrfA-Box (mismatches)	Spacer	-10-Box
<i>prfA</i> (P2)	aTAACA AT TGTTgt (3)	21 bp	TATTTT
<i>plcA</i>	TTAACA AA TGTTAA (0)	22 bp	TAAGAT
<i>hly1</i> (P1)	TTAACA TT TGTTAA (0)	23 bp	TAGAAT
<i>mpl</i>	TTAACA AA TGTAaAA (1)	22 bp	TATAAT
<i>actA</i>	TTAACA AA TGTTAg (1)	21 bp	GATAAT
<i>plcB</i>	-	-	-
<i>inlA</i> (P3)	aTAACA TA aGTTAA (2)	21 bp	TATTAT
<i>inlC</i>	TTAACg CT TGTTAA (1)	22 bp	TAACAT
<i>hpt</i>	aTAACA AG TGTTAA (1)	23 bp	TATATT

Tabelle 1. Promotorbereiche PrfA-regulierter Virulenzgene von *L. monocytogenes*. Abweichungen von der Konsensussequenz sind durch kleine Buchstaben in Fettschrift angezeigt (nach Kreft & Vázquez-Boland, 2001).

B.2.2.2.2 Struktur PrfA-abhängiger Promotoren

Alle bisher untersuchten PrfA-abhängigen Promotoren besitzen eine palindromische Sequenz, die etwa bei Position -41,5 liegt und analog zu den Crp-abhängigen Klasse II Promotoren mit der -35 Region überlappt (Domann *et al.*, 1991; Dramsi *et al.*, 1993; Engelbrecht *et al.*, 1996; Mengaud *et al.*, 1989; Vázquez-Boland *et al.*, 1992). Es hat sich gezeigt, dass der Abstand dieser PrfA-Box zur -10-Box, der im Idealfall 22 bp beträgt, für die Funktionalität des

Promotors von entscheidender Bedeutung ist (Luo *et al.*, 2004). Ebenfalls von Bedeutung ist die Anzahl der Abweichungen (mismatches) zur Konsensussequenz (siehe B.2.2.1.2), die maximal zwei beträgt (siehe Tabelle 1).

Die Promotoren von *hly* und *plcA* besitzen eine gemeinsame PrfA-Box die völlig der Konsensussequenz entspricht. Bei *mpl*, *actA*, *inlC* und *hpt* besitzen die PrfA-Boxen jeweils einen Basenaustausch, beim P3 von *inlA* sind es zwei. Noch stärker degeneriert ist die PrfA-Box von *prfA* selbst, sie weist drei Basenaustausche auf (Lampidis *et al.*, 1994). DNaseI-Footprintexperimente und EMSAs (electro mobility shift assays) haben gezeigt, dass PrfA spezifisch aber mit unterschiedlicher Affinität an die PrfA-Box eines PrfA-abhängigen Promotors bindet (Böckmann *et al.*, 1996; Böckmann *et al.*, 2000; Dickneite *et al.*, 1998; Freitag *et al.*, 1993; Sheehan *et al.*, 1996).

B.2.2.3 Regulation der PrfA-Aktivität

Die Gesamtaktivität von PrfA, und darüber mittelbar die Expression der PrfA-abhängigen (Virulenz)Gene, wird durch zweierlei bestimmt: zum einen von der PrfA-Konzentration, die wahrscheinlich zum größten Teil von der Expression des *prfA*-Gens abhängt, und zum anderen von der spezifischen Aktivität des PrfA-Proteins, die durch die etwaige Bindung von Cofaktoren (analog cAMP an Crp) moduliert wird.

Das *prfA*-Gen wird entweder monocistronisch von dessen Promotoren P1 oder P2 ausgehend transkribiert, oder bicistronisch ausgehend vom *plcA*-Promotor. P1 von *prfA* (hat keine PrfA-Box) und zu einem geringeren Teil auch P2 erzeugen PrfA-unabhängig ein basales Niveau an monocistronischer mRNA. Bei niedrigen Temperaturen (20 °C) werden jedoch trotzdem keine Virulenzgene exprimiert, da unter diesen Bedingungen kein PrfA gebildet wird (Leimeister-Wächter *et al.*, 1992; Renzoni *et al.*, 1997). Ein RNA Thermosensor kontrolliert posttranskriptionell die Bildung von PrfA durch eine inhibitorische Sekundärstruktur am 5'-Ende der mRNA, welche die Ribosomenbindungsstelle maskiert, und die erst bei Temperaturen über 30 °C schmilzt (Johansson *et al.*, 2002). Eine Erhöhung der Temperatur über 30 °C führt somit zur Bildung einer geringen Menge an PrfA, die ausreicht, um an hochkonservierte PrfA-Boxen zu binden. Es kommt daraufhin zu einer Aktivierung von *hly*, *mpl* und *plcA*, und damit zu einer weiteren Produktion von PrfA über das bicistronische *plcA/prfA*-Transkript (positive Autoregulation) (Leimeister-Wächter *et al.*, 1992; Mengaud *et al.*, 1991a). Parallel hierzu kann nach einem anderen Modell die Bindung eines PrfA aktivierenden Faktors (Paf) die spezifische Aktivität von PrfA in diesem Stadium erhöhen und somit eine Feinregulation der PrfA-Synthese erreichen (Böckmann *et al.*, 1996; Dickneite *et al.*, 1998; Vázquez-Boland *et al.*, 2001b; Vega *et al.*, 1998). Der Anstieg der PrfA-Konzentration führt letztendlich auch zur Aktivierung von PrfA-abhängigen Promotoren mit mehr Basenaustauschen in der PrfA-Box. Die positive Autoregulation wird vermutlich durch die Bindung des PrfA-Proteins an die degenerierte PrfA-Box von P2 des *prfA*-Gens unterbrochen. PrfA wirkt auf diesen Promoter eher reprimierend (Freitag *et al.*, 1993; Freitag & Portnoy, 1994). Eine hohe PrfA-Konzentration führt wahrscheinlich zur Bindung eines PrfA:RNAP-Komplexes an P2, der sterisch die Synthese von weiterem PrfA hemmt, bis dessen Konzentration wieder fällt.

Neben der Regulation der PrfA-Konzentration wird auch die spezifische Aktivität des PrfA-Proteins durch bestimmte Umweltbedingungen beeinflusst. Denkbar sind hier grundsätzlich Parameter wie Nährstoffangebot, pH-Wert, Eisenverfügbarkeit und Sauerstoffpartialdruck (Mekalanos, 1992).

Wenn *L. monocytogenes* im Vollmedium BHI bei 37 °C wächst, ist die Transkription von Virulenzgenen im Allgemeinen nur schwach. Sie kann jedoch durch Zugabe von Aktivkohle oder dem polymeren Harz XAD-4 ins Medium erhöht werden, wobei das Wachstum unbeeinflusst bleibt (Ripio *et al.*, 1996; Ripio *et al.*, 1997a; Ripio *et al.*, 1997b; Ripio *et al.*, 1998). Wird das BHI vor der Inokulation mit Aktivkohle behandelt, so wird die

Virulenzgenexpression nicht erhöht (Ermolaeva *et al.*, 1999), woraus man schließen könnte, dass ein durch das Wachstum der Listerien gebildeter Faktor für diesen Effekt verantwortlich ist. Die Virulenzgene werden auch stärker transkribiert, wenn in BHI wachsende Listerien in ein Zellkulturmedium (MEM) überführt werden ("MEM-shift"), das Wachstum der Bakterien ist dann jedoch reduziert (Bohne *et al.*, 1994; Sokolovic *et al.*, 1993).

Die Produktion von Listeriolysin ist ein wichtiger Marker für die Aktivität von PrfA. Es wurde beobachtet, dass eine Erniedrigung des pH-Wertes auf 5 bis 6 zu einer Verringerung der LLO-Produktion führt (Datta & Kothary, 1993). Hitze-, oxidativer, sowie osmotischer Stress bewirken jedoch das Gegenteil (Myers *et al.*, 1993; Sokolovic & Goebel, 1989; Sokolovic *et al.*, 1990). Auch ein Mangel an Eisen im Medium bewirkt eine verstärkte LLO-Synthese (Cowart & Foster, 1985; Geoffroy *et al.*, 1989), in Gegenwart von Eisen wird die Transkription von *prfA* und vielen PrfA-abhängigen Genen dagegen verringert (Böckmann *et al.*, 1996).

Die Transkription von *plcA* und *hly* wird durch das Vorhandensein von Cellobiose im Medium reprimiert (Böckmann *et al.*, 1996), wobei jedoch die Menge an PrfA konstant bleibt, was auf die Regulation der spezifischen Aktivität durch einen unbekanntem Faktor hindeutet (Renzoni *et al.*, 1997).

Interessant ist die Tatsache, dass auch das Gen *hpt*, welches für einen Hexose-Phosphat-Transporter kodiert, einen PrfA-abhängigen Promotor besitzt (Chico-Calero *et al.*, 2002). Da Glucose-1-Phosphat als Abbauprodukt von Glykogen in den Wirtszellen vorkommt und *L. monocytogenes* mit Glucose-1-Phosphat und anderen Hexose-Phosphaten als alleiniger Kohlenstoffquelle wachsen kann (Ripio *et al.*, 1997a), erscheint eine koordinierte Expression dieses Gens zusammen mit anderen Virulenzgenen sinnvoll.

B.2.3 Internaline

Internaline sind maßgeblich an der Invasion in nicht-professionelle Phagozyten, wie verschiedenen Epi- und Endothelzellen, beteiligt und werden in zwei Gruppen aufgeteilt: die so genannten großen Internaline, welche meist zellwandassoziiert vorkommen, und die kleinen Internaline, die stets sekretiert werden (siehe Tabelle 2).

Gen	AS	LRR	Anker
<i>inlA</i>	800	15	LPTTGD
<i>inlB</i>	630	7	GW-R
<i>inlC</i>	296	6	-
<i>inlC2</i>	548	8	LPTAGD
<i>inlD</i>	567	9	LPTAGD
<i>inlE</i>	499	8	LPITGD
<i>inlF</i>	821	13	LPKTGD
<i>inlG</i>	490	5	LPKTSD
<i>inlH</i>	548	4	LPTAGD
<i>inlI</i>	1778	28	LPATGD
<i>inlJ</i>	851	15	LPKTGD

Gen	AS	LRR	Anker
<i>i-inlA</i>	798	15	LPTTGD
<i>i-inlB1</i>	1107	14	GW-R
<i>i-inlB2</i>	897	19	GW-R
<i>i-inlC</i>	296	6	-
<i>i-inlD</i>	313	6	-
<i>i-inlE</i>	231	3	-
<i>i-inlF</i>	314	6	-
<i>i-inlG</i>	615	2x6	-
<i>i-inlH</i>	272	4	-
<i>i-inlI</i>	212	3	-
<i>i-inlJ</i>	446	6	-
<i>i-inlK</i>	312	6	-
<i>i-inlL</i>	261	4	-

Tabelle 2. Übersicht über Internaline in *L. monocytogenes* (links) und *L. ivanovii*. Angegeben werden der Name des Gens, die Anzahl der Aminosäurereste (AS) des unprozessierten Proteins, die Anzahl der leucinreichen Repeats (LRR) und die Art des Zellwandankers (Anker) bei großen Internalinen. Beim Zellwandanker handelt es sich entweder um ein typisches LPXTG-Motiv oder GW-Repeats.

Große Internaline besitzen am N-Terminus eine Signalsequenz, welche für den Proteinexport zuständig ist und bei diesem Prozess abgeschnitten wird. Ihr folgt eine Region A mit leucinreichen Repeats (leucine rich repeats, LRR), die für alle Internaline charakteristisch

und für Protein-Protein-Wechselwirkungen verantwortlich ist. Nach einer hochkonservierten Region schließt sich eine weitere Repeat-Region B an. Außer bei InlB und seinen Verwandten in *L. ivanovii* befindet sich bei allen großen Internalinen am C-Terminus ein LPXTG-Motiv, welches vom Enzym Sortase erkannt wird. Die Sortase katalysiert eine kovalente Verbindung des Internalins mit dem bakteriellen Peptidoglykan der Zellwand (Cossart & Jonquières, 2000; Dramsi *et al.*, 1993; Gaillard *et al.*, 1991).

In verschiedenen Stämmen von *L. monocytogenes* wurden bisher elf Internaline identifiziert, von denen nur eines (InlC) zu den kleinen Internalinen gezählt wird. Die ersten Internaline, die gefunden wurden, waren InlA und InlB, welche von einem Operon kodiert werden. Für beide Internaline wurde gezeigt, dass *L. monocytogenes* sie benötigt, um effizient in nicht-professionelle Phagozyten invadieren zu können (Dramsi *et al.*, 1995; Gaillard *et al.*, 1991; Gaillard *et al.*, 1996; Gregory *et al.*, 1996; Greiffenberg *et al.*, 2000; Lingnau *et al.*, 1995). Die übrigen Internaline sind wahrscheinlich von geringerer Bedeutung und wirken eher unterstützend für die InlA- oder InlB-abhängige Aufnahme (Bergmann *et al.*, 2002; Domann *et al.*, 1997; Dramsi *et al.*, 1997; Engelbrecht *et al.*, 1996; Raffelsbauer *et al.*, 1998). Von den erst kürzlich näher beschriebenen Internalinen InlI und InlJ in *L. monocytogenes*, ist InlJ einer neuen Unterklasse von Internalinen zuzuordnen, da seine LRRs eine andere Konsensussequenz aufweisen. Im Gegensatz zu InlI wurde für InlJ gezeigt, dass es sich um einen Virulenzfaktor handelt (Sabet *et al.*, 2005).

B.2.3.1 Internalin A

Internalin A (InlA) ist der Prototyp aller Internaline. Es wird kodiert vom Gen *inlA*, besitzt unprozessiert 800 Aminosäurereste, hat ein Molekulargewicht von 88 kDa und einen pI von 4,44. Internalin A besitzt ein LPXTG-Motiv und wird von Sortase kovalent an die bakterielle Zellwand gebunden.

Eigentlich nicht-invasive *L. innocua*, die (plasmidkodiert) InlA exprimieren erlangen dadurch die Fähigkeit in die epithelzellartige Caco-2 Zelllinie zu invadieren (Gaillard *et al.*, 1991), was den Schluss nahe legt, dass es sich bei InlA um einen der wichtigsten Invasionsfaktoren handelt. Jüngste Untersuchungen belegen zudem die wichtige Rolle von InlA bei der Infektion der Plazenta und der Überwindung der Plazentaschranke (Lecuit *et al.*, 2004)

Der Interaktionspartner von InlA im Menschen ist E-Cadherin, ein 110 kDa großes glykosiliertes Transmembranprotein, welches für kalziumabhängige Zelladhäsion im epithelialen Gewebe verantwortlich ist (Geiger *et al.*, 1992). Die Interaktion von InlA und E-Cadherin findet zwischen den LRRs des Internalins und den äußersten EC1 Untereinheiten des E-Cadherins statt (Lecuit *et al.*, 1999; Schubert *et al.*, 2002). Murines E-Cadherin, das dem humanen zu 85% gleicht, ist dagegen kein Bindungspartner für InlA. Es hat sich gezeigt, dass hierfür das Vorhandensein eines einzigen Prolinrestes (P16) entscheidend ist. Murines E-Cadherin mit einer E16P Mutation bindet an InlA, humanes E-Cadherin P16E dagegen nicht (Lecuit *et al.*, 1999). Die Aufnahme des Bakteriums erfolgt durch eine Umgestaltung des Aktin-Cytoskeletts, welche durch α - und β -Catenine, die mit der intrazellulären Domäne des Cadherins wechselwirken, verursacht wird (Lecuit *et al.*, 2000; Vázquez-Boland *et al.*, 2001b).

B.2.3.2 Internalin B

Internalin B (InlB) wird kodiert vom Gen *inlB*, besitzt unprozessiert 630 Aminosäurereste, hat ein Molekulargewicht von 71 kDa und einen pI von 10,11. Im Gegensatz zu anderen großen Internalinen ist es nicht kovalent mit der Zellwand verbunden, sondern über seinen Zellwandanker (cell surface anchor, Csa) in Form von so genannten GW-Repeats lose mit Bestandteilen der Zellwand, wie Lipoteichonsäuren, assoziiert (Braun *et al.*, 1997; Jonquières *et al.*, 1999).

Während InlA vor allem für das Eindringen in epitheliales Gewebe wichtig ist, benötigt *L. monocytogenes* InlB für die Invasion in eine große Reihe von Zelltypen, wie Epithelzellen, Fibroblasten, Hepatozyten und Endothelzellen (Dramsi *et al.*, 1995; Lingnau *et al.*, 1995) (Drevets *et al.*, 1995; Greiffenberg *et al.*, 1998; Müller *et al.*, 1998). Wie sich gezeigt hat, ist hierbei die Region A von InlB für die Invasion ausreichend (Braun *et al.*, 1999). Sie interagiert mit einer Met-Rezeptor Tyrosinkinase, dem Rezeptor für den Hepatozyten-Wachstumsfaktor HGF, wodurch es über die PI-3-Kinase zum so genannten "membrane ruffling" kommt, einer Umstrukturierung des Aktin-Cytoskeletts, welche die Invasion der Bakterien ermöglicht (Iretton *et al.*, 1999; Shen *et al.*, 2000).

Der C-Terminus von InlB dagegen interagiert mit Glykosaminoglykanen (GAGs), welche die Aktivierung des Met-Rezeptors durch HGF kontrollieren. Dieser Mechanismus verstärkt synergistisch die durch die Met-Rezeptor-Bindung vermittelte Invasion (Jonquière *et al.*, 2001). Außerdem bindet der C-Terminus an das Säugerprotein gC1q-R, dem Rezeptor für den globulären Teil der Komplement-Komponente C1q. Auch hierbei kommt es zu einer Aktivierung der PI-3-Kinase (Bierne & Cossart, 2002; Braun *et al.*, 2000). Für die Interaktion des C-Terminus mit diesen Bindungspartnern ist es nötig, dass sich InlB aus der Bakterienzellwand herauslöst, mit der es nur lose assoziiert ist (Marino *et al.*, 2002).

B.2.3.3 Internaline C2, D, E, F, G, H

Die Gene der großen Internaline C2, D, E, G und H sind in den zwei Operons *inlG/H/E* bzw. *inlG/C2/D/E* organisiert, die in zwei verschiedenen Isolaten von *L. monocytogenes* Serovar 1/2a zu finden sind. Bei *inlH* handelt es sich wahrscheinlich um eine Rekombination aus dem stromabwärts gelegenen Teil von *inlC2* und dem stromaufwärts gelegenen Teil von *inlD* (siehe auch Abbildung 7). Das Gen *inlF* befindet sich an einem eigenen Locus. Die Deletion des *inlG/H/E* Clusters führt nach Raffelsbauer *et al.* zu einer reduzierten Virulenz in Mäusen,

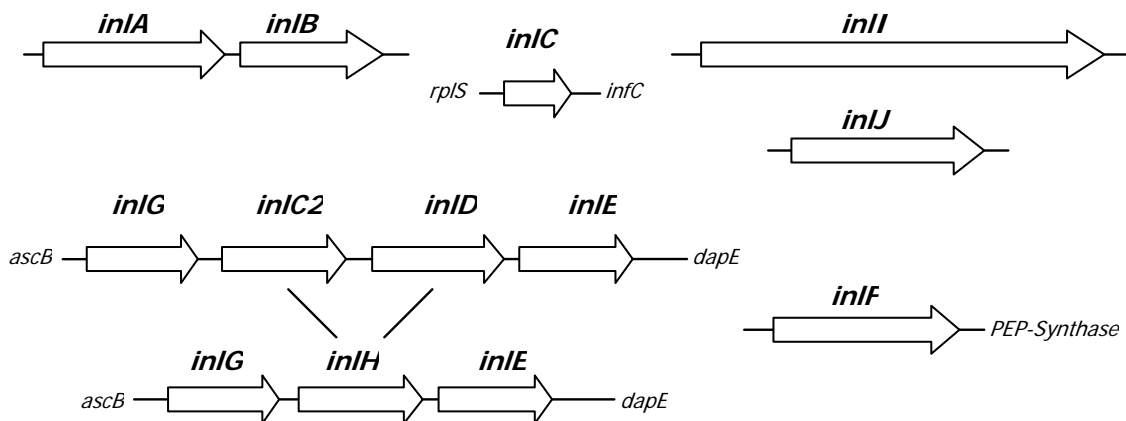


Abbildung 7. Organisation der Internalingene in *L. monocytogenes* Serovar 1/2a (nach Mengaud *et al.*, 1989; nach Sabet *et al.*, 2005; Vázquez-Boland *et al.*, 2001a). Die vermutete Rekombination von *inlH* aus *inlC2* und *inlD* ist mit Strichen angedeutet.

während die Deletion von *inlC2*, *D*, *E* und *F* nach Dramsi *et al.* *in vitro* jeweils keine signifikanten Auswirkungen hat (Dramsi *et al.*, 1997; Raffelsbauer *et al.*, 1998). Neuere Untersuchungen legen nahe, dass die Internaline G, H und E *in vitro* einen unterstützenden Effekt auf die InlA-abhängige Invasion haben (Bergmann *et al.*, 2002). Leider sind zu keinem dieser Internaline genauere Mechanismen oder mögliche Bindungspartner bekannt.

B.2.3.4 Internalin C

So wie InlA der Prototyp der großen Internaline ist, stellt Internalin C aus *L. monocytogenes* (InlC, zuerst beschrieben als IrpA) den Prototyp der kleinen Internaline dar. Es besitzt

sollten die Promotoren der Virulenzgene mittels *in vitro* Transkriptionsstudien mit rekombinanten PrfA-Proteinen aus den verschiedenen Listerienarten getestet werden, um dabei die Aktivitäten der Proteine und Promotoren, und eine evtl. vorhandene speziesspezifische Anpassung zu untersuchen.

C Material und Methoden

C.1 Verwendete Mikroorganismen

Name	Herkunft
<i>L. monocytogenes</i> EGD	S. H. E. Kaufmann
<i>L. monocytogenes</i> EGD Δ inlG/H/E	(Raffelsbauer <i>et al.</i> , 1998)
<i>L. monocytogenes</i> EGD Δ inlG/H/E \times pERL_prfA*	diese Arbeit
<i>L. monocytogenes</i> EGD Δ inlA/B (WL-112)	(Greiffenberg <i>et al.</i> , 1997)
<i>L. monocytogenes</i> EGD Δ inlA/B \times pERL_prfA*	diese Arbeit
<i>L. monocytogenes</i> EGDe	(Glaser <i>et al.</i> , 2001)
<i>L. monocytogenes</i> EGDe Δ prfA	(Chatterjee <i>et al.</i> , 2006)
<i>L. monocytogenes</i> EGDe Δ prfA Δ sigB	(Stritzker <i>et al.</i> , 2005)
<i>L. monocytogenes</i> EGDe Δ actA	Pilgrim/Bauer, 2002
<i>L. monocytogenes</i> EGDe s-prfA	diese Arbeit
<i>L. monocytogenes</i> EGDe m-prfA	diese Arbeit
<i>L. ivanovii</i> ATCC 19119	Stammsammlung
<i>L. seeligeri</i> NRRL 33019 alias <i>L. seeligeri</i> SLCC 3954	Stammsammlung
<i>E. coli</i> DH5 α	Stammsammlung
<i>E. coli</i> M15	Qiagen

Wenn nicht anders beschrieben, wurden Listerien bei 37 °C auf Agarplatten bzw. in einer Schüttelkultur (190 rpm) mit BHI über Nacht kultiviert. Für *E. coli* Stämme wurde LB statt BHI als Nährmedium verwendet.

C.2 Verwendete Zelllinien

Name	Beschreibung	Herkunft
Caco-2	adhärent wachsende Zelllinie epithelialer Morphologie aus einem humanen, colorektalen Adenokarzinom Volle Beschreibung: ATCC HTB-37	Stammsammlung
HepG2	adhärent wachsende Zelllinie epithelialer Morphologie aus einem humanen, hepatozellulären Karzinom Volle Beschreibung: ATCC HB-8065	Stammsammlung
HeLa	adhärent wachsende Zelllinie epithelialer Morphologie aus einem humanen, zervikalen Adenokarzinom Volle Beschreibung: ATCC CCL-2	Stammsammlung
Vero	adhärent wachsende Zelllinie epithelialer Morphologie aus gesundem simianen Nierengewebe Volle Beschreibung: ATCC CCL-81	Stammsammlung

C.3 Plasmide

Name Alias	Charakteristika	Herkunft
pUC18	vermittelt Amp ^R ; <i>E. coli</i> DH5 α mit pUC18 wurden in Gegenwart von 100 mg/l Ampicillin kultiviert	
Derivate von pUC18	enthält Promotor von:	
pUC_inlA	<i>inlA</i> von <i>L. monocytogenes</i> EGDe	diese Arbeit (ivT_inlA_Mun \times ivT_inlA_Bam)
pUC_i-inlA	<i>i-inlA</i> (IPF 930.1) von <i>L. ivanovii</i> ATCC 19119	diese Arbeit (ivT_i-inlA_Mun \times ivT_i-inlA_Bam)
pUC_inlC <i>PinlC</i>	<i>inlC</i> von <i>L. monocytogenes</i> EGDe	Qin Luo (Dissertation)
pUC_i-inlC	<i>i-inlC</i> von <i>L. ivanovii</i> ATCC 19119	diese Arbeit (ivT_i-inlC_Eco \times ivT_i-inlC_Xba)
pUC_i-inlE	<i>i-inlE</i> von <i>L. ivanovii</i> ATCC 19119	Stefanie Altmann (ivTE-1 \times ivTE-2)
pUC_i-inlF	<i>i-inlF</i> von <i>L. ivanovii</i> ATCC 19119	diese Arbeit (ivT_i-inlF_Eco \times ivT_i-inlF_Bam)

Name Alias	Charakteristika	Herkunft
pUC_i-inlI	<i>i-inlI</i> von <i>L. ivanovii</i> ATCC 19119	diese Arbeit (ivT_i-inlI_Eco>>ivT_i-inlI_Bam)
pUC_i-inlK	<i>i-inlK</i> von <i>L. ivanovii</i> ATCC 19119	Stefanie Altmann (ivTK-1>>ivTK-2)
pUC_actA <i>PactA</i>	<i>actA</i> von <i>L. monocytogenes</i> EGDe	Jutta Bohne (Dissertation)
pUC_i-actA	<i>i-actA</i> von <i>L. ivanovii</i> ATCC 19119	diese Arbeit (ivT_i-actA_Eco>>ivT_i-actA_Bam)
pUC_s-actA	<i>actA</i> von <i>L. seeligeri</i> NRRL 33019	diese Arbeit (ivT_s-actA_Xba>>ivT_s-actA_Bam)
pUC_plcA_hly	<i>plcA</i> und <i>hly</i> von <i>L. monocytogenes</i> EGDe	diese Arbeit (ivT_plcA_hly_Hind>>ivT_plcA_hly_Sac)
pUC_i-plcA_hly	<i>plcA</i> und <i>hly</i> von <i>L. ivanovii</i> ATCC 19119	diese Arbeit (ivT_i-plcA_hly_Pst>>ivT_i-plcA_hly_Eco)
pUC_s-plcA_hly	<i>plcA</i> und <i>hly</i> von <i>L. seeligeri</i> NRRL 33019	diese Arbeit (ivT_s-plcA_hly_Hind>>ivT_s-plcA_hly_Xba)
pREP-4	Low Copy Plasmid in <i>E. coli</i> M15, exprimiert konstitutiv das <i>lac</i> Repressor Protein, vermittelt Kan ^R ; <i>E. coli</i> M15 wurden in Gegenwart von 25 mg/l Kanamycin kultiviert	Qiagen
pQE30, pQE60, pQE70	pQE Vektoren vermitteln Amp ^R ; <i>E. coli</i> M15 mit pQE wurden in Gegenwart von 100 mg/l Ampicillin und 25 mg/l Kanamycin kultiviert	Qiagen
Derivate von pQE Vektoren	produziert His-Tag Fusionsprotein mit Template:	
pQE30_inlA	<i>inlA</i> von <i>L. monocytogenes</i> EGDe	diese Arbeit (inlA_Bam>>inlA_Pst)
pQE30_inlB	<i>inlB</i> von <i>L. monocytogenes</i> EGDe	diese Arbeit (inlB_Bam>>inlB_Pst)
pQE_inlC	<i>inlC</i> von <i>L. monocytogenes</i> EGDe	Fredi Engelbrecht (Dissertation)
pQE30_inlE	<i>inlE</i> von <i>L. monocytogenes</i> EGDe	diese Arbeit (inlE_Bam>>inlE_Pst)
pQE30_inlG	<i>inlG</i> von <i>L. monocytogenes</i> EGDe	diese Arbeit (inlG_Sac>>inlG_Pst)
pQE30_inlH	<i>inlH</i> von <i>L. monocytogenes</i> EGDe	diese Arbeit (inlH_Bam>>inlH_Pst)
pQE30_i-inlA	<i>i-inlA</i> (IPF 930.1) von <i>L. ivanovii</i> ATCC 19119	diese Arbeit (i-inlA_Bam>>i-inlA_Pst)
pQE60_i-inlC	<i>i-inlC</i> von <i>L. ivanovii</i> ATCC 19119	diese Arbeit (i-inlC_Nco>>i-inlC_Bgl)
pQE60_i-inlD	<i>i-inlD</i> von <i>L. ivanovii</i> ATCC 19119	diese Arbeit (i-inlD_Nco>>i-inlD_Bgl)
pQE60_i-inlE	<i>i-inlE</i> von <i>L. ivanovii</i> ATCC 19119	diese Arbeit (i-inlE_Nco>>i-inlE_Bgl)
pQE60_i-inlH	<i>i-inlH</i> von <i>L. ivanovii</i> ATCC 19119	diese Arbeit (i-inlH_Sph>>i-inlH_Bgl)
pQE60_i-929	IPF 929.1 von <i>L. ivanovii</i> ATCC 19119	diese Arbeit (i-929_Sph>>i-929_Bgl)
pQE-30/5/prfA	<i>prfA</i> von <i>L. monocytogenes</i> EGDe	(Böckmann <i>et al.</i> , 1996)
pQE30_s-prfA	<i>prfA</i> von <i>L. seeligeri</i> NRRL 33019	diese Arbeit (s-prfA_Bam>>s-prfA_Pst)
pQE30_sm-prfA	<i>prfA</i> von <i>L. seeligeri</i> NRRL 33019 und <i>L. monocytogenes</i> EGDe	diese Arbeit (s-prfA_Bam>>s-prfA_rkm2 × prfA_rkm2>>prfA_Pst)
pLSV101	vermittelt Em ^R ; <i>E. coli</i> DH5α mit pLSV101 wurden in Gegenwart von 300 mg/l Erythromycin kultiviert, Listerien in Gegenwart von 10 mg/l	(Joseph <i>et al.</i> , 2006)
Derivate von pLSV101	enthält Sequenz:	
pLSV101_m-prfA	<i>prfA</i> aus <i>L. monocytogenes</i> EGDe	diese Arbeit (prfA_Salup>>prfA_Bgldn)
pLSV101_s-prfA	<i>s-prfA</i> aus <i>L. seeligeri</i> NRRL 33019 mit flankierenden Regionen von <i>L. monocytogenes</i> EGDe	diese Arbeit (prfA_Salup>>prfA_Alwup, s-prfA_bnt>>s-prfA_Bse, prfA_Bsedn>>prfA_Bamdn)
pLSV101_i-prfA	<i>i-prfA</i> aus <i>L. ivanovii</i> ATCC 19119 mit flankierenden Regionen von <i>L. monocytogenes</i> EGDe	diese Arbeit (prfA_Salup>>prfA_Ncoup, i-prfA_Nco>>i-prfA_Bse, prfA_Bsedn>>prfA_Bamdn)

C.4 Oligonukleotide

Restriktionsschnittstellen, die durch einen Primer eingeführt werden, sind unterstrichen.

C.4.1 für Klonierung in pQE

Name Alias	Sequenz (Zielsequenz)	Bemerkung
inlA_Bam> Inl A7>	cgtg ^g gggaggatc <u>ctt</u> taataaattaagc cgtg ^g gggagcataa <u>tt</u> taataaattaagc in EGDe	inlA_Bam>>inlA_Pst ergibt 2252 bp Fragment
<inlA_Pst <Inl A8	gagcgcattatcgct <u>ctg</u> cagagttgttaggg gagcgcattatcgctatcgccagttgttaggg in EGDe	

Name Alias	Sequenz (Zielsequenz)	Bemerkung
inlB_Bam> Inl B7>	attggaacgggggatccgtacaagcggag attggaacggggcgaaagtacaagcggag in EGDe	inlB_Bam><inlB_Pst ergibt 1820 bp Fragment
<inlB_Pst <Inl B2	tttaggtcttctgcaagtattttctgtgcc tttaggtcttttccagttattttctgtgcc in EGDe	
inlE_Bam> Inl E1>	atgagctcaaagaaggatccgcagcgg atgagctcaaagaaggtacaagcagcgg in EGDe	inlE_Bam><inlE_Pst ergibt 1354 bp Fragment
<inlE_Pst <Inl E2	gaagcacattcaatttatctgcagtaatcgg gaagcacattcaatttatctccagtaatcgg in EGDe	
inlG_Sac> Inl G1>	ggatgaaagctgagctcgagagtattgcg ggatgaaagctcaggcagagagtattgcg in EGDe	inlG_Sac><inlG_Pst ergibt 1314 bp Fragment
<inlG_Pst <Inl G2	gaatcatactgaaatcctgcagtggttttgg gaatcatactgaaatcatcactgtgttttgg in EGDe	
inlH_Bam> Inl H1>	gacaagccaagggtggatccgttcgggc gacaagccaagggtgtggagggttcgggc in EGDe	inlH_Bam><inlH_Pst ergibt 1498 bp Fragment
<inlH_Pst <Inl H2	aagcatggtattttctgctcgcagctgttgg aagcatggtattttctgctcaccagctgttgg in EGDe	
i-inlA_Bam>	ggaacaaatgtcggatccgcaactatttccg ggaacaaatgtcgaagcagcaactatttccg in ATCC 19119	i-inlA_Bam><i-inlA_Pst ergibt 2241 bp Fragment
<i-inlA_Pst	gattgcattatcgctatctgcagtagttgg gattgcattatcgctatcaccagtagttgg in ATCC 19119	
i-inlC_Nco> iCfor1	gttctggaaccatggtacaggtgcg gttctggaacaaaggtacaggtgcg in ATCC 19119	i-inlC_Nco><i-inlC_Bgl ergibt 820 bp Fragment
<i-inlC_Bgl iCrev1	gagtcctaagatctcaaaggctgtacc gagtcctagtttctcaaaggctgtacc in ATCC 19119	
i-inlD_Nco> iDfor1	tttgggaacaaaccatggaggcggcg tttgggaacaaaggtggaggcggcg in ATCC 19119	i-inlD_Nco><i-inlD_Bgl ergibt 872 bp Fragment
<i-inlD_Bgl iDrev1	gtttcgtagatcttgcgagacaattg gtttcgtttatttttgcgagacaattg in ATCC 19119	
i-inlE_Nco> iEfor1	gtacatgcccagatattttacatccg gtacatgcccgaatattttacatccg in ATCC 19119	i-inlE_Nco><i-inlE_Bgl ergibt 617 bp Fragment
<i-inlE_Bgl iErev1	aatccttgagatctgcgtgtcaatgg aatccttgatgtcagcgtgtcaatgg in ATCC 19119	
i-inlH_Sph> iHfor2	aaggtatgatgctgcaggcatgctacattcg aaggtatgatgctgcaggatattctacattcg in ATCC 19119	i-inlH_Sph><i-inlH_Bgl ergibt 889 bp Fragment
<i-inlH_Bgl iHrev1	tttccggttgagatctcataagtagag tttccggttggtatcacataagtagag in ATCC 19119	
i-929_Sph> i929for2	aaagtacaggcagctggcatgcatgtattacg aaagtacaggcagctggcaattcattgtattacg in ATCC 19119	i-929_Sph><i-929_Bgl ergibt 1470 bp Fragment
<i-929_Bgl i929rev1	tatttacagttacacagatcttgcactgtc tatttacagttacacatttagttgcactgtc in ATCC 19119	
s-prfA_Bam>	ggaggatgacgatggatccactaaagc ggaggatgacgatgtgagcactaaagc in NRRL 33019	s-prfA_Bam><s-prfA_Pst ergibt 799 bp Fragment
<s-prfA_Pst	acaattaataaaaagcgtgcagggtc acaattaataaaaagcgcgcaaaagggtc in NRRL 33019	
<s-prfA_rkmb2	tgaatTTTTATACACAATGACGTTTTCTGTTTTG erkennt NRRL 33019, hat Überhang für EGDe	s-prfA_Bam><s-prfA_rkmb2 ergibt 625 bp Fragment
prfA_rkmb>	caagaaaacgctcattgtgtataaaaattcattgctt erkennt EGDe, hat Überhang für NRRL 33019	prfA_rkmb><prfA_Pst ergibt 208 bp Fragment
<prfA_Pst	tgaaaatgcttctgtaagttctgcagtcg tgaaaatgcttctgtaagttctttatttcg in EGDe	

C.4.2 für Sequenzierung von pQE Vektoren plus Inserts

Name	Sequenz	Bemerkung
pQEf>	cccgaaaagtgccacctg	für pQE Vektoren (plus Insert) und Klontest-PCR
<pQEr	gttctgaggtcattactgg	für pQE Vektoren (plus Insert) und Klontest-PCR
SeqA1>	tccgctagctaatttgacga	für <i>inlA</i> von EGDe
<SeqA2	agttgcgaaatcccacttgt	für <i>inlA</i> von EGDe
SeqB1>	acctaagttcgctcaaggat	für <i>inlB</i> von EGDe
<SeqB2	aagcggtaaccctttgtca	für <i>inlB</i> von EGDe
SeqE1>	tcaagtaaccgatttaaadc	für <i>inlE</i> von EGDe

Name	Sequenz	Bemerkung
<SeqE2	cacatcaaaaactacagcgt	für <i>inLE</i> von EGDe
SeqG1>	gccaatcttactaatttaga	für <i>inLG</i> von EGDe
<SeqG2	ccaaccagaaaaagtataac	für <i>inLG</i> von EGDe
SeqH1>	gaattatctggaaaccggt	für <i>inIH</i> von EGDe
<SeqH2	ggcgttggttctttaatta	für <i>inIH</i> von EGDe
1929forseq>	gatccagctttagcagaaataaagg	für IPF 929.1 von ATCC 19119

C.4.3 für Klonierung in pUC18

Name Alias	Sequenz (Zielsequenz)	Bemerkung
ivT_inlA_Mun>	ataagtaaatgaacaattgtatatttac ataagtaaatgaataattgtatatttac in EGDe	ivT_inlA_Mun><ivT_inlA_Bam ergibt 557 bp Fragment
<ivT_inlA_Bam	cgttgatagggatccctctcctgcacccg cgttgatagggattttctcctgcacccg in EGDe	
ivT_i-inlA_Mun>	ttgaaaaacaattgcattattttgtataa ttgaaaaagaattacattattttgtataa in ATCC 19119	ivT_i-inlA_Mun><ivT_i-inlA_Bam ergibt 478 bp Fragment
<ivT_i-inlA_Bam	ttaattgtatatggatccctaataatagc ttaattgtatatggctctctaataatagc in ATCC 19119	
ivT_i-actA_Eco>	atgggaagaattcggcggttagataagg atgggaagaagttggcggttagataagg in ATCC 19119	ivT_i-actA_Eco><ivT_i-actA_Bam ergibt 237 bp Fragment
<ivT_i-actA_Bam	aatctatctaggatcccttttttactcc aatctatctagtttctacttttttactcc in ATCC 19119	
ivT_i-inlC_Eco>	atcaataacttgtgaattcatgtaggc atcaataacttgtgcataaatgtaggc in ATCC 19119	ivT_i-inlC_Eco><ivT_i-inlC_Xba ergibt 384 bp Fragment
<ivT_i-inlC_Xba	agcattgctacttctagattttgttaacc agcattgctactactacattttgttaacc in ATCC 19119	
ivT_i-inlE_Eco>	tcctttattagtagtgaattcctatacac tcctttattagtagtgaagactatacac in ATCC 19119	ivT_i-inlE_Eco><ivT_i-inlE_Bam ergibt 251 bp Fragment
ivTE-1		
<ivT_i-inlE_Bam	actactacacttttggatccaattactttttc actactacactttttaaccaattactttttc in ATCC 19119	
ivTE-2		
ivT_i-inlF_Eco>	taaaaatgtgaattcgagtaaaaaaatg taaaaatgtgaaaaagagtaaaaaaatg in ATCC 19119	ivT_i-inlF_Eco><ivT_i-inlF_Bam ergibt 528 bp Fragment
<ivT_i-inlF_Bam	cacacaacaaaaacggatccctaaaattg cacacaacaaaaactgttactaaaattg in ATCC 19119	
ivT_i-inlI_Eco>	caataatttttcagaattccaccacg caataatttttcagaatgcccaccacg in ATCC 19119	ivT_i-inlI_Eco><ivT_i-inlI_Bam ergibt 401 bp Fragment
<ivT_i-inlI_Bam	accttagttccggatccctgtattaatac accttagttccagaacctgtattaatac in ATCC 19119	
ivT_i-inlK_Eco>	aaacagcaatagcgaattctagataataaa aaacagcaatagcggtttctagataataaa in ATCC 19119	ivT_i-inlK_Eco><ivT_i-inlK_Bam ergibt 249 bp Fragment
ivTK-1		
<ivT_i-inlK_Bam	aactgctattaatggatcccttaaccaac aactgctattaatagattcttaaccaac in ATCC 19119	
ivTK-2		
ivT_i-plcA_hly_Pst>	ctgtttttaattgactgacgttttccggc ctgtttttaattgactgacgttttccggc in ATCC 19119	ivT_i-plcA_hly_Pst><ivT_i-plcA_hly_Eco ergibt 373 bp Fragment
<ivT_i-plcA_hly_Eco	tgtcattaaaagtagaattcttttttcatgg tgtcattaaaagtagcattatttttttcatgg in ATCC 19119	
ivT_plcA_hly_Hind>	cagttattaagcgaataagcttttccgcc cagttattaagcgaatatgcttttccgcc in EGDe	ivT_plcA_hly_Hind><ivT_plcA_hly_Sac ergibt 375 bp Fragment
<ivT_plcA_hly_Sac	tgtaataaaaaacgagctctatttttttcatgg tgtaataaaaaactagcattatttttttcatgg in EGDe	
ivT_s-plcA_hly_Hind>	tagatgaaaagctttcccgtagcattg tagatgaaaattgctttcccgtagcattg in NRRL 33019	ivT_s-plcA_hly_Hind><ivT_s- plcA_hly_Xba ergibt 367 bp Fragment
<ivT_s-plcA_hly_Xba	aacgacatgatatctagaccaaataattttc aacgacatgataactaaaccaaataattttc in NRRL 33019	
ivT_s-actA_Xba>	gaagttgtctagaaaattgcccgaagcatggc gaagttgcccagaaaattgcccgaagcatggc in NRRL 33019	ivT_s-actA_Xba><ivT_s-actA_Bam ergibt 280 bp Fragment
<ivT_s-actA_Bam	gttaatagaaatcaggatccctaaaatctactgac gttaatagaaatcagggccctaaaatctactgac in NRRL 33019	

C.4.4 für Klonierung in pLSV101

Name Alias	Sequenz (Zielsequenz)	Bemerkung
prfA_Salup>	caataaa <u>g</u> t <u>cg</u> actaacatatattatttcctac caataaattcaactaacatatattatttcctac in EGDe	
<prfA_Bgldn	gctaaa <u>ag</u> at <u>ct</u> cgtagaagctggcgcaacaaa gctaaagcattgctgaagctggcgcaacaaa in EGDe	prfA_Salup><prfA_Bgldn ergibt 1288 bp Fragment
prfA_Bsedn>	gtcctgctag <u>ct</u> gggataaaatttaattaaatc gtcctgctacttggggaaaattaaattaaatc in EGDe	prfA_Bsedn><prfA_Bamdn ergibt 317 bp Fragment
prfA_BsednI>	gtcctgctag <u>ct</u> gggaaaaattcaattaaatc gtcctgctacttggggaaaattaaattaaatc in EGDe	prfA_BsednI><prfA_Bamdn ergibt 317 bp Fragment
<prfA_Bamdn	gctaa <u>ag</u> g <u>at</u> cc <u>cg</u> tgaagctggcgcaacaaa gctaaagcattgctgaagctggcgcaacaaa in EGDe	
s-prfA_bnt>	gtgagcactaaagcagaggatttttaagaata gtgagcactaaagcagaggatttttaagaata in NRRL 33019	s-prfA_bnt><s-prfA_Bse ergibt 704 bp Fragment
<s-prfA_Bse	ttat <u>ccc</u> agctattatgacaagctaag ttatcccatgaattatgacaagctaag in NRRL 33019	
i-prfA_Nco>	atga <u>acc</u> atggacgctcaagcagcag atgaaaaatggacgctcaagcagcag in ATCC 19119	i-prfA_Nco><i-prfA_Bse ergibt 713 bp Fragment
<i-prfA_Bse	at <u>ttt</u> tt <u>ccc</u> agctactaggacatgctag at <u>ttt</u> ttcccatgaactaggacatgctag in ATCC 19119	
<prfA_Alwup	tcttctgcttgag <u>tg</u> ctcactcctcatcc tcttctgcttgagcgttcatgctcctcatcc in EGDe	prfA_Salup><prfA_Alwup ergibt 306 bp Fragment
<prfA_Ncoup	ttgagcgt <u>cc</u> at <u>gg</u> ctcatccccaatc ttgagcgttcatgctcctcatccccaatc in EGDe	prfA_Salup><prfA_Ncoup ergibt 298 bp Fragment
prfA_Test>	gaaaaagttcgaggattaggcatac gaaaaagttcgaggattaggcatac in EGDe	
<prfA_Test	gttgtaatgtagaaggaaaagtttg gttgtaatgtagaaggaaaagtttg in EGDe	prfA_Test><prfA_Test ergibt 1437 bp Fragment

C.4.5 für Primer Extension

Name	Sequenz	Bemerkung
PEx_m-inlA	tatgttgatcacacagtgctatcc	für <i>inlA</i> von EGDe
PEx_i-inlA	atttcgaattctatcgcataaaatt	für <i>i-inlA</i> von ATCC 19119
PEx_i-inlC	tttcaatattctccactcc	für <i>i-inlC</i> von ATCC 19119
PEx_i-inlE	aattactttttctactgatcttca	für <i>i-inlE</i> von ATCC 19119

C.4.6 für in vitro Transkription

Name Alias	Sequenz (Zielsequenz)	Bemerkung
ivT_plcA_stop> P	ttccgcctaattgggaaagtaa in pUC_ <i>plcA_hly</i>	P><H ergibt 335 bp Fragment
<ivT_hly_stop H	tatttttttcatgggtttcactctc in pUC_ <i>plcA_hly</i>	
<ivT_plcA_start-10 P1	tttattctagtcctgctgtcccttt in pUC_ <i>plcA_hly</i>	P><P1 ergibt 187 bp Fragment
<ivT_plcA_start P2	gtcctgctgtccctttatcg in pUC_ <i>plcA_hly</i>	P><P2 ergibt 178 bp Fragment
ivT_hly_start-10> H1	cctatcttaaagtgacttttatggtgagg in pUC_ <i>plcA_hly</i>	H1><H ergibt 225 bp Fragment
ivT_hly_start> H2	aagtgacttttatggtgaggcattaac in pUC_ <i>plcA_hly</i>	H2><H ergibt 216 bp Fragment

C.5 Allgemeine Puffer und Reagenzien

C.5.1.1 PBS (phosphate buffered saline)

PBS bietet was Salzkonzentration und pH-Wert angeht annähernd physiologische Bedingungen und wird deshalb häufig verwendet, um pro- und eukaryotische Zellen kurzfristig zu inkubieren (z.B. um bestimmte Agenzien und/oder Medien abzuwaschen) oder um darin Proteine aufzubewahren. Viele Proteine benötigen jedoch bei hoher Konzentration hiervon abweichende pH-Werte und Salzkonzentrationen.

Stammlösung, 20×	c_n	c_m
NaCl (58,44 g/mol)	2,74 M	160 g/l
KCl (74,56 g/mol)	54 mM	4 g/l
Na ₂ HPO ₄ (141,96 g/mol)	162 mM	23 g/l
KH ₂ PO ₄ (136,09 g/mol)	29 mM	4 g/l

Mit dH₂O auf gewünschtes Volumen auffüllen und autoklavieren.

C.5.1.2 TAE (Tris acetic acid EDTA)

Puffer für Elektrophorese mit Agarosegelen.

Stammlösung, 50×	c_n	$c_{m/v}$
Tris Base (121,14 g/mol)	2 M	242 g/l
Eisessig	1 M	5,71% (v/v)
Na ₂ -EDTA × H ₂ O (372,3 g/mol)	0,05 M	18,6 g/l

Mit dH₂O auf gewünschtes Volumen auffüllen. Die 1× Lösung hat pH 8,5.

Tris=Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan, 2-Amino-2-(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol.

Tris Ultrapure, AppliChem

C.5.1.3 TBE (Tris Borsäure EDTA)

Puffer für Elektrophorese mit Agarose- oder Harnstoffgelen (C.19.2). TBE erlaubt gegenüber TAE höhere Laufgeschwindigkeiten.

Stammlösung, 10×	c_n	c_m
Tris Base (121,14 g/mol)	0,89 M	107,8 g/l
Borsäure (61,8 g/mol)	0,89 M	55,0 g/l
Na ₂ -EDTA × H ₂ O (372,3 g/mol)	0,02 M	7,45 g/l

Mit dH₂O auf gewünschtes Volumen auffüllen. Die 1× Lösung hat pH 8,3.

C.5.1.4 1 M CaCl₂ Lösung

	c_m	Menge für 100 ml
CaCl ₂ (110,99 g/mol)	111 g/l	11,1 g

C.5.1.5 1 M MgCl₂ Lösung

	c_m	Menge für 100 ml
MgCl ₂ × 6 H ₂ O (203,30 g/mol)	203,3 g/l	20,3 g

C.5.1.6 1 M Tris/Cl Lösung (pH 8,0)

	c_m	Menge für 100 ml
Tris Base (121,14 g/mol)	121,1 g/l	12,1 g

pH-Wert mit Salzsäure auf 8,0 einstellen

C.5.1.7 0,5 M Na-EDTA Lösung (pH 8,0)

	c_m	Menge für 100 ml
$\text{Na}_2\text{-EDTA} \times \text{H}_2\text{O}$ (372,3 g/mol)	203,3 g/l	20,3 g

pH-Wert auf 8,0 einstellen

C.6 Bakterienmedien und Antibiotika

C.6.1 Bakterienmedien

C.6.1.1 LB-Medium (Luria-Bertani)

Standardmedium für Kultivierung von *E. coli* Stämmen.

Pepton/Casein	10 g/l
Hefeextrakt	5 g/l
NaCl	10 g/l
[Agar	15 g/l]

Mit dH_2O auf gewünschtes Volumen auffüllen und autoklavieren.

C.6.1.2 2YT-Medium

In dieser Arbeit wurde dieses Medium für die Kultivierung von *E. coli* Stämmen bei der Proteinaufreinigung verwendet. 2YT ist eine reichere Variante des LB-Mediums und stellt den Bakterien damit mehr Ressourcen für die Produktion des überexprimierten Proteins zur Verfügung.

Pepton/Casein	16 g/l
Hefeextrakt	10 g/l
NaCl	10 g/l
[Agar	15 g/l]

Mit dH_2O auf gewünschtes Volumen auffüllen und autoklavieren.

C.6.1.3 BHI-Medium (brain heart infusion)

Standardmedium für Kultivierung von Listerien. Die Eigenschaften dieses Mediums sind gerade was die Genregulation in Listerien betrifft stark von der verwendeten Charge abhängig. Welche Komponente genau dafür verantwortlich ist, ist noch nicht bekannt.

BHI	37 g/l
[Agar	15 g/l]

Mit dH_2O auf gewünschtes Volumen auffüllen und autoklavieren.

C.6.1.4 Minimalmedium für Listerien

Dieses Minimalmedium wurde für *Listeria monocytogenes* Scott A entwickelt (Premaratne *et al.*, 1991). In dieser Arbeit wurde es leicht modifiziert (mit Histidin) verwendet.

	$c_{m/v}$	c_n
KH_2PO_4 (136,1 g/mol)	6,56 g/l	48,2 mM
Na_2HPO_4 (142,0 g/mol)	16,4 g/l	115 mM
$\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ (246,5 g/mol)	0,41 g/l	1,66 mM
Eisen-III-zitrat	88 mg/l	
Arginin	100 mg/l	
Cystein	100 mg/l	
Isoleucin	100 mg/l	
Leucin	100 mg/l	
Methionin	100 mg/l	
Valin	100 mg/l	

Riboflavin	0,5 mg/l
Biotin	0,5 mg/l
Thiamin	1,0 mg/l
Thioctsäure	5 µg/l
Glutamin	600 mg/l
Histidin	100 mg/l
Glucose (ersetzbar durch manch andere (Amino-)Zucker)	10 g/l
[Agar	15 g/l]

Mit dH₂O auf gewünschtes Volumen auffüllen und sterilfiltrieren.

C.6.1.5 Einfriermedium für Bakterien

Glycerol und Salz bewahren die Bakterienzellen beim Einfrieren vor Schaden durch Bildung von Eiskristallen und osmotischem Stress.

Glycerol	50% (v/v)
NaCl	2,9% (w/v)

Mit dH₂O auf gewünschtes Volumen auffüllen und autoklavieren.

Anwendung: wird 1+1 mit einer Übernachtskultur gemischt und die Bakterien dann bei -80 °C eingefroren.

C.6.2 Antibiotika, Stammlösungen

Antibiotikum	Lösungsmittel	Konzentration
<i>Ampicillin</i>	dH ₂ O	100 g/l
<i>Erythromycin</i>	Ethanol	100 g/l oder 10 g/l
<i>Kanamycin</i>	dH ₂ O	25 g/l
<i>Penicillin G</i>	dH ₂ O	12,5 g/l

Sterilfiltrieren und bei -20 °C aufbewahren.

C.7 Zellkultur

C.7.1 Zellkulturmedien, und -puffer

- **RPMI 1640** mit L-Glutamin (Gibco, 21875-034)
- Fötale Kälberserum (**FCS**, Biochrom AG), wird vor Verwendung in Zellkulturmedien durch Hitze inaktiviert (56 °C, 30 min)
- 100× nichtessentielle Aminosäuren (Gibco)
- 10× MEM Eagle with Earl's salts (Gibco)
- 100 mM Pyruvat (Gibco)
- L-Glutamin 200 mM (100×) (Gibco)
- **Trypsin/EDTA** (Gibco, Trypsin-EDTA (1X), liquid - 0.05% Trypsin, 0.53 mM EDTA • 4Na)
- Dimethylsulfoxid (**DMSO**, Fluka 41639)

C.7.1.1 Medium für Caco-2, HeLa und Vero

RPMI 1640 mit L-Glutamin plus ein Zehntel Volumen FCS.

C.7.1.2 HepG2-Medium

10× MEM Eagle with Earl's salts	55 ml
L-Glutamin 200 mM (100×)	5,5 ml
100× nichtessentielle Aminosäuren	5,5 ml
100 mM Pyruvat	5,5 ml
7,5% (w/v) NaHCO ₃	11 ml

Mit dH₂O auf 500 ml auffüllen und dann 50 ml FCS zugeben.

C.7.2 Kultivierung der Zellen

Die Zelllinien Caco-2 (ATCC HTB-37), HepG2 (ATCC HB-8065), HeLa (ATCC CCL-2) und Vero (ATCC CCL-81) wurden gemäß den Empfehlungen der American Type Culture Collection (ATCC, <http://www.atcc.org/> bzw. <http://www.lgcpromochem-atcc.com/>) kultiviert.

C.7.2.1 Einfrieren und Auftauen

Um die Zellen einzufrieren, werden sie zunächst zu hoher Dichte herangezogen, dann mit Trypsin/EDTA abgelöst, in Medium aufgenommen und bei 100 rcf abzentrifugiert. Danach werden sie in Medium mit 10% (v/v) DMSO aufgenommen, in Kryoröhrchen (Greiner, Cryo.S) aliquotiert und mit Zellstoff oder ähnlichem isoliert bei -80 °C langsam eingefroren. Endgültig gelagert werden sie in flüssigem Stickstoff.

Im Gegensatz zum langsamen Einfrieren, soll das Auftauen schnell erfolgen. Das Kryoröhrchen wird dazu in warmem Wasser erwärmt und die Kultur nach Verflüssigung des Mediums sofort in warmem Medium aufgenommen. Am nächsten Tag sollte das Medium mit den Resten an DMSO ausgetauscht werden. Um das schädliche DMSO zu entfernen, können die Zellen auch direkt nach dem Auftauen zunächst mit Medium gewaschen werden.

C.8 Klonierungsmethoden

C.8.1 PCR-Mix (100 µl Ansatz)

Mix für eine PC-Reaktion mit Taq- oder Pfu-Polymerase. Für andere Polymerasen, wie z.B. Phusion™, sind entsprechende Anpassungen gemäß Herstellerangaben vorzunehmen.

Primer 1	50 pmol (1 µl bei 50 µM Stammlösung)
Primer 2	50 pmol (1 µl bei 50 µM Stammlösung)
dNTP Mix	200 µM (1 µl bei 20 mM Stammlösung)
Mg-freier Puffer	1×
MgCl ₂	1,5 mM (oder entsprechend angepasste Konzentration)
Taq-/Pfu-Polymerase	1 U für 1 kb Extension
DNA (Template)	max. 1 µg (20 ng)

Mit dH₂O auf 100 µl auffüllen.

C.8.2 Gelladepuffer (für DNA Agarosegele), 6×

Bromphenolblau	0,25%
Xylen Cyanol FF	0,25%
Saccharose	40% (w/v)

C.8.3 Anwendung von Ethidiumbromid

Stammlösung (10 mg Ethidiumbromid pro ml dH₂O) dunkel und kühl lagern.

Ethidiumbromid-Stammlösung im Verhältnis 1:10000 (1µg/ml Endkonzentration) direkt in die geschmolzene, handwarme Agarose geben oder fertiges DNA-Gel in einem Pufferbad mit selbiger Konzentration zum Färben inkubieren (etwa 10-15 min).

C.8.4 Isolierung chromosomaler DNA (aus Listerien)

C.8.4.1 Material

- TNE (10 mM Tris/Cl pH 8,0, 10 mM NaCl, 10 mM EDTA)
- **Lysozym Stammlösung** (120 g/l Lysozym (Sigma, L-6876) in dH₂O lösen, bei -20 °C aufbewahren)
- **DNAzol®** (Chomczynski *et al.*, 1997)
- **EB Puffer** (10 mM Tris, pH 8,5)

C.8.4.2 Durchführung

- 1 ml einer Übernachtskultur der Listerien wird bei 20000 rcf pelletiert.
- Das Pellet wird einmal mit 1 ml TNE gewaschen und dann in 500 µl TNE aufgenommen.

- Es werden 20 µl Lysozym Stammlösung hinzugegeben und die Suspension wird für eine halbe Stunde bei 37 °C inkubiert.
- Die Zellen werden pelletiert und das Pellet in 500 bis 1000 µl DNAzol *langsam* resuspendiert.
- Die Zelltrümmer werden pelletiert und der Überstand abgenommen.
- Nun werden 50% dieses Volumens an 100% Ethanol p.a. (eiskalt) hinzugeben und durch Invertieren gemischt.
- Die Mischung inkubiert für 10 Minuten auf Eis und wird dann bei 20000 rcf und 4 °C für 10 min abzentrifugiert.
- Das Pellet wird zweimal mit 95% EtOH vorsichtig gewaschen, dabei aber nicht suspendiert, und anschließend in der SpeedVac® getrocknet.
- Die getrocknete DNA wird in 100 µl reinstem Wasser oder EB Puffer aufgenommen und bei 4 °C aufbewahrt.

C.8.5 Herstellung kompetenter Bakterien

C.8.5.1 chemisch kompetente *Escherichia coli*

C.8.5.1.1 Reagenzien

Lösung 1 (frisch herstellen)

1 M MgSO ₄ (246 mg MgSO ₄ × 7 H ₂ O/ml)	1% (v/v)
20% (w/v) Glucose	1% (v/v)

Mit LB-Medium auf gewünschtes Volumen auffüllen und sterilfiltrieren.

Lösung 2

Glycerol	36% (v/v)
1 M MgSO ₄	1,2% (v/v)
PEG (7500)	12% (w/v)

Mit LB-Medium auf gewünschtes Volumen auffüllen und sterilfiltrieren.

C.8.5.1.2 Durchführung

- *E. coli* Übernachtskultur 1:100 in frischer Lösung 1 (50 ml) verdünnen.
- Bei 37 °C und 190 rpm bis OD₆₀₀ 0,5 (80-90 Klett) wachsen lassen (ca. 3 h).
- Für 10 min bei 4 °C inkubieren.
- Für 10 min bei etwa 1200 rcf und 4 °C abzentrifugieren.
- Pellet in 0,5 ml von Lösung 1 suspendieren, dann 2,5 ml von Lösung 2 hinzugeben, aliquotieren und bei -80 °C aufbewahren.

C.8.5.2 elektrokompetente Listerien

C.8.5.2.1 Reagenzien

SMHEM	c _n	c _{v/m}
Saccharose (342,3 g/mol)	952 mM	32,6% (w/v)
MgCl ₂ (203,3 g/mol)	3,5 mM	0,071% (w/v)
HEPES (238,3 g/mol)	7,0 mM	0,17% (w/v)

Auf pH 7,2 einstellen, mit dH₂O auf gewünschtes Volumen auffüllen und sterilfiltrieren.

C.8.5.2.2 Durchführung

- Übernachtskultur der Listerien 1:50 in BHI (50 ml) mit 0,1 bis 0,2% (w/v) Glycin verdünnen.
- Bei 37 °C und 190 rpm bis OD₆₀₀ 0,5 (80-90 Klett) wachsen lassen.
- Penicillin G (siehe C.6.2) mit einer Endkonzentration von 5 µg/ml hinzugeben und bis OD₆₀₀ 0,65 (110-120 Klett) weiter wachsen lassen.
- Für 10 min bei etwa 1200 rcf und 4 °C abzentrifugieren.

- Bakterien in etwa 5 ml (1/10 Kulturvolumen) SMHEM waschen.
- Gewaschenes Bakterienpellet in 0,5 ml (1/100 Kulturvolumen) SMHEM aufnehmen, zu je 100 μ l aliquotieren und bei -80 °C aufbewahren.

C.8.6 Restriktionsverdau

Etwa 3 μ g DNA (ds) werden zusammen mit 1 μ l Restriktionsenzym und 2 μ l passendem Puffer (10 \times) in einem Gesamtvolumen von 20 μ l bei 37 °C für 2 h inkubiert.

Danach wird die DNA mit einem PCR-Reinigungskit (Qiagen) gereinigt und/oder Enzyme mittels Hitze inaktiviert (die Behandlung ist abhängig von den verwendeten Restriktionsenzymen).

Erfahrungsgemäß verbleiben von der eingesetzten DNA nach zwei aufeinander folgenden Restriktionen und Reinigungen (Elution der ersten Reinigung mit 18 μ l, zweite Elution mit 20 bis 30 μ l) etwa 30 bis 50%.

C.8.7 Ligation

	blunt end	sticky end
Volumen	20 μ l	20 μ l
Insert : Vektor	3:1	3:1
Vektor-Enden (fmol)	15-60	3-30
Insert-Enden (fmol)	45-180	9-90
DNA gesamt (I+V in μ g)	0,1-1	0,01-0,1
T4 Ligase	1 U	0,1 U

Inkubation bei 16 °C über Nacht oder bei Raumtemperatur für 1h.

1 μ g doppelsträngige DNA (1 kb) entspricht 1500 fmol (1,5 pmol).

1 fmol doppelsträngige DNA (1 kb) hat eine Masse von 0,65 ng.

$M_{1kb} = 650000$ g/mol

$M_{dsDNA} = 650$ g/mol \times #bp

C.8.8 Transformation

Mit Hilfe der Transformation wird Plasmid-DNA in speziell vorbereitete – sog. "kompetente" – Bakterien transferiert. Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte dies nach folgenden Protokollen:

C.8.8.1 Transformation in chemisch kompetente *E. coli*

- Etwa 100 μ l der bei -80 °C gelagerten kompetenten Zellen (Herstellung beschrieben unter C.8.5.1) auf Eis auftauen.
- Die kompetenten Zellen und den fertig reagierten Ligationsmix (siehe C.8.7) bzw. etwa 10 bis 100 ng Plasmid-DNA mischen und für etwa 30 bis 60 min auf Eis inkubieren.
- Den Ansatz für 90 s bei 42 °C inkubieren und anschließend sofort wieder für 2 min auf Eis stellen.
- 800 μ l LB-Medium hinzugeben und für 1h (6h, wenn das Plasmid Erythromycinresistenz verleihen soll) unter Schütteln bei 37 °C inkubieren.
- Bakterien auf LB-Agar-Platte mit Antibiotika ausplattieren und entsprechend inkubieren.

C.8.8.2 Elektroporation in elektrokompetente Listerien

- Etwa 100 μ l der bei -80 °C gelagerten kompetenten Zellen (Herstellung beschrieben unter C.8.5.2) auf Eis auftauen.
- Die kompetenten Zellen und etwa 1 μ g Plasmid-DNA (maximal 4 μ l) mischen und in einer Elektroporationsküvette (PEQLAB Electroporation Cuvette) auf Eis inkubieren.
- Ansatz in einem MicroPulser™ (Bio-Rad) für ca. 3,5 ms einer Spannung von 2,25 kV aussetzen und anschließend sofort 800 μ l BHI-Medium hinzugeben.
- Bakterien für 1h (6h, wenn das Plasmid Erythromycinresistenz verleihen soll) unter Schütteln bei 37 °C inkubieren.
- Bakterien auf BHI-Agar-Platte mit Antibiotika ausplattieren und entsprechend inkubieren.

C.8.9 DNA/RNA-Messung

Die Konzentration von Nukleinsäuren wird über die Messung der optischen Dichte oder Extinktion (E_λ) bestimmt. Nukleinsäuren absorbieren im UV-Bereich mit einem Absorptionsmaximum bei 260 nm. Reine doppelsträngige DNA zeigt ein Absorptionsspektrum, bei dem der Quotient (die Ratio R) E_{260} / E_{280} bei 1,8 liegt.

Da Proteine u. a. bei 280 nm absorbieren, ist eine kleinere Ratio ein Zeichen für eine mit Proteinen kontaminierte Probe. Die Ratio E_{260} / E_{280} für RNA sollte 2,1 sein. Da weder Proteine noch Nukleinsäuren bei 320 nm absorbieren, kann die gemessene Extinktion bei dieser Wellenlänge von den beiden anderen gemessenen Extinktionen abgezogen werden, wodurch Fehler, welche auf die Absorption von Lösungs-/Pufferbestandteilen zurückzuführen sind, minimiert werden (siehe auch C.10.5).

E_λ = Extinktion bei Wellenlänge λ (in nm), c = Konzentration, ϵ = spezifischer Extinktionskoeffizient, d = Schichtdicke der gemessenen Lösung

$$c = (E_{260} - E_{320}) \epsilon d$$
$$R = (E_{260} - E_{320}) / (E_{280} - E_{320})$$

$\epsilon_{\text{dsDNA}} = 50 \mu\text{g} / (\text{ml} \times \text{cm})$, für doppelsträngige DNA

$\epsilon_{\text{RNA}} = 40 \mu\text{g} / (\text{ml} \times \text{cm})$, für doppelsträngige DNA

C.8.10 DNA-Reinigung mit Phenol/Chloroform

Hinweise: unter dem Abzug arbeiten und Entsorgungsvorschriften für Phenol und Chloroform beachten!

- Ein Volumen Phenol zur DNA-Lösung zugeben, durchmischen und zentrifugieren.
- Die obere, wässrige Phase abziehen und in ein neues Cap überführen; das Phenol der unteren Phase verwerfen.
- Ein halbes Volumen Phenol, sowie ein halbes Volumen Chloroform zugeben, schütteln und zentrifugieren.
- Die obere, wässrige Phase abziehen und in ein neues Cap überführen; das Phenol/Chloroform der unteren Phase verwerfen.
- Ein Volumen Chloroform zur DNA-Lösung zugeben, schütteln und zentrifugieren.
- Die obere, wässrige Phase abziehen und in ein neues Cap überführen; das Chloroform der unteren Phase verwerfen.

C.8.11 DNA-Präzipitation

2,5 Volumen (kaltes,) reines Ethanol und ein Zehntel Volumen 3M Natriumazetat (pH 4,8) zur DNA/RNA-Lösung hinzugeben und eine halbe Stunde bei 4 °C und 20000 rcf abzentrifugieren. Pellet ein- oder zweimal mit 70% (v/v) Ethanol waschen (20000 rcf, 5 Minuten, 4 °C). Anschließend das Pellet in der SpeedVac® trocknen und in dH₂O aufnehmen.

C.8.12 Mutagenese durch homologe Rekombination

Die Mutagenese durch homologe Rekombination ist eine etablierte Methode, um mit Hilfe eines speziellen Vektors Deletions- oder Insertionsmutanten herzustellen, bzw. chromosomale Genabschnitte auszutauschen. Dieser Vektor verleiht Antibiotikaresistenz und kann aufgrund seines temperatursensitiven Origins in grampositiven Bakterien bei Temperaturen deutlich über 30 °C nicht extrachromosomal replizieren. Wird der Vektor mit Sequenzen ausgestattet, die zum Genom des zu mutierenden Bakteriums homolog sind, so kann eine Integration des Vektors ins bakterielle Chromosom erfolgen. Die so entstandenen Mutanten können bei 37 °C unter Selektionsdruck des entsprechenden Antibiotikums identifiziert werden.

Für die homologe Rekombination benötigt man Sequenzen von mindestens 100 bp, besser jedoch 300 bis 500 bp. Je größer dieser Bereich, desto wahrscheinlicher ist das Ereignis der homologen Rekombination (siehe auch Abbildung 9).

C.8.12.1 Durchführung

- Zunächst wird die veränderte Gensequenz, flankiert von ausreichend langen homologen Bereichen, über die multiple cloning site (MCS) in pLSV101 kloniert. In *E. coli* DH5 α kann der Vektor bei 37 °C in Gegenwart von 300 mg/l Erythromycin amplifiziert werden.
- Der entstandene Mutagenesevektor wird in elektrokompente Listerien (siehe C.8.5.2) transformiert (siehe C.8.8.2), auf Selektivplatten (BHI-Medium, 5-10 mg/l Erythromycin) ausplattiert und bei 30 °C inkubiert.
- Nach 3 bis 5 Tagen wird von einem Klon eine Flüssigkultur (BHI-Medium, 5-10 mg/l Erythromycin) angelegt und über Nacht bei 30 °C inkubiert.
- Die ÜN-Kultur wird auf vorgewärmte BHI-Platten (mit 5-10 mg/l Erythromycin) in den Verdünnungsstufen 10⁻² bis 10⁻⁵ ausplattiert und mindestens 3 Tage lang bei 42°C inkubiert.

- Die Integration des Plasmids in das Chromosom wird mittels PCR überprüft.
- Positive Klone werden in BHI ohne Antibiotikum subkultiviert. Das heißt für mehrere Tage wird eine Flüssigkultur in später Wachstumsphase immer wieder stark verdünnt.
- Nach einigen Tagen werden von dieser Kultur (in später Wachstumsphase, ÜN-Kultur) Verdünnungsstufen 10^{-5} bis 10^{-7} auf BHI-Platten ohne Antibiotikum ausplattiert.
- Klone werden unterscheidbar/identifizierbar parallel auf BHI-Platten mit und ohne Antibiotikum transferiert.
- Antibiotikasensitive Klone werden per PCR getestet und im positiven Falle der entsprechende Genort sequenziert.

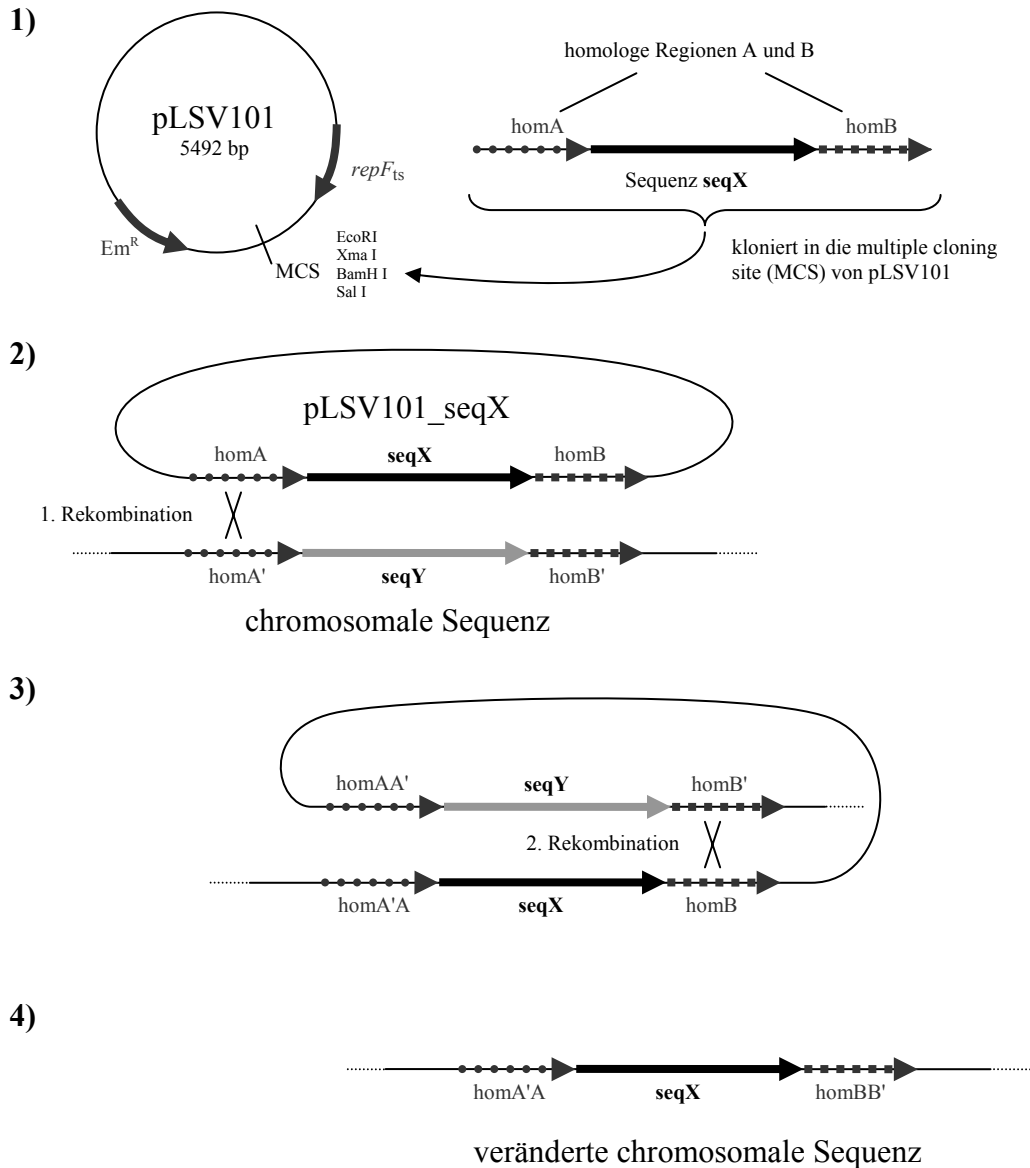


Abbildung 9. Schematische Darstellung der Mutagenese durch homologe Rekombination mit Hilfe des Vektors pLSV101. 1) Die veränderte Sequenz X (z.B. eine in-frame verkürzte codierende Sequenz für Deletionen, oder ein alternatives Allel) wird mit flankierenden, zum Zielort im Genom homologen, Bereichen (homA und homB) in den Vektor pLSV101 kloniert. 2) Der Vektor wird durch homologe Rekombination über eine der beiden homologen Bereiche (in dieser Abbildung beispielsweise homA/homA') in das Chromosom integriert. Bei nicht permissiver Temperatur (42 °C) kann der Vektor in grampositiven Bakterien extrachromosomal nicht repliziert werden, und nur Bakterien mit chromosomal integriertem Vektor behalten die Antibiotikaresistenz. 3) Findet ein zweites Rekombinationsereignis über den jeweilig anderen homologen Bereich (in dieser Abbildung homB/homB') statt, so wird der Vektor aus dem Chromosom herausgeschnitten. Das Bakterium verliert dabei seine Antibiotikaresistenz. 4) Antibiotikasensitive Klone besitzen chromosomal nun entweder die gewünschte veränderte Sequenz (wie in der Abbildung), oder sind zur ursprünglichen Form revertiert, wenn die homologe Rekombination zweimal über denselben Bereich stattgefunden hat.

C.9 DNA Sequenzierung

C.9.1 Automatische Sequenzierung

DNA Sequenzierung wurde mit einem automatischen Sequenziergerät (Beckman Coulter) durchgeführt. Hierzu wurde zunächst eine PCR-Reaktion in Gegenwart von verschiedenen mit Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelten Didesoxynukleotiden durchgeführt, welche von dem Gerät mit einem Laser detektiert werden können. Für eine solche PCR wurden ca. 200 bis 1000 ng Template mit 5 pmol Primer in einem Gesamtvolumen von 16 μ l zusammen mit 4 μ l QSM (Quick Start Mix aus dem CEQ Dye Terminator Cycle Sequencing Kit von Beckman Coulter; enthält (markierte Di-)Desoxynukleotide, Polymerase,) verwendet. Die Bedingungen für diese PCR waren wie folgt:

initiale Denaturierung (nur bei großen Templates)	96 °C	3 min	} 30 Zyklen (ohne QSM, dieses wurde erst anschließend hinzu pipettiert)
Denaturierung	96 °C	20 s	
Annealing	50 °C	20 s	
Elongation	60 °C	4 min	
finale Elongation	-	-	
Kühlen	4 °C	∞	

Das Produkt wurde dann nach den Empfehlungen des Herstellers mit Natriumazetat und Ethanol gefällt, gewaschen, anschließend getrocknet und in Formamid aufgenommen. Die so aufbereitete Probe wurde bis zur automatischen Sequenzierung im Kühlschrank aufbewahrt.

C.9.2 Sequenzierung mit T7 Sequencing Kit

Diese Methode (im Wesentlichen die ursprüngliche "Didesoxymethode" von Frederick Sanger) wurde in dieser Arbeit ausschließlich im Zusammenhang mit der Primer Extension verwendet (siehe C.22).

Es wurde folgendes Protokoll verwendet, kursiv geschriebene Substanzen stammen aus dem T7 Sequencing Kit (USB Corporation, Cleveland, Ohio):

C.9.2.1 Denaturierung und Präzipitation der Template DNA

- 2 μ g zirkuläre Plasmid DNA werden mit 400 mM NaOH für 10 min bei Raumtemperatur in einem Volumen von 40 μ l denaturiert.
- Dann werden 7 μ l 3M Natriumazetat (pH 4,8) und 120 μ l absolutes Ethanol zugegeben und die DNA über Nacht bei -20 °C präzipitiert (oder auf Trockeneis für mindestens 15 Minuten).
- Die Probe wird 15 min zentrifugiert (20000 rcf), das Pellet mit 70% EtOH waschen und anschließend getrocknet.

C.9.2.2 Primer Annealing

- Die DNA wird in 10 μ l gelöst, und nach Zugabe von 2 μ l Primer (5 bis 10 pmol) und 2 μ l *Annealing Buffer* für 5 min bei 65 °C inkubiert.
- Sofort danach wird die Probe bei 37 °C für 10 min inkubiert.
- Nach einer Inkubation bei RT für mindestens 5 Minuten wird die Probe kurz abzentrifugiert.

C.9.2.3 Sequenzierung

- Die 14 μ l Template + Primer werden mit 3 μ l *Labeling Mix-dATP*, 2 μ l α -³³P-dATP (10 μ Ci/ μ l, \geq 2500 Ci/mmol) und 2 μ l verdünnter *T7 DNA Polymerase* (1 μ l Polymerase + 4 μ l *Enzyme Dilution Buffer*) gemischt und bei RT 5 min inkubiert.
- Inzwischen werden vier Reaktionsgefäße mit jeweils 2,5 μ l *A Mix-Short*, *C Mix-Short*, *G Mix-Short* und *T Mix-Short* bei 37 °C vorgewärmt.
- Zu jedem der vier Gefäße werden 4,5 μ l der markierten Probe gegeben, die Proben werden gemischt und 5 min bei 37 °C inkubiert.
- In jedes Gefäß werden jeweils 5 μ l *Stop Solution* pipettiert und die Proben bis zur Beladung des Gels auf Eis aufbewahrt.
- Kurz vor der Beladung des Gels werden hierfür 4 μ l der Proben für 2 min bei 75-80 °C erhitzt und auf das Gel aufgetragen.

C.10 Proteinreinigung mittels His-Tag und Ni-NTA-Agarose

Zur Proteinaufreinigung wurde in dieser Arbeit unter anderem das System des *QIAexpressionist* von Qiagen verwendet. Dieses Aufreinigungssystem macht sich die Eigenschaft von Histidinresten zunutze Nickel-Ionen chelieren zu können. Nitrilotriessigsäure (nitrilotriacetic acid, NTA) besitzt ebenfalls diese Eigenschaft. NTA okkupiert vier von sechs möglichen Bindestellen des Ni²⁺-Ions, die zwei verbleibenden Bindestellen können von zwei benachbarten Histidinresten eines Proteins besetzt werden. Die Kopplung von NTA an eine feste Matrix ermöglicht es, ein mit Histidinresten markiertes Protein selektiv in einem Proteingemisch zu binden und mechanisch von unerwünschten Kontaminanten zu trennen. Eine Elution des Proteins von der NTA-Matrix kann mit Imidazol, das als Histidinanalogon fungiert, erfolgen.

C.10.1 Liste der isolierten His₆-markierten Proteine

Die verwendeten Primer und Templates zur Herstellung der pQE-Vektoren sind in C.3 und C.4.1 aufgelistet.

Protein	pQE-Vektor in <i>E. coli</i> M15	Konzentration und Aufbewahrungspuffer
InlA	pQE30_ <i>inlA</i>	4,3 g/l in 2×PBS
InlB	pQE30_ <i>inlB</i>	2 g/l in PBS
InlC	pQE_ <i>inlC</i> (Fredri Engelbrecht)	9,6 g/l in PBS, 500 mM NaCl, 50% Glycerol
InlE	pQE30_ <i>inlE</i>	2 g/l in PBS
InlG	pQE30_ <i>inlG</i>	2 g/l in PBS
InlH	pQE30_ <i>inlH</i>	3,2 g/l in PBS
i-InlA	pQE30_ <i>i-inlA</i>	nicht aufgereinigt
i-InlC	pQE60_ <i>i-inlC</i>	nicht aufgereinigt
i-InlD	pQE60_ <i>i-inlD</i>	nicht aufgereinigt
i-InlE	pQE60_ <i>i-inlE</i>	4,6 g/l in 3×PBS
i-InlH	pQE60_ <i>i-inlH</i>	nicht aufgereinigt
IPF929.1	pQE60_ <i>i-929</i>	nicht aufgereinigt
m-PrfA	pQE-30/5' <i>prfA</i> (Regine Böckmann)	1 g/l in 50 mM Tris (pH 8,0), 150 mM NaCl, 2,5 mM CaCl ₂ , 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 20% (v/v) Glycerol
s-PrfA	pQE30_ <i>s-prfA</i>	dto.
sm-PrfA	pQE30_ <i>sm-prfA</i>	dto.

C.10.2 Klonierung

Zunächst wird die kodierende DNA-Sequenz für das gewünschte Protein (ohne Signalpeptid, wenn vorhanden) im richtigen Frame in die MCS (multiple cloning site) eines pQE-Vektors kloniert. Das Konstrukt kodiert nun für ein rekombinantes Fusionsprotein, das an seinem N- oder C-Terminus (je nach verwendetem Vektor) sechs Histidinreste (His₆-Tag) besitzt. Das Konstrukt wird in *E. coli* M15 transformiert.

C.10.3 Aufreinigung

Die hier genannten Puffer wurden bei der Aufreinigung aller Internalin Fusionsproteine verwendet. Die Aufreinigung der verschiedenen PrfA Proteine folgte nahezu dem gleichen Prozedere, jedoch wurden andere Puffer verwendet (Böckmann *et al.*, 1996).

C.10.3.1 Material

- **HisTrap™ HP** Säulchen, 1 ml (Amersham Biosciences)
- **Dialyseschlauch**, MWCO 14000 Da
- **Probenpuffer** (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, pH 8,0)
- **Elutionspuffer** (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 250 mM Imidazol, pH 8,0)
- **Dialysepuffer** (z.B. PBS, x-fach PBS, PBS mit mehr NaCl, usw. siehe C.10.1)
- 1 M **IPTG** (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid; 2,38 g IPTG in 10 ml dH₂O lösen, Aufbewahrung bei -20 °C)
- 0,1 M **PMSF** in EtOH, immer erst kurz vor Gebrauch hinzugeben; ersatzweise eine kommerzielle Mischung von Proteinasen (Complete Mini, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail Tablets; Roche)

C.10.3.2 Durchführung

- 100 ml einer Übernachtskultur der *E. coli* M15 werden zu 900 ml vorgewärmten 2YT (C.6) in Erlenmeyerkolben gegeben und unter Schütteln bei 37 °C bis zu OD₆₀₀ 0,6 bis 1,0 kultiviert.
- Nun wird durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration 1 mM) die Überproduktion des Fusionsproteins induziert und die Kultur für etwa 3 Stunden weitergeschüttelt.
- Die Kultur wird bei 11000 rcf und 4 °C für 10 min zentrifugiert. Die Pellets werden dann in etwa 20 ml PBS resuspendiert und erneut abzentrifugiert. Das PBS wird verworfen und die Pellets bei -80 °C eingefroren.
- Die Bakterienpellets werden auf Eis aufgetaut und in 6 ml Probenpuffer (mit 50 µM PMSF) resuspendiert. Die Suspension wird mit Probenpuffer auf ein Volumen von 10 ml aufgefüllt.
- Die Bakterien werden mit einer French Press (Simpson *et al.*, 1963) bei etwa 60 bis 70 bar lysiert, und anschließend die Zelltrümmer bei 14000 rcf und 4 °C für 30 min abzentrifugiert.
- Der Überstand wird filtriert (0,45 µm), um ihn für die ÄKTAprime (C.10.4) vorzubereiten.
- An die ÄKTAprime wird Probenpuffer als Puffer A und Elutionspuffer als Puffer B angeschlossen. Die allgemeine Flussrate beträgt 1,0 ml/min.
 - Die HisTrap™ HP Säule wird mit 10 ml Probenpuffer äquilibriert.
 - Die Probe wird über die Säule geschickt (30 ml, 0 %B).
 - Die Säule wird bei 22 mM Imidazol gewaschen, bis die OD₂₈₀ wieder das Basislevel erreicht hat (100+ ml, 5 %B).
 - In einem linearen Gradienten von 22 bis 250 mM Imidazol und anschließend 250 mM Imidazol werden die Proteine eluiert (20 ml, 22 bis 100 %B, dann 20 ml 100 %B) und die Fraktionen gesammelt.
 - Die Säule wird mit dH₂O und anschließend 20% (v/v) EtOH gewaschen.
- Die Fraktionen werden in einer SDS-PAGE (C.13) mit Coomassie Färbung (C.14.1) auf Reinheit und Ausbeute überprüft.
- Die geeigneten Fraktionen werden vereinigt und gegen den Dialysepuffer dialysiert.
- Nachdem die Proteinkonzentration bestimmt wurde (siehe C.10.5), wird die Proteinlösung aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

C.10.4 ÄKTAprime

Die ÄKTAprime von Amersham Biosciences erlaubt die Automatisierung und Dokumentation von verschiedensten chromatographischen Verfahren. Für viele Applikationen wie Aufreinigung von His₆-markierten oder GST-markierten Proteinen, Ionenaustausch, Entsalzung, etc. sind bereits Programme vorhanden (siehe Abbildung 10).

C.10.5 Photometrische Proteinkonzentrationsbestimmung

Proteinlösungen besitzen im Allgemeinen bei ca. 230 und 280 nm Wellenlänge Absorptionsmaxima, die auf das Vorhandensein bestimmter Aminosäurereste zurückgeführt werden können. Liegt ein reines Protein in Lösung vor und ist dessen spezifischer Extinktionskoeffizient (der u. a. von der Aminosäurekomposition des Proteins abhängt) bekannt, so kann aus der gemessenen Absorption/Extinktion die Proteinkonzentration in der Lösung errechnet werden. Die Absorption bei 230 nm ist stärker, doch stören hier häufig andere Substanzen, die sich in vielen Puffern befinden, und so wird die Konzentrationsmessung meist bei 280 nm durchgeführt.

C.10.5.1 Größen

I_0 = (ausgesendete) Lichtintensität vor Durchquerung der Probe

I = (gemessene) Lichtintensität nach Durchquerung der Probe

T = Transmission (I/I_0)

E = Extinktion ($-\log T$, negativ dekadischer Logarithmus der Transmission)

ϵ = Extinktionskoeffizient

c = Konzentration

d = Strecke, die das Messlicht durch die Probe zurücklegt

C.10.5.2 Formeln

$E = \epsilon cd$

$c = E/(\epsilon d)$

Abbildung 10. Skizze der ÄKTAprime und schematische Darstellung der einzelnen Komponenten. Grafik aus dem Handbuch des Herstellers.

Buffer Valve: hier können außer Puffer A noch bis zu sieben weitere Lösungen angeschlossen werden.

Gradient switch valve: mixt je nach Einstellung des Parameters "%B" durch alternierende Ventilöffnung eine heterogen Mischung aus den Puffern A und B, die dann im *Mixer* homogenisiert wird.

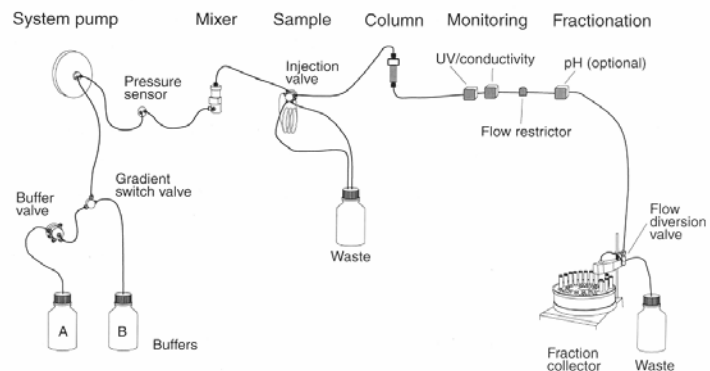
Injection Valve: hier wird entschieden, ob die Puffer von der *System pump* durch einen angeschlossenen Loop geschickt werden, oder nicht. In diesem Loop wird gewöhnlich vorher eine Probe geladen.

UV/conductivity: Daten wie die OD_{280} und die Leitfähigkeit des Flusses können gemessen und an einen Schreiber weitergeleitet werden.



Comment:

The flow path between the different components in the system is shown and described below.



C.10.5.3 Abschätzung des Extinktionskoeffizienten von Proteinen in wässriger Lösung

$$\epsilon_{\text{theoretisch}} = (n_W \times 5690 + n_Y \times 1280 + n_{SS} \times 120) \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

$$\epsilon_{\text{nativ}} = (E_{\text{nativ}}/E_{\text{denaturiert}}) \times \epsilon_{\text{theoretisch}}$$

n_W = Anzahl der Tryptophanreste im Protein

n_Y = Anzahl der Tyrosinreste im Protein

n_{SS} = Anzahl der Schwefelbrücken über Cysteinreste

C.10.5.4 Internettool zur Berechnung vieler Proteinparameter

<http://www.expasy.org/tools/protparam.html>

C.11 Präparation von listeriellen Proteinen

Die Listerien werden unter den gewünschten Bedingungen (Medium, Temperatur, Luftzufuhr, etc.) zu einer bestimmten Zelldichte kultiviert und bei 4 °C und 5000 ref für 5 bis 10 Minuten abzentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen und gesondert präpariert (siehe C.11.3). Das Bakterienpellet wird weiter verarbeitet, um die zellwandassoziierten (siehe C.11.1) und/oder die zytosolischen Proteine (siehe C.11.2) zu präparieren.

C.11.1 Zellwandassoziierte Proteine

Das Bakterienpellet wird in 5× Probenpuffer (C.13.1) aufgenommen und für 15 bis 20 min bei 95 °C inkubiert. Anschließend wird die Suspension bei 20000 ref abzentrifugiert und der Probenpuffer mit den darin enthaltenen Proteinen vom Pellet möglichst vollständig abgenommen, und kann anschließend direkt in einer SDS-PAGE (C.13) verwendet werden.

Diese Methode ist nur geeignet, wenn die genaue Quantität der Proteine für den Versuch nicht entscheidend ist. Damit die Proteinmengen jedoch ungefähr angeglichen werden können, wird die Menge an Bakterien, die im Volumen des Probenpuffers behandelt wurde, als Maß herangezogen. Die Bakterienmenge wird hierbei in ODml gemessen, also dem Produkt aus der gemessenen optischen Dichte OD_{600} der Kultur und deren Volumen. Für die meisten Anwendungen (Immunoblot) sind 0,5 bis 4 ODml pro Spur ausreichend.

C.11.2 Zytosolische Proteine

Das Bakterienpellet wird in PBS gewaschen, in kaltem Lysispuffer (PBS mit Complete Mini, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail Tablets; Roche) resuspendiert und in 2 ml BLUE TUBES (Q-Biogene) mit Glaskügelchen überführt. Die Proben werden dann in einem FastPrep™ FP120 Gerät (Savant Instruments, Inc.) sechsmal für jeweils 30 Sekunden auf Geschwindigkeitsstufe 6,5 geschüttelt. Anschließend werden die Zelltrümmer durch Zentrifugation bei 4 °C und 20000 rcf für 30 min sedimentiert und der Überstand mit den zytosolischen Proteinen abgenommen. Die Proteinkonzentration wird mittels Bradford-Methode (Bio-Rad-Protein Microassay, BioRad) bestimmt.

C.11.3 Überstandsproteine

Kulturüberstände werden mit 10% TCA (Trichloressigsäure, Endkonzentration) auf Eis für mindestens 20 min (auch über Nacht) präzipitiert und anschließend bei 5000 rcf für 10 bis 15 Minuten abzentrifugiert. Der Überstand wird abgezogen und das Präzipitat mehrmals mit Aceton gewaschen. Das Pellet wird danach bei 37 °C und mit offenem Probenbehälter an der Luft getrocknet, anschließend in Probenpuffer (C.13.1) aufgenommen und bei 95 °C für 5 Minuten inkubiert.

Auch hier gilt das in C.11.1 zur Quantifizierung Gesagte. Die Kulturüberstände können auf die darin vormals enthaltene Bakterienmenge in ODml bezogen werden.

C.12 Photometrischer Hämolyseassay

Der Hämolyseassay dient der Bestimmung der hämolytischen Aktivität von bakteriellen Kulturüberständen. Im Falle von *Listeria monocytogenes*, dessen hämolytische Aktivität durch Listeriolysin O (kodiert von *hly*) bestimmt wird, kann durch den Assay die Expression von *hly* gemessen werden.

C.12.1.1 Vorbereitung der Erythrozytensuspension

Zunächst wird frisches Pferdeblut (oder Schafsblut) mehrmals mit kalter Saline (0,9% (w/v) NaCl) gewaschen (Zentrifugationen mit 500 rcf für 2 Minuten), bis der Überstand kein sichtbares Hämoglobin mehr enthält. Die Erythrozyten aus 1 ml Blut (50% Hämatokrit) werden in 25 ml Saline aufgenommen (2% Erythrozytensuspension). Die Suspension wird bis zur Verwendung bei 4 °C aufbewahrt.

C.12.1.2 Durchführung des Assays

Bakterielle Kulturüberstände (je 5 bis 40 µl) bzw. reines Medium als Negativkontrolle werden mit 2% Erythrozytensuspension in einem Gesamtvolumen von je 1 ml für 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend werden die Proben abzentrifugiert (500 rcf) und die Absorption der Überstände durch frei gewordenenes Hämoglobin bei 543 nm photometrisch gemessen (Ultraspec 2100 pro Photometer, Amersham). Aufgrund relativ hoher Schwankungen empfiehlt es sich, jeden Kulturüberstand in drei bis vier getrennten Proben zu messen, oder mehrfache Probenreihen mit Konzentrationsgradienten herzustellen.

C.13 Polyacrylamid Gelelektrophorese (PAGE)

C.13.1 Material

- **30% Acrylamidlösung** (Rotiphorese® Gel 30 von Roth, enthält 30% (w/v) Acrylamid und 0,8% (w/v) Bisacrylamid)
- **1 M Tris/Cl pH 6,8**
- **2 M Tris/Cl pH 8,8**
- **10× Elektrophoresepuffer** (144 g/l Glycin, 30 g/l Tris Base, 10 g/l SDS)
- 10% (w/v) SDS
- 1% (w/v) Bromphenolblau (durch Faltenfilter filtriert)
- Glycerol (50% (v/v))
- **5× Probenpuffer** (60 mM Tris/Cl pH 6,8, 25% (v/v) Glycerol, 2% (w/v) SDS, 0,09% (w/v) Bromphenolblau, [5% (v/v) β-Mercaptoethanol]; (Laemmli, 1970))
- 10% (w/v) Ammoniumpersulfat (**APS**, auch Ammoniumperoxidisulfat), aliquotiert und bei -20 °C aufbewahrt

C.13.2 Herstellung von Trenn- und Sammelgel

Für zwei 12 %ige Mini-Trenngele werden 14 ml wie folgt angesetzt:

	Volumen
30% Acrylamidlösung	5,6 ml
2 M Tris/Cl pH 8,8	2,6 ml
10% SDS	140 µl
APS	70 µl
dH₂O	ad 14 ml

Diese Komponenten werden durch mehrmaliges Invertieren gemischt, und kurz vor dem Gießen die Polymerisation eingeleitet mit:

TEMED	7 µl
--------------	------

Die Mischung wird nochmals mehrfach invertiert und in die vorbereiteten Formen gegossen.

Um eine gleichförmige, gerade Oberfläche zu erhalten, wird das noch flüssige Gemisch mit 70% (v/v) Ethanol überschichtet. Nach der vollständigen Polymerisation wird das Ethanol wieder abgegossen und das Sammelgel aufgetragen.

Für zwei 5 %ige Sammelgele werden 5 ml wie folgt angesetzt:

	Volumen
30% Acrylamidlösung	835 µl
1 M Tris/Cl pH 6,8	625 µl
10% SDS	50 µl
APS	37 µl
dH₂O	ad 5 ml

Diese Komponenten werden durch mehrmaliges Invertieren gemischt, und kurz vor dem Gießen die Polymerisation eingeleitet mit:

TEMED	6 µl
--------------	------

Die Mischung wird nochmals mehrfach invertiert und zügig auf die polymerisierten Trenngele gegossen. Dann werden die Käme für die Formung der Taschen (10 pro Gel) eingesteckt. Nach der vollständigen Polymerisation werden die Käme vorsichtig entfernt und die Taschen mit dH₂O ausgewaschen.

Die fertigen Gele werden in den Tank der Apparatur gestellt und dieser mit Elektrophoresepuffer (etwa 500 ml) befüllt, wie es für diese Apparatur nötig ist. Hierbei ist zu beachten, dass sich unter den Gelen keine Bläschen ansammeln, die das elektrische Feld später verformen könnten.

Nach der Beladung der Taschen mit den Proben wird die Spannungsquelle auf 25 mA pro Gel und 160 V eingestellt. Nach etwa einer Stunde hat die Lauffront das untere Fünftel des Trenngels erreicht.

C.14 Gelfärbung

C.14.1 Coomassie Färbung

Die Coomassie Färbung ist dazu geeignet Proteinbanden mit einer Masse ab 0,1 bis 2 µg nachzuweisen. Coomassie Brilliant Blue **R**-250 bindet unspezifisch an nahezu alle Proteine, ist gut wasserlöslich und dringt auch in dickere Gele ein. Coomassie Brilliant Blue **G**-250 ist von leuchtend blauer Farbe, weniger wasserlöslich, und wird als kolloidale Lösung verwendet. Es bindet weit besser an die Proteine als an die Gelmatrix, was zu einem besseren Kontrast und schnellerer Entfärbung führt, kann jedoch nicht so gut in dickere Gele eindringen, was dann die Sensitivität verringert.

C.14.1.1 Färben in Coomassie Färbelösung

	Menge für 1 Liter	Menge für 200 ml
Coomassie R250	2 g	0,4 g
Coomassie G250	0,5 g	0,1 g
Ethanol	500 ml	100 ml
Essigsäure	100 ml	20 ml
deionisiertes Wasser	400 ml	80 ml

Das Gel etwa 10 bis 60 Minuten in der **Coomassie Färbelösung** inkubieren, je nach Temperatur und Alter der Lösung. Die Lösung kann mehrmals verwendet werden, verliert aber nach und nach an Färbekraft.

C.14.1.2 Entfärben in Entfärbelösung I und II

Das Coomassie-gefärbte Gel wird in **Entfärber I** (10% (v/v) Essigsäure, 50% (v/v) Ethanol) so lange inkubiert bis die ersten Proteinbanden sichtbar werden, und dann in **Entfärber II** (7,5% (v/v) Essigsäure, 5% (v/v) Ethanol) zusammen mit Zell- oder Schaumstoffstücken (absorbieren Coomassie) inkubiert bis der Hintergrund entfärbt ist. Entfärber II kann mehrmals verwendet werden, so lange er selbst nicht zu stark gefärbt ist.

C.14.2 Silberfärbung

Die Silberfärbung ist 10- bis 100-mal sensitiver als die Färbung mit Coomassie und erreicht Nachweisgrenzen von unter 1 ng. Allerdings ist diese Färbung wesentlich aufwendiger. Sie beruht auf der Komplexbildung von Silberionen mit Aminosäureseitenketten, vor allem Sulfhydryl- und Carboxylgruppen, und deren anschließende Reduktion zu dunklem Silber. Auch Zucker lassen sich anfärben, was die Färbung von DNA und RNA ermöglicht.

Da die Silberfärbung sehr empfindlich ist, müssen sämtliche Behälter sehr sauber sein und es empfiehlt sich mit sauberen, puderfreien Handschuhen zu arbeiten.

C.14.2.1 Lösungen

- **Fixierer** (10% (v/v) Essigsäure, 50% (v/v) Ethanol), entspricht Entfärber I (C.14.1.2)
- **30% (v/v) Ethanol**
- **Stopplösung** (14,6 g/l Na₂-EDTA × H₂O), frisch ansetzen
- Natriumthiosulfatlösung (43% (w/v) Na₂S₂O₃ × 5 H₂O), Lösung im Kühlschrank aufbewahren
- Formalin (37-38% (w/v) Formaldehyd, 8-15% (v/v) Methanol)
- **Oxidierer** (0,05% (v/v) Natriumthiosulfatlösung, 0,07% (v/v) Formalin), frisch ansetzen
- **Silbernitratlösung** (2 g/l AgNO₃, 0,07% (v/v) Formalin), frisch ansetzen
- **Entwickler** (60 g/l Na₂CO₃, wasserfrei, 0,05% (v/v) Formalin, 0,002% (v/v) Natriumthiosulfatlösung), frisch ansetzen

C.14.2.2 Durchführung

Das Gel wird nacheinander unter sanftem Schwenken in folgenden Lösungen inkubiert:

- Fixierer, mindestens eine Stunde.
- 30% (v/v) Ethanol, zweimal für jeweils eine halbe Stunde.
- Oxidierer, genau 1 min, danach dreimal kurz mit dH₂O waschen.
- Silbernitratlösung, 1 h, danach zweimal kurz mit dH₂O waschen.
- Im Entwickler inkubieren und die Reaktion genau beobachten, dann rechtzeitig durch Stopplösung austauschen und das Gel darin eine Stunde belassen.
- dH₂O, eine Stunde

Das Gel kann nun in Plastik eingeschweißt oder auf Whatman-Papier getrocknet werden. Es empfiehlt sich jedoch es vorher mit einem Durchlichtscanner digital zu erfassen.

C.15 Western Blot

Mittels Western Blot werden Proteine aus einer PAGE (C.13) elektrophoretisch auf eine Nitrozellulosemembran überführt. Dort können sie dann z.B. durch markierte Antikörper, an der ein Enzym wie Meerrettich-Peroxidase oder alkalische Phosphatase gekoppelt ist, dekoriert werden (Immunoblot). Die gekoppelten Enzyme katalysieren dann beispielsweise Färbereaktionen oder Chemolumineszenz, die mit Hilfe eines Röntgenfilms oder speziellen Scannern detektiert werden kann.

Die hier vorgestellte Methode ist primär dafür gedacht Proteine aus einer SDS-PAGE zu transferieren. Für Gele mit anderen Pufferzusammensetzungen sind u. U. Anpassungen erforderlich.

C.15.1 Blotting

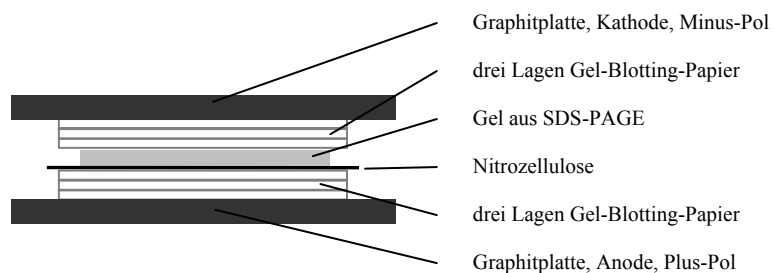
C.15.1.1 Material

- ein unfixiertes Gel aus einer soeben beendeten SDS-PAGE
- Nitrozellulose (Hybond™-ECL™, Amersham Biosciences)
- Gel-Blotting-Papier (Whatman® Schleicher und Schuell, GB003, 0,8 mm dick)
- Blot-Puffer (50 mM Tris, 40 mM Glycin, 0,037% (w/v) SDS, 20% (v/v) Ethanol)
- Blotkammer (z.B. von Biotec-Fischer) und Spannungsquelle

C.15.1.2 Durchführung

- Ein Blatt Nitrozellulose und sechs Blätter Gel-Blotting-Papier werden auf die Größe des Gels zurechtgeschnitten und im Blot-Puffer getränkt. Bei dünnerem Papier (GB002, 0,4 mm dick) ist jeweils die doppelte Anzahl zu verwenden. Die Komponenten müssen sehr sauber gehandhabt werden, um die Kontamination der Nitrozellulose mit Fremdproteinen, wie z.B. von Handschuhpulver, zu vermeiden.
- Drei Blatt Gel-Blotting-Papier und darauf die Nitrozellulose werden auf die Anode der Blotkammer gelegt.
- Das Gel muss nun möglichst ohne vorherige Berührung passend auf der Nitrozellulose platziert werden. Auf das Gel werden drei weitere Blatt Gel-Blotting-Papier gelegt und Luftblasen aus dem Stapel z.B. durch Darüberrollen mit einer Pasteurpipette entfernt.
- Die Blotkammer wird verschlossen und mit einem Gewicht (etwa 1 bis 2 kg) beschwert.

Abbildung 11. Schematische Darstellung des Aufbaus eines Western Blots.



- Nun wird für etwa 2 Stunden (abhängig von Geldicke und Proteingröße) eine Spannung angelegt, bei der ca. 1 mA Strom pro cm² Gelfläche fließen. Das eigentliche Blotting ist damit beendet.

Um den Transfer zu kontrollieren, können die Proteine auf der Nitrozellulose nun mit Ponceau S Rot gefärbt werden (Entfärben mit dH₂O und PBS plus 0,05% (v/v) Tween 20). Anschließend erfolgt das Blocken der Nitrozellulose mit 5% (w/v) Magermilchpulver in PBS, BSA- oder Kasein-Lösung, abhängig vom späteren Verwendungszweck des Blots, bei dem alle freien Stellen der Nitrozellulose mit Proteinen abgesättigt werden.

C.15.2 Dekoration und ECL

In dieser Arbeit wurden hauptsächlich zwei Methoden der Dekoration verwendet, die aber beide zum Ziel haben eine ECL (enhanced chemiluminescence) durchzuführen und dabei die Lichtemission mit einem Röntgenfilm zu dokumentieren. Bei der ersten Methode wird das geblottete Antigen mit einem spezifischen Antikörper detektiert, der wiederum von einem mit Meerrettich-Peroxidase (HRP) konjugierten Antikörper erkannt wird. Die zweite Methode detektiert biotinylierte Proteine mit Hilfe eines Streptavidin-HRP Konjugats. In beiden Fällen wird am Ende die ECL durch die HRP katalysiert.

C.15.2.1 Material

- **Blot**, Nitrozellulose mit Proteinproben (aus Western Blot, Dot Blot, etc.)
- **Erstantikörperlösung**: Antikörper oder Serum aus Spezies spec\$ gegen zu detektierendes Antigen in geeigneter Verdünnung (z.B. 1:1000) in geeignetem Verdünnungsmittel (z.B. 5% (w/v) Magermilchpulver in PBS)
- **Zweitantikörperlösung**: mit HRP konjugierte Antikörper gegen Antikörper der Spezies spec\$ in geeigneter Verdünnung (z.B. 1:10000) in geeignetem Verdünnungsmittel

- **Waschpuffer** (PBS mit 0,05% (v/v) Tween 20)
- **ECL Kit** (ECL plus Western Blotting Detection System, Amersham Biosciences)

C.15.2.2 Durchführung

- Die Nitrozellulose muss für etwa 15 min oder länger mit einem geeigneten Reagenz geblockt werden. Normalerweise ist 5% (w/v) Magermilchpulver in PBS eine gute und kostengünstige Wahl (Magermilchpulver eignet sich, da es zu viel Biotin enthält, z.B. nicht für Dekoration mit Streptavidin-HRP). Eine Alternative wäre 2% (w/v) BSA oder Kasein in PBS.
- Der geblockte Blot wird in der Erstantikörperlösung bei RT für ein bis zwei Stunden, oder bei 4 °C ÜN inkubiert. Die Lösung kann danach abgegossen und eingefroren werden, um sie später erneut zu verwenden. Dieser und der folgende Schritt entfallen bei der Dekoration mit Streptavidin-HRP.
- Der Blot wird dreimal für je 10 min in Waschpuffer gewaschen.
- Es folgt eine Inkubation in der Zweitantikörperlösung bzw. der Streptavidin-HRP Verdünnung für 45 min bei RT.
- Der Blot wird fünfmal für etwa 8 min in Waschpuffer gewaschen.
- Nun wird der Blot zwischen zwei saubere und etwas dickere Plastikfolien gelegt und mit den ECL Reagenzien nach Herstellerangaben behandelt. Die dort angegebenen Volumina sind jedoch meist äußerst großzügig; es genügt, wenn der Blot mit dem Reagenz gleichmäßig bedeckt ist (er muss nicht darin baden).
- Der Blot wird zusammen mit einem Röntgenfilm und einer Verstärkerfolie in eine Röntgenfilmkassette gelegt und je nach Stärke der Reaktion für etwa 3 s bis 1 h exponiert. Es empfiehlt sich mehrere Expositionszeiten auszuprobieren, um ein optimales Ergebnis zu erhalten.

Den Blot kann man anschließend in Waschpuffer waschen und einfrieren, um später eine weitere Dekoration an ihm vorzunehmen oder ihn dafür vorher zu stripfen (C.15.3).

C.15.3 Stripping

Durch das Strippen eines Western Blots kann eine Antikörperdekoration entfernt werden, um an demselben Blot eine andere Dekoration vorzunehmen. Da man jedoch damit rechnen muss, dass bei diesem Vorgang auch etwas von den geblohteten Proteinen verloren geht, kann diese Prozedur nicht beliebig häufig wiederholt werden. In dieser Arbeit wurden Blots höchstens *einmal* gestriipt.

C.15.3.1 Material

- dekoriertes Blot
- Stripping Buffer (2% (w/v) SDS, 63 mM Tris, pH 6,7), kurz vor Gebrauch 0,7% (v/v) β -Mercaptoethanol dazugeben (unter Abzug!)
- Heizbad

C.15.3.2 Durchführung

- Der Blot wird im Stripping Buffer bei 50-60 °C für ½ h inkubiert und gelegentlich geschwenkt.
- Danach empfiehlt es sich den Blot in PBS zu waschen und sicherheitshalber erneut geeignet zu blocken.

C.16 Beschichtung von MaxiSorp™ Mikrotiterplatten

MaxiSorp™ Mikrotiterplatten (NUNC, MaxiSorp™ High Protein-Binding Capacity ELISA plates) bestehen aus Polystyrol, das bei neutralem bis alkalischem pH unspezifisch mit Proteinen beladen werden kann (Coating). Dies ermöglicht eine Reihe von Anwendungen bei denen viele verschiedene Proben bei jeweils geringem Probenvolumen untersucht werden können, wie z.B. den Test von Klonüberständen gegen Antigene bei der Herstellung monoklonaler Antikörper, (Sandwich) ELISA Assays, Zelladhärenzassays usw.

C.16.1 Material

Es sollten Mehrkanalpipetten und Dispenser mit Mehrkanal-Pipettiereinheit (in beiden Fällen 8 oder 12 Kanäle) zur effizienteren Durchführung verwendet werden.

C.16.1.1 Coating Buffer

	c_n	c_m
NaHCO_3 (84,01 g/mol)	100 mM	8,4 g/l
NaCO_3 (105,99 g/mol)	33,6 mM	3,56 g/l

Der pH sollte 9,5 betragen, Aufbewahrung bei 4 °C.

C.16.1.2 Waschlösung

Die Waschlösung besteht entweder aus PBS mit 0,05% (v/v) Tween 20, oder aus reinem PBS, wenn kein Detergens erwünscht ist.

C.16.1.3 Blocking Solution

Je nach Art des geplanten Versuchs besteht die Blocking Solution z.B. aus PBS mit 10% (v/v) FCS (fötales Kälberserum), wenn z.B. Antikörper getestet werden sollen oder aus PBS mit 1% (w/v) BSA (bovines Serumalbumin), z.B. für Zelladhärenztests. Diese Lösungen sollten entweder frisch hergestellt oder bei -20 °C aufbewahrt werden.

C.16.2 Durchführung

Die Proteine werden im Coating Buffer in der gewünschten Konzentration (z.B. 2 µg/ml) verdünnt (die Bindekapazität der MaxiSorp™ Mikrotiterplatten beträgt etwa 650 ng/cm²). In jede Kavität werden 100 µl der Proteinverdünnung pipettiert. Die Mikrotiterplatte wird dann in Klarsichtfolie eingeschlagen und über Nacht bei 4 °C inkubiert.

Tags darauf wird die Proteinlösung restlos durch starkes Klopfen auf eine saugfähige Unterlage entfernt und jede Kavität mit mehr als 300 µl Waschlösung gewaschen. Dann wird jede Kavität mit 200 µl Blocking Solution befüllt, in Klarsichtfolie eingeschlagen und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Blocking Solution wird danach ausgewaschen und die beschichtete MaxiSorp™ Mikrotiterplatte ist bereit für den Versuch. Zwischenzeitliches Eintrocknen der Kavitäten sollte hierbei vermieden werden.

C.17 Hexosaminidase-Assay

Der Hexosaminidase-Assay nach Landegren (Landegren, 1984) erlaubt die Messung einer *Zellmenge*, die bei gleich gestalteten und gleichartigen Zellen zur deren *Anzahl* proportional ist. Hierzu werden die Zellen in einem Entwicklungspuffer durch das darin enthaltene Detergens lysiert, so dass die lysosomale Hexosaminidase frei wird. Dieses Enzym katalysiert die Abspaltung von p-Nitrophenol aus p-Nitrophenyl N-acetyl-β-D-Glucosaminid, dessen Konzentration durch die Messung der Absorption bei 405nm bestimmt werden kann. Die Absorption ist in einem gewissen Rahmen direkt proportional zur Menge der Zellen.

In dieser Arbeit wurde der Hexosaminidase-Assay durchgeführt, um die Adhärenz verschiedener humaner Zelllinien an gebundene Proteine zu untersuchen.

C.17.1 Material

C.17.1.1 Entwicklungspuffer

Zunächst 0,1 M Zitratpuffer pH 5,0 herstellen, indem man 0,1 M Kaliumzitratlösung und 0,1 M Zitronensäure etwa im Verhältnis vier zu eins mischt.

	c_n	c_m
K₃-Zitrat (Monohydrat) (324,4 g/mol)	0,1 M	32,4 g/l
Zitronensäure (Monohydrat) (210,14 g/mol)	0,1 M	21,0 g/l

Den pH-Wert durch entsprechendes Mischungsverhältnis auf 5,0 einstellen.

	c_n	c_m/c_v	Menge für 50 ml
p-Nitrophenyl N-acetyl-β-D-Glucosaminid (Sigma, N 9376)	7,5 mM	2,57 g/l	129 mg
Triton X 100		0,25% (v/v)	125 µl

In Zitratpuffer lösen und bis zur Verwendung bei -20 °C aufbewahren.

C.17.1.2 Stopppuffer

	c_n	c_m/c_v	Menge für 50 ml
Glycin (75,07 g/mol)	50 mM	3,75 g/l	188 mg
0,5 M Na-EDTA	5 mM	1% (v/v)	500 μ l

Den pH 10,4 mit NaOH einstellen und im Kühlschrank aufbewahren.

C.17.2 Durchführung

Zunächst werden die zu testenden Proteine über Nacht in unterschiedlicher Konzentration an MaxiSorp™ Mikrotiterplatten (96 Kavitäten) gebunden (Coating). Die Kavitäten werden dann mit PBS/Tween gewaschen, eine Stunde lang mit 1% (w/v) BSA in PBS geblockt und anschließend wieder gewaschen (siehe C.16).

Inzwischen werden die Zellen mit Trypsin/EDTA (Gibco, Trypsin-EDTA (1X), liquid - 0.05% Trypsin, 0.53 mM EDTA•4Na) aus ihren Kulturschalen abgelöst, in Medium (ohne FCS) suspendiert und die Zelldichte mikroskopisch in einer Zählkammer bestimmt. Die Zellen werden abzentrifugiert (100 \times g) und durch Suspension in Medium **ohne FCS**, aber mit 0,4% (w/v) BSA (bovines Serumalbumin), auf eine definierte Zelldichte eingestellt (z.B. 10⁶/ml).

Von dieser Zellsuspension werden je 100 μ l pro Kavität für ein bis zwei Stunden im Zellkulturbrutschrank inkubiert, die Mikrotiterplatte wird dabei mit Klarsichtfolie abgedeckt. Anschließend werden Medium und ungebundene Zellen abgeschüttet und die Kavitäten mit PBS gewaschen.

Anschließend werden 60 μ l Entwicklungspuffer in die Kavitäten gegeben und die Platte nochmals für ein bis zwei Stunden im Brutschrank inkubiert (Klarsichtfolie!). Die Länge der Inkubation muss je nach Stärke der Reaktion angepasst werden. Danach wird die Reaktion durch Zugabe von 100 μ l Stopppuffer beendet und die Extinktion bei 405 nm in einem ELISA Reader (Dynatech, MR 600 Microplate Reader) gemessen.

C.18 Herstellung von Antikörpern in Mäusen

C.18.1 Polyklonale Antikörper

C.18.1.1 Material

- weibliche Balb/c Mäuse
- gereinigtes His₆-markiertes Protein in PBS als Antigen
- ImmunEasy™ Mouse Adjuvant (Qiagen, Cat.No. 303101)
- Microtainer® Brand Tubes (Becton Dickinson & Co.)

C.18.1.2 Durchführung

An **Tag 1** wird zwei weiblichen Balb/c Mäusen jeweils 50 μ g des Antigens in 100 μ l PBS und 50% (v/v) Adjuvans (ImmunEasy™ Mouse Adjuvant) in den Oberschenkel injiziert.

An den **Tagen 15, 36** und **50** wird diese Prozedur mit den gleichen Mengen Antigen zum "boosten" des Antikörpertiters wiederholt.

Am **Tag 53** werden die Mäuse dann durch zervikale Dislokation (Genickbruch) getötet, Thorax und Abdomen geöffnet und das Blut schnellstmöglich aus dem Herzen und den zugänglichen Körperhöhlräumen entnommen. Hierbei kann pro Maus im Schnitt etwa 2 ml gewonnen werden. Das Blut wird in Microtainer® Brand Tubes (Becton Dickinson & Co.) überführt, bis zur Bildung eines Blutkuchens eine halbe Stunde inkubiert, und anschließend bei 20000 *rcf* zentrifugiert, um eine saubere Abtrennung des Serums vom Hämatokrit zu erreichen. Das Serum wird mit 0,01% (w/v) Thimerosal versetzt, aliquotiert und bei -20 °C eingefroren. Arbeitsaliquots werden im Kühlschrank aufbewahrt.

C.18.2 Monoklonale Antikörper

Monoklonale Antikörper werden in Zellkultur von genau einem immortalisierten B-Zellklon (Plasmazelle) produziert, der aus der Milz eines immunisierten Tieres gewonnen wird. Die Immortalisierung der Antikörperproduzierenden Zellen erfolgt durch deren Fusion mit unsterblichen Myelomazellen (B-Lymphozyten-Tumorzellen) und deren anschließender Selektion (Köhler & Milstein, 1975).

Hierfür macht man sich zunutze, dass tierische Zellen zwei Möglichkeiten besitzen Nukleotide zu synthetisieren. Auf dem Hauptweg werden Purinnukleotide *de novo* aus Phosphoribosyl-Pyrophosphat und Uridinmonophosphat in mehreren Reaktionsschritten synthetisiert. Einer dieser Schritte kann durch Aminopterin gehemmt werden. Falls Thymidin und Hypoxanthin im Medium vorhanden sind, können die Zellen in

Gegenwart von Aminopterin einen Alternativweg beschreiten. Dabei werden die Purine mit Hilfe von Thymidinkinase (TK) und Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (HGPRT) synthetisiert.

Für die Fusion werden Myelomazellen verwendet, die so mutiert und selektiert wurden, dass sie selbst keine Antikörper produzieren und die Enzyme TK und HGPRT inaktiv sind. In HAT-Medium, das Hypoxanthin, Aminopterin und Thymidin enthält, sterben unfusionierte Myelomazellen deshalb an Purinmangel, während unfusionierte Milzzellen, die ohne Immortalisierung nicht kultivierbar sind, ebenfalls sterben. Somit können nur erfolgreich fusionierte Hybridomazellen überleben, die von den Myelomazellen ihre Unsterblichkeit und von den Milzzellen die Enzyme TK und HGPRT "geerbt" haben.

C.18.2.1 Material

Die monoklonalen Antikörper können aus den Milzzellen derselben Mäuse gewonnen werden, die bereits zur Herstellung der polyklonalen Antikörper (C.18.1) herangezogen wurden. Alle Gefäße, Materialien und Lösungen, die hier verwendet werden, müssen frei von Endotoxinen sein.

- **Maus-Myelomazellen**
- **Milz** einer soeben getöteten immunisierten Maus
- RPMI 1640 (mit Glutamax I) (Gibco)
- Medium 199 mit Glutamax I (Gibco)
- FCS (Biochrom AG)
- Penicillin-Streptomycin, 100× (10k u/ml Penicillin G, 10k µg/ml Streptomycin, Gibco)
- HFCS 50× (Hybridoma Fusion and Cloning Supplement, Roche)
- HT Media Supplement, 50× (H-0137, Sigma)
- HAT Media Supplement, 50× (H-0262, Sigma)
- Basis-Medium (70% (v/v) RPMI 1640 mit Glutamax I, 20% (v/v) Medium 199 mit Glutamax I, 10% (v/v) FCS)
- **HT-Medium** (Basis-Medium plus 1/49 Volumen HT Media Supplement)
- **1,5× HAT-Medium** (Basis-Medium plus 6/185 Volumen HAT Media Supplement, 6/185 Volumen HFCS und 3/185 Volumen Penicillin-Streptomycin)
- **Zellsieb** (Cell Strainer, 70 µm Nylon, Falcon® Becton Dickinson)
- **TAC-Puffer** (150 mM NH₄Cl, 20 mM Tris/Cl pH 7,2)
- **PEG 4000 Lösung** (50% (w/v) Polyethylenglykol 4000 und 5% (v/v) DMSO in RPMI 1640)
- **Cloning-Plates**, 384 Well, 136×92 mm (Produktnummer: 704160, Greiner Bio-One) Platten mit 24 Kavitäten, die jeweils in 16 Abschnitte unterteilt sind
- **48 Well Plates** (Produktnummer: 677180, Greiner Bio-One)
- **96 Well Plates** (Produktnummer: 655180, Greiner Bio-One)
- **Einfriermedium** (80% (v/v) HT-Medium, 10% (v/v) FCS, 10% (v/v) DMSO)
- **Auftaumedium** (88% (v/v) HT-Medium, 10% (v/v) FCS, 2% (v/v) HFCS)
- **Antikörper-Konjugat** (z.B. Peroxidase-conjugated AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG, 115-035-071, Jackson Immuno Research)
- **TMB-Lösung** (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin, 1 mg/ml in DMSO)
- **Azetat/Citrat-Puffer** (50 mM Natriumazetat und Zitronensäure, pH 4,9)
- **HRP-Substrat** für ELISA (10% (v/v) TMB-Lösung, 90% (v/v) Azetat/Citrat-Puffer; kurz vor Anwendung wird 1/2000 Volumen 30% H₂O₂ hinzugegeben)
Alternativ können auch kommerzielle TMB Kits (z.B. BD OptEIA™, TMB Substrate Reagent Set, Cat. No. 555214, BD Biosciences) nach Herstelleranleitung verwendet werden.

C.18.2.2 Durchführung

C.18.2.2.1 Vorbereitung der Myelomazellen

Die Myelomazellen müssen sich zum Zeitpunkt der Fusion in der Teilungsphase befinden. Dazu werden die Zellen etwa eine Woche vor der Fusion aufgetaut, in HT-Medium herangezogen und dann so oft 1:2 verdünnt ("gesplittet"), dass sie nicht in eine stationäre Wachstumsphase geraten. Für die Fusion werden etwa 10⁷ Myelomazellen benötigt.

C.18.2.2.2 Vorbereitung der Medien und Klonierungsplatten

Vor der Fusion müssen alle verwendeten Medien zur Einstellung des pH-Wertes für mindestens zwei Stunden in einem Brutschrank mit 5% CO₂-Atmosphäre äquilibriert werden.

In mindestens acht Klonierungsplatten werden pro Kavität jeweils 800 µl 1,5× HAT-Medium vorgelegt.

C.18.2.2.3 Vorbereitung der Milzzellen

Die Milz wird in eine Petrischale mit RPMI 1640, 10% (v/v) FCS und Penicillin-Streptomycin überführt. Darin wird sie z.B. mit Hilfe eines Spritzenstempels durch ein Zellsieb gerieben. Die entstandene Zellsuspension wird dann in ein 50 ml Röhrchen überführt und mit dem gerade beschriebenen Medium auf 50 ml aufgefüllt. Dort lässt man grobe Zellstücke sedimentieren ehe man den Überstand in ein neues Röhrchen überführt, in dem die Zellsuspension dann bei 400 rcf für 5 min zentrifugiert wird. Daraufhin wird zuerst die Fettschicht abgesaugt, danach der Rest des Überstandes. Das Zellpellet wird durch leichtes Klopfen gelockert und wieder in 50 ml Medium aufgenommen. Es folgt eine weitere Zentrifugation und Absaugen des Überstandes. Wieder wird das Pellet gelockert und in 5 ml TAC-Puffer resuspendiert. In diesem Puffer sollen nun die Erythrozyten bei RT für genau 10 min lysieren, ehe die Suspension mit Medium auf 50 ml aufgefüllt wird. Nun wird die Zelldichte dieser Suspension in einer Zählkammer bestimmt. Nach einer erneuten Zentrifugation werden die Erythrozytenmembranen mit dem Überstand abgesaugt und die Milzzellen in Medium resuspendiert. Für die nun folgende Fusion sollten mindestens 9×10^7 Zellen zur Verfügung stehen.

C.18.2.2.4 PEG-Fusion der Milz- und Myelomazellen (nach Peters & Baumgarten, 1992)

Milz- und Myelomazellen sollen im Verhältnis 9:1 fusioniert werden. Dazu werden 9×10^7 Milzzellen und 10^7 Myelomazellen in ein 50 ml Röhrchen pipettiert und das Volumen mit Medium auf 50 ml aufgefüllt. Die Zellmischung wird bei 400 rcf für 5 min zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Das Röhrchen wird in ein Gefäß mit warmem (37 °C) Wasser gestellt, um die Zellen während der Fusion warm zu halten. Nun werden 1 ml der PEG 4000 Lösung mit einer Spritze oder Pipette unter sanftem Rühren über einen Zeitraum von einer Minute in das Zellpellet injiziert, und die Zellen anschließend 1½ Minuten lang weiter bewegt. Währenddessen werden in eine Pipette 10 ml RPMI Medium aufgezogen und dieses nun sukzessive unter stetigem und ruhigem Rühren zu den Zellen gemischt: in jeweils 30 Sekunden werden zunächst 1 ml, dann 3 ml und schließlich die restlichen 6 ml zugegeben. Weitere 10 ml RPMI folgen innerhalb von 10 s. Die Suspension wird schließlich auf 30 ml aufgefüllt und bei 150 rcf für 5 min abzentrifugiert. Der Überstand wird durch HT-Medium ersetzt ohne das Zellpellet zu resuspendieren und für 5 min ruhig stehen gelassen. Danach werden die Zellen erneut bei 150 rcf für 3 min zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Die Zellen werden unvollständig (Zellaggregate sollen bestehen bleiben) in 18 ml warmem FCS resuspendiert und gleichmäßig auf zwei 50 ml Röhrchen aufgeteilt. Jedes der beiden Röhrchen wird mit HT-Medium auf 45 ml aufgefüllt. Diese Zellsuspension wird nun in die Kavitäten der vorbereiteten Klonierungsplatten mit vorgelegtem $1,5 \times$ HAT-Medium (800 µl pro Kavität) aliquotiert (400 µl Zellsuspension pro Kavität). Die Platten werden vorsichtig in den Brutschrank gegeben und dürfen dort auch später nicht zu stark bewegt werden, da die Zellen noch sehr empfindlich sind.

C.18.2.2.5 Betreuung und Selektion der Hybridomaklone

Sieben Tage nach der Fusion sollten sich die ersten kleinen Klone finden lassen, die sich als halbkugelförmige Zellhaufen manifestieren. Nun kann man auch, wenn nötig, mit HT-Medium dehydrierte Kavitäten (niedriger Flüssigkeitsstand) oder verbrauchte Medien (pH Indikator gelb) ergänzen. Kontaminierte Zellen sollten durch Zugabe von Natronlauge desinfiziert werden.

Sobald die Klone eine gewisse Größe (mindestens 1,5 mm Durchmesser) erreicht haben, kann man sie mit einer kleinen Pipettenspitze vorsichtig herausaugen und in 48 Well Platten überführen. Hierbei sollte genau Buch darüber geführt werden, welcher Zellklon aus welchem Bereich der Klonierungsplatte entnommen wurde, um später evtl. "nachpicken" zu können und um die doppelte Entnahme des selben Klons zu vermeiden. Die Entnahme von Klonen aus den Klonierungsplatten kann über mehrere Wochen erfolgen.

Die Klone werden nun in den 48 Well Platten mit HT-Medium weiter kultiviert. Wenn das Medium eine orange Farbe annimmt, wird der Klon gesplittet, indem man etwa ein Drittel der Zellen entnimmt und in eine Kavität mit frischem Medium überführt. Bei dieser Gelegenheit kann auch etwas Mediumsüberstand für weitere Tests in einem ELISA (siehe C.18.2.2.6) entnommen werden. Medium, das eine stark gelbe Färbung angenommen hat, enthält u. U. einen hohen Antikörpertiter und eignet sich deshalb am besten für Tests. Allerdings sollte man die Zellen erst dann so lange inkubieren, wenn bereits entsprechende Backups dieses Klons existieren.

Ist ein positiver Klon gefunden, so wird davon ein Teil in Einfriermedium überführt und eingefroren (siehe auch C.7.2.1). Werden die Zellen wieder aufgetaut, so werden sie zunächst gewaschen und in Auftaumedium überführt, das Faktoren enthält, die das Wachstum der gestressten, empfindlichen Hybridomazellen fördern.

Um sicher zu gehen, dass ein positiv getesteter Klon auch wirklich aus einem einzigen und nicht aus mehreren verschiedenen Klonen besteht, muss dieser subkloniert werden. Dazu nimmt man etwa 10000 Zellen in ein Volumen von 5 ml auf und verdünnt 0,5 ml dieser Suspension durch Zugabe von 4,5 ml um den Faktor 10. Diese beiden Verdünnungsstufen (2000 bzw. 200 Zellen pro ml) werden durch Austropfen (50 µl pro Tropfen) in 96 Well Platten aliquotiert, in denen HT-Medium mit HFCS (wegen der geringen Zelldichte sind zusätzliche Faktoren nötig) vorgelegt wurde. Die Platten müssen genauso wie eingangs die Klonierungsplatten stoßfrei im

Brutschrank inkubieren. Nach etwa einer Woche werden die Kavitäten notiert, in denen nur ein Klon heranwächst. Diese Klone werden wie bereits beschrieben gepickt, in 48 Well Platten weiter kultiviert und deren Überstände getestet.

Subklonierung wird auch später bei verifiziert positiven Hybridomazellen nötig, da diese zu Mutationen neigen und deshalb die Antikörperproduktion einstellen oder deren Spezifität verändern.

Zur Produktion von monoklonalen Antikörpern in mittelgroßem Maßstab werden die Hybridomazellen in Zellkulturflaschen oder Rollkulturflaschen mit wenig Medium kultiviert bis dieses eine klare gelbe Farbe annimmt. Die Zellen sterben hierbei ab. Das Medium wird zentrifugiert, der Überstand aliquotiert und bei -20 °C aufbewahrt.

C.18.2.2.6 Screening der Zellüberstände per ELISA

Zunächst werden MaxiSorp™ Mikrotiterplatten (wie in C.16 beschrieben) mit dem entsprechenden Antigen (2 µg/ml) beschichtet und mit 10% (v/v) FCS in PBS als Blocking Solution geblockt. Bei allen Inkubationsschritten werden die Platten mit Klarsichtfolie vor Austrocknung geschützt. Nach dreimaligem Waschen mit 0,05% (v/v) Tween 20 in PBS als Waschlösung werden jeweils 100 µl der zu testenden Kulturüberstände in die Kavitäten gefüllt und für 2 Stunden bei RT inkubiert. Als Positivkontrolle dient hierbei eine Verdünnungsreihe des polyklonalen Serums (C.18.1) und als Negativkontrolle der Probenpuffer für die Verdünnung, der hier mit der Blocking Solution identisch ist. Danach werden die Kavitäten dreimal gewaschen und für eine Stunde bei RT mit 100 µl einer Verdünnung eines Antikörper-Konjugats (Ziege- α -Maus-HRP, 1:20000) inkubiert. Die genaue Verdünnung des Antikörper-Konjugats muss jedoch evtl. in einem Vortest zusammen mit verschiedenen Verdünnungen des polyklonalen Serums ausgetestet werden. Nach fünfmaligem Waschen werden 100 µl des HRP-Substrates (TMB, H₂O₂) hinzu pipettiert und für eine halbe bis ganze Stunde inkubiert, wobei man die Blaufärbung der Positivkontrolle beobachten kann. Die Reaktion wird mit 50 µl 1 M Schwefelsäure gestoppt (Farbumschlag zu Gelb) und die Absorption bei 470 nm (abzüglich Absorption bei 595 nm) gemessen.

Indifferente Klone sollten in jedem Fall häufiger getestet werden und auch bei vermeintlichen positiven Klonen sind später evtl. weitere Tests nötig (Subklonierung!).

Die endgültigen Tests der Antikörper erfolgen in dem geplanten Anwendungsgebiet (Immuno Blot, Fluoreszenzmikroskopie, usw.), da nicht jeder monoklonale Antikörper für alle Methoden geeignet ist.

C.19 RNA Methoden

Allgemein gilt bei Umgang mit RNA, die Kontamination mit RNAsen zu vermeiden. Da unter anderem der menschliche Körper eine Quelle für RNAsen darstellt, ist das Tragen von sauberen Handschuhen Pflicht. Die Kontamination der Arbeitsmaterialien mit Körperflüssigkeiten wie Schweiß und Speichel ist dringend zu vermeiden. Säuberung erfolgt mit Ethanol (70% (v/v)) oder durch heiße Sterilisation. Pipettenspitzen können aus einer frischen Packung gesteckt und unautoklaviert verwendet werden. Lösungen sollten mit DEPC behandelt oder, wenn dies nicht möglich ist, die sauberen Reagenzien in einem RNase-freien Lösungsmittel (z.B. DEPC-behandeltes dH₂O) gelöst werden.

C.19.1 DEPC-Behandlung

Um RNAsen in Lösungen zu degradieren, kann man diese mit Diethylpyrocarbonat (DEPC) behandeln. Dazu wird die Lösung mit 0,1% (v/v) DEPC versetzt, über Nacht bei 37 °C inkubiert und anschließend autoklaviert, um das DEPC selbst abzubauen. DEPC zerfällt dabei hauptsächlich in CO₂ und Ethanol.

Diese Methode ist **nicht anwendbar** bei Lösungen, die nicht autoklaviert werden dürfen und bei Reagenzien, die eine **Aminogruppe** haben, wie zum Beispiel **Tris-Base**. Auch HEPES Puffer ist hierfür ungeeignet.

Alternativ können die sauberen (!) Reagenzien in mit DEPC behandeltem dH₂O gelöst werden.

C.19.2 6% Polyacrylamid-/ 8M Harnstoffgel

Das Harnstoffgel kann ohne weiteres einen Tag vor seiner Verwendung hergestellt werden. Man sollte es dann feucht eingepackt bei Raumtemperatur aufbewahren, um sowohl ein Austrocknen des Gels als auch Auskristallisieren des Harnstoffs zu vermeiden.

	c_n/c_v	Menge für 50 ml
Harnstoff/Urea (60,06 g/mol)	8 M	24 g
(Bis-)Acrylamid-Lsg. (30%, 0,8% Bisacrylamid)	20% (v/v)	10 ml
10× TBE	10% (v/v)	5 ml
10% Ammoniumperoxodisulfat	0,5% (v/v)	250 µl

Mit dH₂O auf Endvolumen auffüllen und rühren, bis Harnstoff gelöst ist. Dann Polymerisation starten mit:

TEMED

0,09% (v/v)

45 µl

C.20 Aufreinigung von RNA-Polymerase

Um die Aktivität der Transkriptionsfaktoren PrfA und SigB in der "run off" *in vitro* Transkription untersuchen zu können, wurde RNA-Polymerase aus *L. monocytogenes* $\Delta prfA \Delta sigB$ nach folgendem Protokoll isoliert.

C.20.1 Material

- **HiTrap™ Heparin HP** Säulchen, 1 ml (Amersham Biosciences)
- **Dialyseschlauch**, MWCO 14000 Da
- 1 M Tris pH 8,0
- 2 M KCl
- 1 M MgCl₂
- 1 M CaCl₂
- 0,5 M EDTA pH 8,0
- Glycerol
- 1 M DTT, immer erst kurz vor Gebrauch hinzugeben
- Dialysepuffer **TBP₅₀** (10 mM Tris, 10 mM MgCl₂, 5 mM CaCl₂, 1 mM EDTA, **50 mM KCl**, 10% (v/v) Glycerol, [0,2 mM DTT])
- **TBP₅₀**, filtriert (0,45 µm) und entgast
- **TWP₁₀₀₀** (wie TBP₅₀, aber mit **1000 mM KCl**), filtriert (0,45 µm) und entgast
- 1 M HEPES pH 7,9
- 0,5 M EGTA pH 8,0
- 0,1 M PMSF in EtOH, immer erst kurz vor Gebrauch hinzugeben; ersatzweise eine kommerzielle Mischung von Proteinase (Complete Mini, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail Tablets; Roche)
- **Lysepuffer** (10 mM HEPES, 10 mM KCl, 0,1 mM EDTA, 0,1 mM EGTA, [0,1 mM DTT, 50 µM PMSF])

C.20.2 Durchführung

- 200 ml einer Übernachtskultur von Listerien werden zu 1800 ml vorgewärmten BHI in Erlenmeyerkolben gegeben und unter Schütteln bei 37 °C bis zu OD₆₀₀ 1,0 kultiviert.
- Die Kultur wird bei 11000 rcf und 4 °C für 10 min zentrifugiert. Die Pellets werden dann in etwa 20 ml PBS resuspendiert und erneut abzentrifugiert. Das PBS wird verworfen und die Pellets bei -80 °C eingefroren.
- Die Bakterienpellets werden auf Eis aufgetaut und in 12 ml Lysepuffer (mit DTT und PMSF) resuspendiert. Die Suspension wird mit Lysepuffer auf ein Volumen von 20 ml aufgefüllt.
- Die Bakterien werden mit einer French Press (Simpson *et al.*, 1963) bei etwa 60 bis 70 bar lysiert, und anschließend die Zelltrümmer bei 14000 rcf und 4 °C für 30 min abzentrifugiert.
- Der Überstand wird mit Lysepuffer auf 20 ml aufgefüllt und die Proteine bei 4 °C durch sukzessive Zugabe von insgesamt 7,2 g gemörsertem Ammoniumsulfat ((NH₄)₂SO₄) unter ständigem Rühren ausgefällt.
- Nach etwa 45 min werden die ausgefallenen Proteine durch 30 min Zentrifugation bei 18000 rcf und 4 °C pelletiert.
- Das Proteinpellet wird in 2 ml TBP₅₀ gelöst und gegen TBP₅₀ (mit DTT) dialysiert.
- Die Probe wird nun filtriert (0,45 µm), um sie für die ÄKTAprime (C.10.4) vorzubereiten.
- An die ÄKTAprime wird TBP₅₀ als Puffer A und TWP₁₀₀₀ als Puffer B angeschlossen. Die allgemeine Flussrate beträgt 1,2 ml/min.
 - Die HiTrap™ Heparin HP Säule wird mit 10 ml TBP₅₀ äquilibriert.
 - Die Probe wird über die Säule geschickt (50 ml, 0 %B).
 - Die Säule wird bei 300 mM [K⁺] gewaschen, bis die OD₂₈₀ wieder das Basislevel erreicht hat (300+ ml, 26 %B).
 - In einem linearen Gradienten von 300 bis 1000 mM [K⁺] und anschließend 1000 mM [K⁺] werden die Proteine eluiert (40 ml, 26 bis 100 %B, dann 20 ml 100 %B) und die Fraktionen gesammelt.
 - Die Säule wird mit dH₂O und anschließend 20% (v/v) EtOH gewaschen.

- Die Fraktionen werden in einer SDS-PAGE (C.13) mit Silberfärbung (C.14.2) überprüft. Die Konzentration der RNA-Polymerase wird hierbei durch Vergleich der β - und β' -Untereinheiten mit bekannten Mengen an BSA bestimmt (siehe auch C.23).
- Die Aktivität der RNA-Polymerase wird in einer *in vitro* Transkription (C.21) getestet.
- Die geeigneten Fraktionen werden vereinigt, aliquotiert und bei -80°C gelagert.

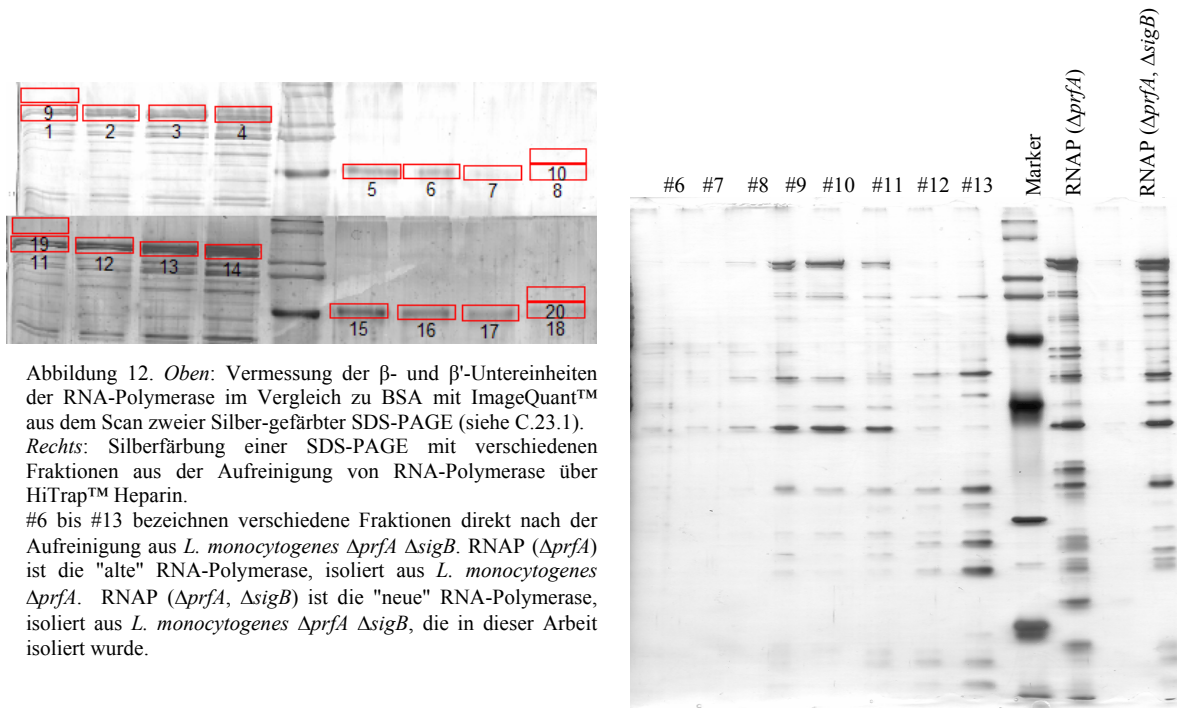


Abbildung 12. *Oben*: Vermessung der β - und β' -Untereinheiten der RNA-Polymerase im Vergleich zu BSA mit ImageQuant™ aus dem Scan zweier Silber-gefärbter SDS-PAGE (siehe C.23.1). *Rechts*: Silberfärbung einer SDS-PAGE mit verschiedenen Fraktionen aus der Aufreinigung von RNA-Polymerase über HiTrap™ Heparin. #6 bis #13 bezeichnen verschiedene Fraktionen direkt nach der Aufreinigung aus *L. monocytogenes* $\Delta prfA \Delta sigB$. RNAP ($\Delta prfA$) ist die "alte" RNA-Polymerase, isoliert aus *L. monocytogenes* $\Delta prfA$. RNAP ($\Delta prfA, \Delta sigB$) ist die "neue" RNA-Polymerase, isoliert aus *L. monocytogenes* $\Delta prfA \Delta sigB$, die in dieser Arbeit isoliert wurde.

C.21 "run off" *in vitro* Transkription

In dieser Arbeit wurde die "run off" *in vitro* Transkription eingesetzt, um die Aktivität eines oder mehrerer Promotoren unter kontrollierten, zellfreien Bedingungen zu untersuchen.

Dazu wurde zunächst die jeweilige Promotorregion mittels PCR amplifiziert und in das Plasmid pUC18 kloniert. Nach Amplifikation des Plasmids in *Escherichia coli* DH5 α und folgender Isolierung, wurde das Plasmid stromabwärts des Promotors mit einem Restriktionsenzym geschnitten und somit linearisiert. Das linearisierte Plasmid wurde dann als Template in der *in vitro* Transkription eingesetzt.

In der *in vitro* Transkription selbst wurden Template, Transkriptionsfaktoren und RNA-Polymerase in Anwesenheit eines radioaktiven Nukleotids inkubiert. Die entstehenden Transkripte wurden dann in einer Harnstoff-PAGE aufgetrennt und radiometrisch mit Hilfe von Röntgenfilm bzw. eines *Storage Phosphor Screen* (Amersham Biosciences bzw. Molecular Dynamics) erfasst und anschließend quantifiziert.

C.21.1 Reagenzien

Sämtliche Reagenzien werden frei von RNAsen gehalten bzw. mit DEPC behandelt, wenn möglich (siehe C.19.1).

C.21.1.1 Nukleotide, Nukleotid-Mix

Nukleotide (Roche, 100 mM) werden als Nukleotid-Mix in DEPC-behandeltem dH₂O auf eine Konzentration von jeweils 3 mM verdünnt.

Bei Versuchen mit einem radioaktiv markierten Nukleotid, wird dieses entsprechende Nukleotid im Nukleotid-Mix weggelassen und separat eine 750 μM Verdünnung des unmarkierten Nukleotids hergestellt.

Beispiel: bei Markierung mit [α -³²P]-CTP benötigt man einen Nukleotid-Mix mit ATP, GTP und UTP (jeweils 3 mM) und separat 750 μM CTP.

Radioaktive [α -³²P]-NTP (Amersham) werden kurz vor Zugabe in die Reaktion auf etwa ein Viertel verdünnt (Endkonzentration $\sim 2,5 \mu\text{Ci}/\mu\text{l}$ bei 3000 Ci/mmol), um die benötigten Mengen besser dosierbar zu machen.

C.21.1.2 Weitere Lösungen

- 100 mM K_3PO_4
- 1 M DTT (Dithiothreitol); DTT ist in wässriger Lösung bei Raumtemperatur instabil, wird deshalb aliquotiert und bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert
- **Heparinlösung** (10 g/l, Kaliumheparinsulfat (Fluka, 9005-48-5)); gelagert bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$

C.21.1.3 Master-Mix für *in vitro* Transkription

	c_n	$c_{m/v}$	Menge für 10 ml
1 M Tris/Cl, pH 8,0	100 mM	10% (v/v)	1 ml
100 mM Na_2 -EDTA	11,4 mM	1,14% (v/v)	114 μ l
1 M $MgCl_2$	32 mM	3,2% (v/v)	320 μ l
100 mM K_3PO_4	3,2 mM	3,2% (v/v)	320 μ l
Glycerol		20% (v/v)	2 ml
BSA		1 g/l	10 mg
1 M DTT	1 mM	0,1% (v/v)	10 μ l

DTT ist in wässriger Lösung bei Raumtemperatur instabil. Deshalb sollte der Master-Mix in kleinen Aliquots bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert werden.

C.21.1.4 Stopp-Puffer für *in vitro* Transkription

	c_n	c_m	Menge für 50 ml
Harnstoff/Urea (60,06 g/mol)	10 M	601 g/l	30 g
Bromphenolblau		0,02% (w/v)	10 mg
Xylencyanol		0,02% (w/v)	10 mg

C.21.2 *in vitro* Transkriptionsansatz

Die *in vitro* Transkription wurde auf Eis angesetzt.

C.21.2.1 Vormix

Der Vormix wurde für mehrere Ansätze mit gleichem Promotor und radioaktivem Nukleotid in entsprechend vielfacher Menge angemischt.

	einfacher Ansatz
Master-Mix für <i>in vitro</i> Transkription	11 μ l
RNase Inhibitor	0,5 μ l
Nukleotidmix (je 3 mM)	1,5 μ l
Promotor-DNA (375 ng/ μ l)	2 μ l

Der Vormix wurde aliquotiert und die zu testenden Transkriptionsfaktoren in entsprechender Konzentration hinzugegeben.

	einfacher Ansatz
Vormix	15 μ l
dH ₂ O bzw. Verdünnung eines Faktors	8 μ l

C.21.2.2 Weiteres Prozedere

Nachdem alle Proben präpariert sind, werden in jeden Ansatz 2 μ l der RNA-Polymerase-Verdünnung (12 bis 24 nM) hinzugegeben.

Nach etwa 5 min Inkubation bei RT, werden in jeden Ansatz 2 μ l radioaktives [α -³²P]-NTP (5 μ Ci, 3000 Ci/mmol) pipettiert und die Ansätze bei $37\text{ }^\circ\text{C}$ für 5 min inkubiert. Daraufhin werden 2 μ l Heparinlösung (10 g/l) hinzugefügt, um freie RNA-Polymerase zu binden, und die Proben für weitere 10 min inkubiert. Danach werden jeweils 2 μ l des im Überschuss befindlichen unmarkierten NTPs (0,75 mM) hinzu pipettiert, um die Polymerisation zu erleichtern und zu beschleunigen. Die Reaktion wird schlussendlich nach 5 min durch Zugabe von jeweils 40 μ l Stopp-Puffer beendet.

Je 14 µl der fertigen Proben werden auf ein Harnstoffgel (C.19.2) aufgetragen und die Transkripte für etwa 1,5 h bei 1500 V separiert.

C.21.2.3 nicht-radioaktiver Ansatz

Sollten mRNA Transkripte für eine folgende Primer Extension (C.22) hergestellt werden, so wurde das obige Prozedere folgendermaßen verändert:

Der Ansatz für eine Probe wurde mengenmäßig etwa um den Faktor 5 bis 10 vervielfacht. Der Nukleotid-Mix enthielt alle vier unmarkierten NTPs (3 mM), weshalb die Reaktion direkt nach Zugabe der RNA-Polymerase mit hoher Geschwindigkeit verlief. Eine Supplementation mit zusätzlichen Nukleotiden nach der Zugabe von Heparin konnte deshalb entfallen. Die Reaktion wurde nicht mit Stopp-Puffer, sondern durch Inkubation auf Eis verlangsamt und die mRNA mit DNA-free™ von Ambion (nach den Anleitungen des Herstellers) gereinigt. Die RNA wurde nach Messung der Konzentration und Reinheit bis zu ihrer weiteren Verarbeitung bei -20 °C aufbewahrt.

C.22 Primer Extension

Die Primer Extension dient der Positionsbestimmung von Startsites in der Transkription eines Gens. Dazu wird die mRNA (oder ein Gemisch von mRNAs, bei mehreren Startpunkten) von einem an definierter Stelle stromabwärts gelegenen Primer aus in cDNA umgeschrieben, bis diese Transkription an der ersten Base der mRNA stoppt. Aus dem Größenvergleich der cDNA mit DNA-Produkten bekannter Länge im selben Harnstoffgel (C.19.2), kann die exakte Länge der cDNA und damit der Transkriptionsstart bestimmt werden. Als DNA Größenmarker eignen sich die Produkte einer klassischen Sequenzierung nach Sanger (siehe C.9.2). Wenn man nun parallel zur Primer Extension eine Sequenzierung des untersuchten Promotors mit dem gleichen Primer durchführt, so kann man den Transkriptionsstart im *direkten* Vergleich mit der Sequenz des Gens ablesen.

Die Primer Extension kann sekundär auch dazu verwendet werden, das Vorhandensein von mRNA semiquantitativ zu bestimmen.

C.22.1 Material

- gereinigte mRNA
- Oligonukleotid-Primer, revers-komplementär zu einer Sequenz in der mRNA etwa 100 bis 200 n stromabwärts des vermuteten Transkriptionsstarts
- [γ -³²P]-ATP (Amersham, 10 µCi/µl, ~6000 Ci/mmol)
- T4 Polynukleotid-Kinase (MBI Fermentas, 10 u/µl) und dazugehöriger "Buffer A"
- QIAquick Nucleotide Removal Kit (Qiagen)

C.22.2 Durchführung

C.22.2.1 Primer markieren

- In einem Volumen von 10 µl werden 10 pmol des Primers mit 30 µCi [γ -³²P]-ATP und 10 Einheiten T4 Polynukleotid-Kinase in Buffer A für 30 min bei 37 °C inkubiert.
- Nicht eingebaute Nukleotide werden anschließend mit dem QIAquick Nucleotide Removal Kit nach Herstellerangaben entfernt. Der markierte Primer wird in 50 bis 60 µl aufgenommen.
- Die Qualität der Markierung wird im Szintillationszähler gemessen. Dazu gibt man 2 µl des Primers auf einen Filter und inkubiert diesen zusammen mit 3 ml Szintillationsflüssigkeit (Rotiszint® von Roth) in einem Szintillationsröhrchen.

C.22.2.2 Kopräzipitation

- 30 µg RNA werden mit etwa 2×10^6 cpm des markierten Primers gemischt und durch Zugabe von 2,5 Volumen reinem EtOH und 0,1 Volumen Natriumazetat (3M, pH 4,8) bei -20 °C ÜN koprazipitiert.
- Am folgenden Tag wird die RNA für 15 min bei 20000 ref abzentrifugiert und das Pellet mit 70% EtOH gewaschen und anschließend getrocknet (siehe auch C.8.11).

C.22.2.3 Extension

- Das RNA Pellet wird in 5 µl dH₂O, 2 µl 5× Reverse Transkriptase Puffer und 2 µl dNTPs (2 mM) gelöst, für 2 min bei 100 °C inkubiert und anschließend kurz abzentrifugiert.

- Anschließend wird 1 µl AMV Reverse Transkriptase (Houts *et al.*, 1979) hinzugegeben und der Ansatz für 45 min bei 45 °C inkubiert.
- Danach wird 1 µl RNase (10 g/l) zugegeben und der Ansatz für 10 min bei RT inkubiert. Abschließend werden 4 µl Stopp Puffer hinzu pipettiert.
- Vor dem Auftrag auf das Harnstoffgel (C.19.2) wird die Probe für 2 min bei 75 bis 80 °C inkubiert. Die Proben werden für etwa 1,5 h bei 1500 V separiert.

C.23 Optische Quantifizierung von Produktmengen

C.23.1 Digitale Bildvermessung mit ImageQuant™

Programme wie ImageQuant™ von Molecular Dynamics oder ImageMaster™ Total Lab von Amersham können verwendet werden, um digitale Aufnahmen von Gelen, Western Blots, etc. hinsichtlich der detektierten Produktmengen zu vermessen. Hierbei integriert die Software die (Helligkeits-)Werte von Graustufenbildern in einem ausgewählten Bildausschnitt und gibt den errechneten Wert als so genanntes "Volumen" wieder.

Voraussetzung für eine korrekte Messung, aus der man die Produktmenge ablesen kann, ist, dass in allen Schritten eine lineare Übertragbarkeit der Messwerte gegeben ist. Als Beispiel sei die Messung einer bestimmten Proteinmenge auf einem Western Blot genannt. Eine n-fache Menge an Protein muss zu einer ebenfalls n-fachen Dekoration mit Antikörpern führen, diese wiederum zu einer n-fach stärkeren Lumineszenz durch die Peroxidase-katalysierte ECL, diese zu einer n-fachen Belichtung des Röntgenfilms und schlussendlich muss in der digitalen Version die n-fach dunklere Bande nach dem Einscannen auch als n-fach dunklerer Cluster an Pixeln wiedergegeben werden. Es gibt also eine Reihe von Zwischenschritten, bei denen diese Linearität verloren gehen kann (Übersättigung mit Antikörpern, Überbelichtung des Röntgenfilms, falsche Parameter beim Scannen, Gamma-Korrektur und unproportionale Veränderungen der Helligkeit des digitalen Bildes).

In dieser Arbeit wurden mit ImageQuant™ vorwiegend Bilder ausgewertet, die durch die Bestrahlung eines Storage Phosphor Screen (siehe C.23.2) und anschließenden Scan mit einem Typhoon™ 9200 gewonnen wurden. Eine digitale Nachbearbeitung der Bilder fand vor der Ausmessung der Banden nicht statt.

Für jede vermessene Bande eines Gels wurden Rechtecke mit identischen Dimensionen als Messbereich verwendet (siehe Abbildung 13). Die Intensität des Hintergrundes wurde ebenfalls mit einem Rechteck neben den beladenen Spuren bestimmt (jeweils "RECT 18" in Abbildung 13).

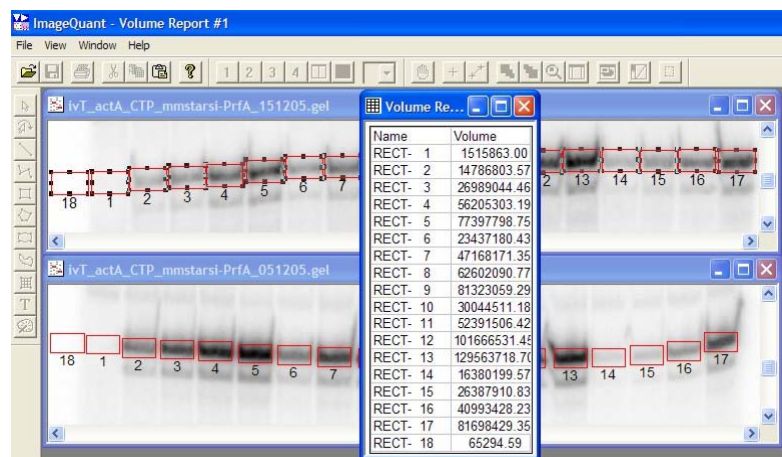


Abbildung 13. Beispiel für die Vermessung der Banden aus einer *in vitro* Transkription mittels ImageQuant™. Screenshot.

C.23.2 Storage Phosphor Screen

In dieser Arbeit wurden Polyacrylamid-Gele mit radioaktiv markierten Proben nach der optionalen Exposition auf einem Röntgenfilm (Konica Minolta Medical Film oder Fuji Medical X-Ray Film) mit Verstärkerfolie (Dr. Goos-Suprema Spezial) 2h bei 80 °C unter Vakuum auf einem Gelrockner (Modell 583 Gel Dryer, BIO-RAD) getrocknet. Die getrockneten Gele wurden für mehrere Stunden oder über Nacht in einer Röntgenfilmkassette einem Storage Phosphor Screen (Amersham Biosciences oder Molecular Dynamics) exponiert.

Ein Storage Phosphor Screen besteht aus einer Schicht von radiosensitiven Phosphorkristallen, die auf einer Polyesterplatte aufgezogen sind. Er speichert Energie von Betaeilchen, Röntgen- und Gammastrahlen und benötigt 2- bis 10-fach geringere Expositionszeiten als konventionelle Röntgenfilme. Nach Stimulation mit einem Laser wird eine Lichtmenge emittiert, die in einem weiten Bereich proportional zur Menge der gespeicherten Energie und damit auch der Radioaktivität der untersuchten Probe ist. Der Screen kann durch starke Lichtbestrahlung gelöscht und danach wieder verwendet werden.

Nach der Exposition wurde der Screen von einem Scanner (Typhoon™ 9200, Molecular Dynamics) eingelesen und das entstehende Bild in Dateiform abgespeichert. Der Screen wurde danach im Image Eraser (Molecular Dynamics) für 10-20 min gelöscht.

D Ergebnisse

D.1 Untersuchung von InlG, InlH und InlE

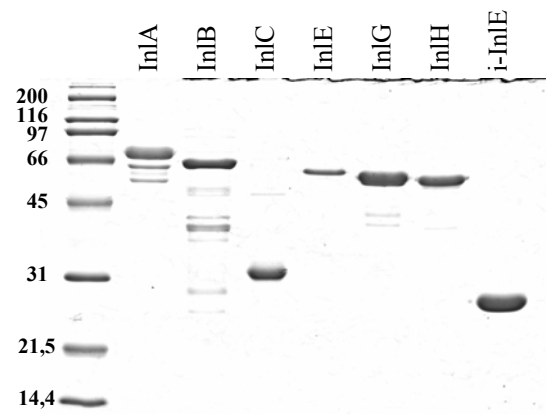
Das Fehlen der Internaline aus dem *inlG/H/E* Gencluster von *L. monocytogenes* EGD führte *in vivo* zu einer Reduktion der Virulenz im Mausmodell (Raffelsbauer *et al.*, 1998). In weiteren Studien konnte gezeigt werden, dass die von InlA abhängige Internalisierung *in vitro* von den Internalinen InlG, InlH, InlE und InlC unterstützt wird (Bergmann, 2002; Bergmann *et al.*, 2002). Aus diesem Grund sollten diese Internaline weiter untersucht und charakterisiert werden.

D.1.1 Antikörper

Um die Expression der Internaline InlG, InlH und InlE von *L. monocytogenes* besser untersuchen zu können, wurden im Rahmen dieser Arbeit Antikörper in weiblichen Balb/c Mäusen hergestellt wie unter C.18 beschrieben.

Als Antigene dienten dabei His₆-markierte Fusionsproteine (InlE, InlG, InlH), die zusammen mit anderen rekombinanten Internalinen von *L. monocytogenes* (InlA, InlB, InlC) und *L. ivanovii* (i-InlE) wie in C.10 beschrieben aufgereinigt wurden (siehe Abbildung 14). Dazu wurden in dieser Arbeit aus dem pQE Vektor und den proteinkodierenden Sequenzen für Internaline von *L. monocytogenes* und *L. ivanovii* die Plasmide pQE30_inlA, pQE30_inlB, pQE30_inlE, pQE30_inlG, pQE30_inlH und pQE60_i-inlE kloniert und in *E. coli* M15 transformiert. Der Vektor zur Expression von InlC war bereits von Fredi Engelbrecht hergestellt worden, genauso wie ein in Kaninchen entwickelter Antikörper gegen InlC. Die Proteine InlA und InlB dienten unter anderem als Antigene für die Herstellung von Antisera in Kaninchen, die von der Firma SEQLAB hergestellt wurden.

Abbildung 14. Mit Coomassie Blau gefärbte SDS-PAGE gereinigter Internaline. Aufgetragen sind Broad Range Marker (Molekulargewichte in kDa angegeben) und jeweils ca. 5 µg der rekombinanten His₆-markierten Internaline InlA, InlB, InlC, InlE, InlG, InlH aus *L. monocytogenes* EGDe und i-InlE aus *L. ivanovii* ATCC 19119.



Da erwartet wurde, dass die Proteine InlE, InlG und InlH aufgrund ihrer hohen Ähnlichkeiten von 83,5% (siehe G.1.2 Abbildung 45) nur schwierig mit polyklonalen Antikörpern zu unterscheiden sein würden, wurde zusätzlich versucht monoklonale Antikörper herzustellen, wie in C.18.2 beschrieben. Hierzu wurden die Milzen der Mäuse verwendet, die auch schon für die Herstellung der Seren dienen mussten.

D.1.1.1 Test der polyklonalen Seren

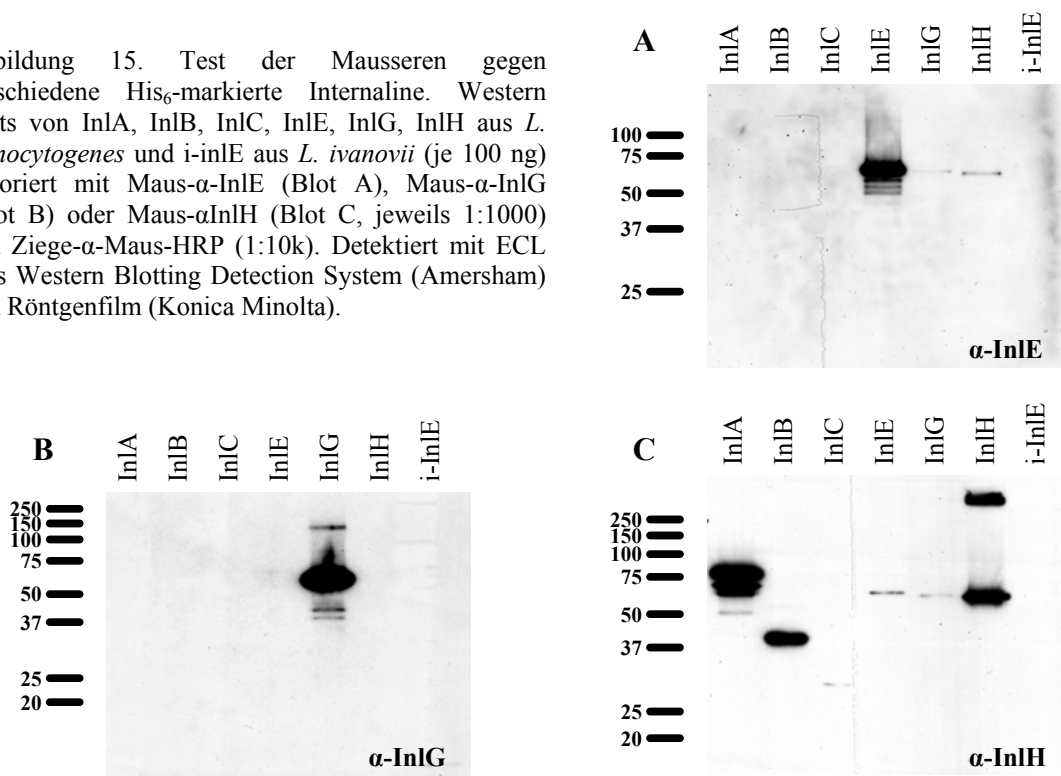
Die verschiedenen Seren wurden in Immunoblots (C.15) gegen diverse His₆-markierte Internaline getestet.

Das polyklonale Antiserum aus der Immunisierung mit InIE zeigte eine verhältnismäßig hohe Spezifität für dieses Antigen. Leichte Kreuzreaktionen ergaben sich mit InIH und InIG, jedoch nicht mit anderen Internalinen (siehe Abbildung 15, A).

Die Antikörper des Serums aus der Immunisierung mit InIG zeigten ebenfalls eine sehr spezifische Bindung an dieses Antigen. Es konnten keinerlei Kreuzreaktionen mit anderen in diesem Versuch getesteten Proteinen beobachtet werden (siehe Abbildung 15, B).

Im Gegensatz dazu waren die Antikörper, die gegen InIH produziert wurden, sehr unspezifisch. Es zeigten sich starke Kreuzreaktionen mit anderen Internalinen, dabei vor allem mit InIA, (siehe Abbildung 15, C) und in geringerem Ausmaß auch mit anderen His₆-markierten Proteinen, wie z.B. DeoD (Purinnukleosid-Phosphorylase, aufgereinigt von Jochen Stritzker; nicht gezeigt). Bei InIB kreuzreagierte der Antikörper jedoch nicht mit der Hauptkomponente des gereinigten Proteins, sondern mit einer Kontaminante oder einem Abbauprodukt der Größe ~40 kDa. In der InIH-Präparation wurde zudem ein sehr schweres Produkt (>300 kDa) detektiert, das vorher beim Überprüfen der Sauberkeit des Proteins nicht zu entdecken war.

Abbildung 15. Test der Mausseren gegen verschiedene His₆-markierte Internaline. Western Blots von InIA, InIB, InIC, InIE, InIG, InIH aus *L. monocytogenes* und i-InIE aus *L. ivanovii* (je 100 ng) dekoriert mit Maus- α -InIE (Blot A), Maus- α -InIG (Blot B) oder Maus- α -InIH (Blot C, jeweils 1:1000) und Ziege- α -Maus-HRP (1:10k). Detektiert mit ECL Plus Western Blotting Detection System (Amersham) und Röntgenfilm (Konica Minolta).



D.1.1.2 Test der monoklonalen Antikörper

Aus der Fusion der Myelomazellen mit Milzzellen von der mit InIE immunisierten Maus konnten nur 33 gut wachsende Klone gewonnen werden. Im ELISA Screening mit immobilisiertem InIE (C.18.2.2.6) zeigte keiner der getesteten Überstände eine positive Reaktion.

Bei der Fusion von Milzzellen aus der mit InIG immunisierten Maus mit Myelomazellen entstanden 56 Hybridomklone. Im ELISA Screening mit immobilisiertem InIG erwiesen sich die Überstände von zwei Klonen (G#9 und G#10) als positiv. Diese Kulturüberstände wurden daraufhin auch im Immunoblot getestet (für G#10 siehe Abbildung 16, A). Beide Antikörper banden spezifisch an His₆-markiertes InIG und zeigten keinerlei Kreuzreaktionen mit anderen Internalinen oder Proteinen aus listeriellen Zellwandpräparaten bzw. Kulturüberständen. Allerdings konnte in diesen listeriellen Präparaten auch kein InIG detektiert werden. Der Antikörpertiter im getesteten Überstand war jedoch verhältnismäßig niedrig, da eine relativ hohe Proteinmenge und eine geringe Verdünnung des Überstandes verwendet werden musste, um ein Signal zu erhalten.

Aus der Fusion von Myelomazellen mit Milzzellen aus der mit InIH immunisierten Maus konnten 72 Klone gewonnen werden. Der Überstand eines Klons zeigte im ELISA ein schwach positives Ergebnis. Ein weiterer Test im Immunoblot (siehe Abbildung 16, B) zeigte jedoch ein unerwartetes Resultat. Der Antikörper band schwach an einen kleinen (<25 kDa) Bestandteil der InIA Lösung. Eine Reaktion mit InIH war nicht zu beobachten. Die Immunoblot Methode ist jedoch weniger sensitiv als ein ELISA.

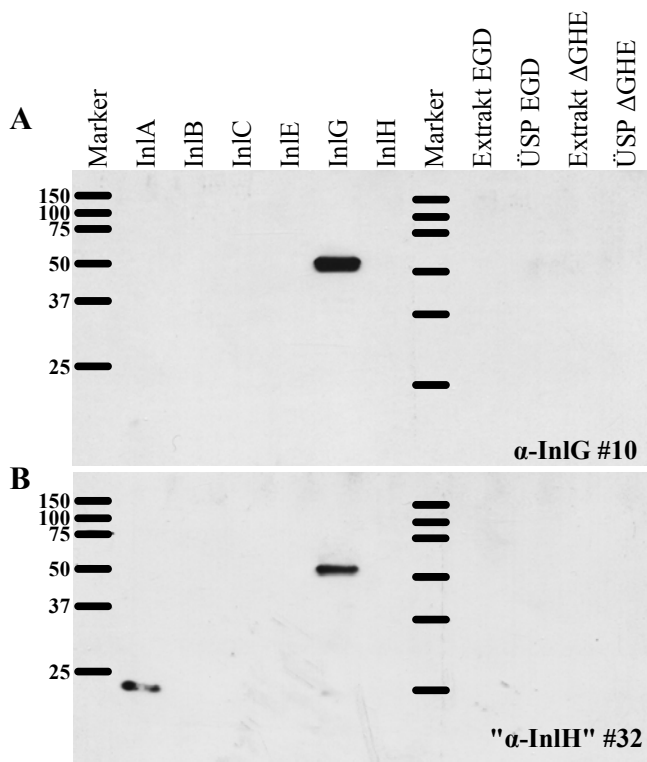


Abbildung 16. Test monoklonaler Antikörper gegen verschiedene His₆-markierte Internaline, Bakterienpräparate und Kulturüberstandsproteine (ÜSP) mittels Western Blot Analyse. Aufgetragen sind jeweils 200 ng der Internaline A bis H, sowie Zellwandextrakt aus 4 ODml *L. monocytogenes* EGD bzw. EGD ΔGHE.

A: Dekoration mit Überstand von Hybridoma-Klon G#10 (1:20, 1h) und Ziege-α-Maus-HRP (1:10k, 1h).

B: der selbe Blot wie oben, zusätzlich (ohne vorheriges Stripping) dekoriert mit Überstand von Hybridoma-Klon H#32 (1:10, 1 h) und Ziege-α-Maus-HRP (1:10k, 1h).

In beiden Fällen detektiert mit ECL Plus Western Blotting Detection System (Amersham) und Röntgenfilm (Konica Minolta).

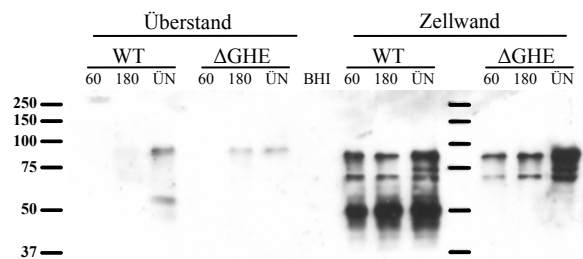
D.1.2 Expression der Internaline G, H und E

Um die Expression der Internaline InlG, InlH und InlE auf Proteinebene zu untersuchen, wurden Zellwandextrakte und Überstandsproteine aus *Listerien* hergestellt (C.11) und im Immunoblot (C.15) überprüft.

Da der polyklonale Antikörper gegen InlH viele Kreuzreaktionen gegen andere Internaline zeigte wurde er für einen ersten Überblick über die gesamte Internalinproduktion in *L. monocytogenes* (*Lm*) EGD_e verwendet. Als Negativkontrolle für die Expression von InlH diente dabei eine nicht isogene $\Delta inlG/H/E$ Deletionsmutante von *Lm* EGD.

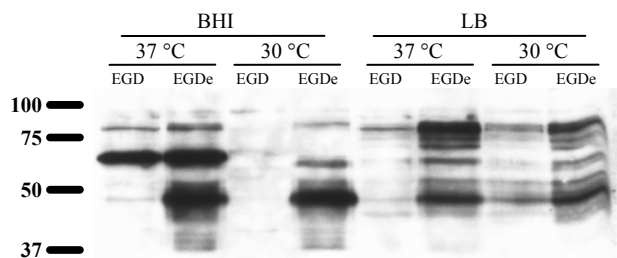
Die beiden Stämme wurden in BHI bei 37 °C kultiviert und in verschiedenen Wachstumsphasen wurden Zellwandextrakte und Überstandsproteine isoliert. Wie in Abbildung 17 zu sehen ist, wurden in allen Wachstumsphasen verschiedene Proteine in der Zellwand detektiert. Auffällig ist hierbei das Fehlen einer Bande mit einer Molekularmasse von etwa 50 kDa in der Deletionsmutante, die der erwarteten Größe von InlH entspräche. Bei den Überstandsproteinen waren erst in späteren Wachstumsphasen Proteinbanden zu erkennen, die im Vergleich zu den Banden aus der Zellwandextraktion ein etwas langsames Laufverhalten im Gel zeigten. Auch hier fehlte in der Deletionsmutante eine Bande bei 50 kDa.

Abbildung 17. Immunoblot mit Überstands- (je 0,3 ODml) und Zellwandproteinen (je 0,5 ODml) aus *L. monocytogenes* Wildtyp (WT) und der $\Delta inlG/H/E$ Deletionsmutante (ΔGHE) in verschiedenen Wachstumsphasen (60 Klett, 180 Klett und über Nacht (ÜN)). Als Negativkontrolle für die Überstände wurde BHI Kulturmedium aufgetragen. Dekoration erfolgte mit Maus- α -InlH Serum (1:1000) und Ziege- α -Maus-HRP (1:10k).



Um zu überprüfen, ob das Fehlen der 50 kDa Bande auf die Deletion des *inlG/H/E* Clusters oder die verschiedenen Bakterienstämme zurückzuführen ist, wurden die beiden Stämme *Lm* EGD und *Lm* EGD_e parallel unter verschiedenen Wachstumsbedingungen bei 30 und 37 °C, sowie in BHI und LB Medium kultiviert und die Zellwandproteine isoliert. Wie in Abbildung 18 zu erkennen ist, unterschieden sich die beiden Stämme bei 30 und 37 °C in BHI Medium signifikant in der Produktion des 50 kDa Proteins. *Lm* EGD_e produzierte davon eine um ein bis zwei dekadische Größenordnungen höhere Menge als *Lm* EGD. Das Vorhandensein dieses Proteins war dabei relativ unabhängig vom verwendeten Medium und der Temperatur, während andere Proteine hier weit stärkere Unterschiede zeigten. So war z.B. die ~65 kDa Bande bei 30 °C in BHI im Vergleich zu 37 °C in beiden Stämmen kaum noch vorhanden.

Abbildung 18. Immunoblot mit Zellwandproteinen (je 4 ODml) von *L. monocytogenes* EGD bzw. EGD_e aus verschiedenen Kulturbedingungen. Bakterien wurden über Nacht bei 30 °C bzw. 37 °C in BHI und LB Medium kultiviert. Dekoration erfolgte mit Maus- α -InlH Serum (1:1000) und Ziege- α -Maus-HRP (1:10k).



Um zu kontrollieren, welchen Beitrag die Internaline InlA und InlB zu diesem Bandenmuster leisten und um Internaline in *L. ivanovii* zu detektieren, wurden auch Zellwand- und Überstandsproteine aus *L. monocytogenes* EGD Δ inlA/B (Greiffenberg *et al.*, 1997) im Vergleich zu *Lm* EGDe, *Lm* EGD und *Lm* EGD Δ inlG/H/E, sowie *L. ivanovii* ATCC 19119 untersucht. Alle Bakterien wurden über Nacht in BHI bei 37 °C kultiviert. Zusätzlich wurde in *Lm* EGD Δ inlG/H/E und *Lm* EGD Δ inlA/B das Plasmid pERL_prfA* (Marr *et al.*, 2006) transformiert, das für PrfA* (G145S) (Ripio *et al.*, 1997b) kodiert, um eine Überexpression PrfA-abhängiger Gene zu erreichen, und somit auch die Expression von InlA und seinen Abbauprodukten zu verstärken, was eine Unterscheidung vom PrfA-unabhängig exprimierten InlH erleichtern sollte.

Wie in Abbildung 19 zu sehen ist, ließen sich aus *L. ivanovii* weit mehr Proteine aus der Zelloberfläche extrahieren als aus *L. monocytogenes* (Abbildung 19, A). Dies wurde auch in anderen Experimenten immer wieder festgestellt und galt ebenso für die Überstandsproteine. Einige Zellwandproteine von *L. ivanovii* ließen sich durch α -InlA und α -InlH Serum dekorieren (B+B', C), wobei vor allem ein Protein mit ~80 kDa (dekoriert von α -InlA und α -InlH, Pfeil #1) sowie drei weitere kleinere 60 bis 75 kDa schwere Proteine (dekoriert von α -InlA) detektiert wurden. Bei den Überstandsproteinen von *L. ivanovii* dekorierte α -InlC Serum (von Fredi Engelbrecht) neben kleinen Proteinen mit <30 kDa, welche zum Teil auch schon in der Literatur (Lingnau *et al.*, 1996) beschrieben wurden (D, Pfeil #2), auch ein 50 kDa Protein (D, Pfeil #3). Bei Dekoration mit α -InlH Serum wurden ausschließlich schwere Proteine >50 kDa markiert (Abbildung 19, E).

Das α -InlA Serum dekorierte in den Zellwandpräparaten von *L. monocytogenes* erwartungsgemäß auch eine ~80 kDa Bande, die höchstwahrscheinlich InlA repräsentiert und auch von α -InlH erkannt wird (Abbildung 19, B+B', Pfeil #4). In der Deletionsmutante *Lm* EGD Δ A/B ist InlA durch eine unvollständige Deletion (Greiffenberg *et al.*, 1997) auf ein rechnerisch 38 kDa großes Protein verkürzt. Dieses Fragment ist sowohl zellwandassoziiert, und darum verkürzt durch das Fehlen des C-Terminus nach Prozession des LPXTG-Motivs, in der Dekoration mit α -InlA und α -InlH zu detektieren (B+B', C, Pfeil #5), als auch ungekürzt bei den mit α -InlH dekorierten Überstandsproteinen (E, Pfeil #5b). Im Überstand ist InlA nur durch die Überexpression aufgrund von PrfA* zu detektieren (E, Pfeil #4b und #5b), die auch die PrfA-abhängige Produktion von InlC stark erhöht (Abbildung 19, D).

Die von α -InlA Serum dekorierten Banden der Größe ~80 und ~65 kDa in *Lm* EGD und *Lm* EGDe Zellwandextrakten (Abbildung 19, B+B', C, Pfeil #4) waren in *Lm* EGD Δ A/B erwartungsgemäß nicht mehr zu detektieren. Sehr schwach war jedoch immer noch ein ~50 kDa Protein *Lm* EGD Δ A/B zu erkennen, das anscheinend dem in *Lm* EGDe stärker exprimierten Protein entspricht (C, Pfeil #6). Eine sezernierte Variante dieses Proteins, bei dem der C-Terminus ohne Prozessierung eines LPXTG-Motivs noch vorhanden ist, scheint in den Überstandsproteinen von *Lm* EGDe detektierbar zu sein (E, Pfeil #6b).

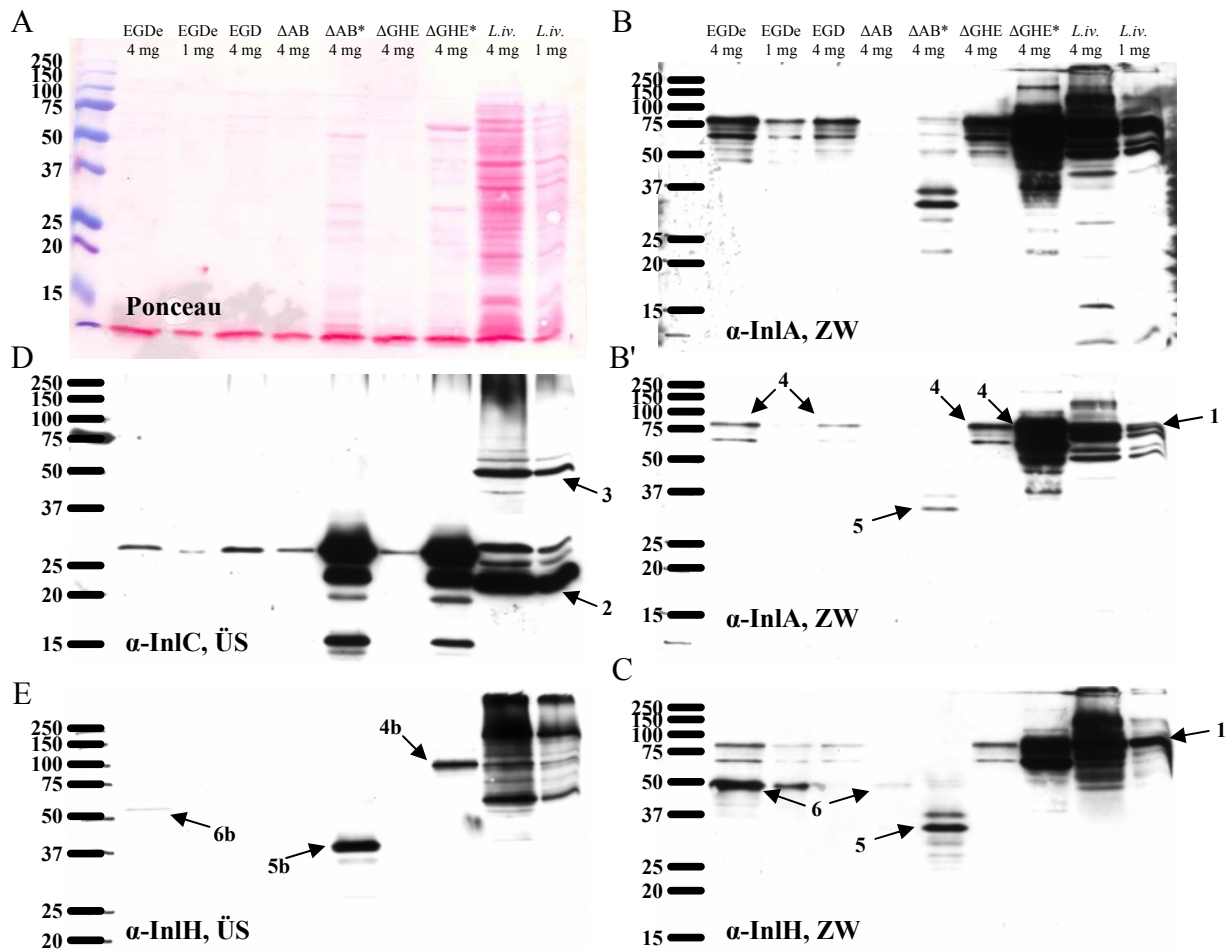


Abbildung 19. Immunoblot mit Zellwand- (ZW) und Überstandsproteinen (ÜS) aus *L. monocytogenes* EGDe Wildtyp (EGDe), *L. monocytogenes* EGD Wildtyp (EGD), den *L. monocytogenes* EGD Deletionsmutanten $\Delta inlG/H/E$ (ΔGHE) und $\Delta inlA/B$ (ΔAB), sowie *L. ivanovii* ATCC 19119 (*L. iv.*). Die mit * gekennzeichneten Deletionsmutanten (ΔGHE^* , ΔAB^*) tragen zusätzlich das Plasmid pERL_{prfA*} (Marr *et al.*, 2006), das für PrfA* (G145S) kodiert und zu einer Überexpression PrfA-abhängiger Gene führt.

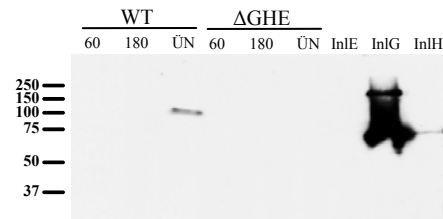
Zellwandproteine wurden durch Inkubation der Bakterien in 4 μ l 5 \times Probenpuffer (Laemmli, 1970) pro mg Bakterien bei 95 °C für 20 min extrahiert. Die Gewichtsangaben in der Abbildung stehen für die Menge an Bakterien von denen die aufgetragenen Proteine stammen. Überstandsproteine wurden mit TCA aus den dazugehörigen Überständen gefällt und mit Aceton gewaschen.

A: Ponceau S Färbung eines Blots mit Zellwandproteinen; **B+B'**: Dekoration des Blots aus A mit Kaninchen- α -InlA Serum (1:5k) und Ziege- α -Kaninchen-HRP (1:10k), Röntgenfilm länger (B) und kürzer (B') exponiert; **C:** Dekoration des gestrippten Blots aus B mit Maus- α -InlH Serum (1:1000) und Ziege- α -Maus-HRP (1:10k), Blot war vorher bereits gestrippt und mit α -InlE dekoriert worden (Ergebnis nicht gezeigt da kein Signal); **D:** Dekoration eines Blots mit Überstandsproteinen mit Kaninchen- α -InlC Serum (1:1000) (von Fredi Engelbrecht) und Ziege- α -Kaninchen-HRP (1:10k); **E:** Dekoration des gestrippten Blots aus D mit Maus- α -InlH Serum (1:1000) und Ziege- α -Maus-HRP (1:10k).

Nummerierte Pfeile weisen auf Banden hin, die im Text weiter erläutert werden.

In weiteren Versuchen wurde nach InlG in Überstand und Zellwand von Listerien gesucht. Wie in Abbildung 20 zu sehen ist, konnte nur im Überstand von über Nacht kultivierten *Lm* EGDe ein Protein detektiert werden, das eine Molekularmasse von ~100 kDa zeigte, was deutlich über der für InlG erwarteten Masse von 53 kDa lag.

Abbildung 20. Immunoblot mit Überstandsproteinen (je 2 ODml) aus *L. monocytogenes* EGD Wildtyp (WT) und der Δ inlG/H/E Deletionsmutante (Δ GHE) in verschiedenen Wachstumsphasen (60 Klett, 180 Klett und über Nacht (ÜN)), sowie His₆-markierte Internaline (je 0,5 µg). Dekoration erfolgte mit Maus- α -InlG Serum (1:1000) und Ziege- α -Maus-HRP (1:10k).



Die Suche nach InlE in Listerien verlief ohne Ergebnisse. Weder in Zellwandpräparaten noch Überstandsproteinen von *Lm* EGD oder EGDe konnte InlE nachgewiesen werden. Es ergaben sich auch keinerlei Kreuzreaktionen mit anderen Proteinen aus Bakterienpräparaten.

D.2 Interaktionspartner von Internalin C (InlC)

Jüngste Studien konnten zeigen, dass die von InlA abhängige Internalisierung *in vitro* unter anderem von InlC unterstützt wird (Bergmann *et al.*, 2002). InlC zeigt 50,9% Ähnlichkeit zum N-Terminus von InlB (siehe G.1.2 Abbildung 46), das als Wachstumsfaktor analogon agiert. In den Versuchen von Birgit Bergmann war die Infektion von Caco-2 Zellen, die Listerien hauptsächlich InlA abhängig internalisieren, vor allem zu einer bestimmten Wachstumsphase, wenn die Zellen frisch ausgesät und semikonfluent waren, durch InlC zu verbessern. Da in dieser Phase der Rezeptor für den epidermalen Wachstumsfaktor EGF noch abundant ist, wurde vermutet, dass InlC evtl. mit diesem Rezeptor interagiert und dadurch ähnlich wie InlB die Phagozytose über die Aktivierung eines solchen Rezeptors induziert.

Versuche eine Interaktion von InlC mit dem EGF-Rezeptor mittels SPR (Surface Plasmon Resonance, zusammen mit Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Walter Sebald) nachzuweisen schlugen jedoch fehl. Der Versuch (mit Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Manfred Scharl) die Marker intrazellulärer Signaltransduktion in hybriden Xiphophoruszellen, die ein Hybrid aus humanen EGF-Rezeptor (HER) und der Rezeptor Tyrosin Kinase Xmrk besitzen (Winkler *et al.*, 1994), durch Zugabe von rekombinantem His₆-markiertem InlC zu aktivieren, erbrachte ein negatives Ergebnis.

Frühere Versuche von Silke Hom einen Interaktionspartner von InlC über ein Yeast-Two-Hybrid-System zu finden, ergaben Ubiquitin und α -Makroglobulin (ein Bluteiweiß aus der Gruppe der Alpha-2-Globuline, Protease-Inhibitor mit breitem Wirkungsspektrum) als mögliche Kandidaten (Silke Hom, Dissertation). Dies konnte weder durch Overlay-Assays (Methode siehe Cabanes *et al.*, 2005) noch chemisches Crosslinking bestätigt werden (Daten nicht gezeigt).

D.2.1 Untersuchungen der Zelladhärenz mittels Hexosaminidase Assay

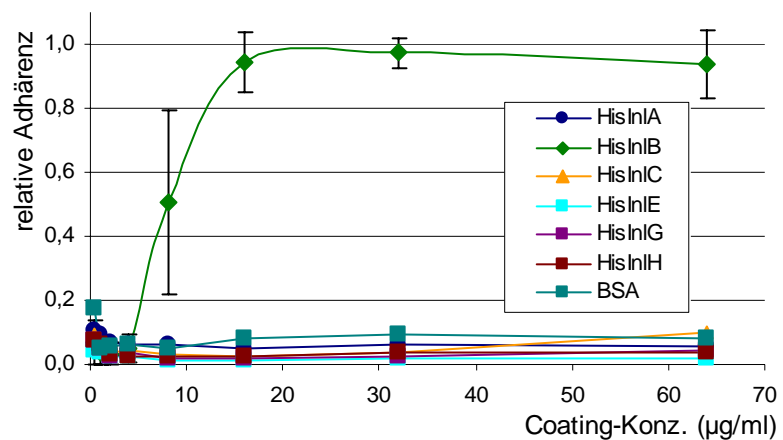
Um festzustellen, ob Internalin C einen Bindungspartner auf der Zelloberfläche von humanen Zellen besitzt, wurde ein Assay zur Messung der Zelladhärenz verwendet (siehe C.17). Hierzu wurde suspendierten Zellen die Gelegenheit gegeben an in einer Mikrotiterplatte gebundene Proteine zu adhären. Nicht adhären Zellen wurden abgewaschen und die Menge der adhären Zellen durch die Aktivität der in Zellen ubiquitär verbreiteten Hexosaminidase gemessen.

D.2.1.1 HeLa Zellen

HeLa Zellen (siehe C.2) wurden bis zu semikonfluenter Dichte für ein bis zwei Tage kultiviert und dann für den Hexosaminidase Assay in Medium mit 0,4% (w/v) BSA suspendiert. MaxiSorp™ Mikrotiterplatten wurden mit den rekombinanten His₆-markierten Internalinen InlA, InlB, InlC, InlE, InlG und InlH, sowie mit BSA als Negativkontrolle beschichtet. Die verwendeten Konzentrationen bei der Beschichtung waren 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1 und 0,5 µg/ml.

Wie in Abbildung 21 zu sehen, zeigten HeLa Zellen nur eine Affinität für His-InlB. Bereits eine geringe Beschichtungskonzentration (etwa 8 µg/ml, entspricht 0,1 µM) genügte, um 50% der maximalen Adhärenz zu erreichen. Etwa 16 µg/ml (bzw. 0,2 µM) genügten nahezu für die maximal messbare Adhärenz. Auch in hoher Konzentration zeigten weder His-InlA noch His-InlC oder die anderen eingesetzten Internaline die Fähigkeit HeLa Zellen zu binden.

Abbildung 21. Messung der Zelladhärenz mittels Hexosaminidase Assay. HeLa Zellen wurden zu semikonfluenter Dichte kultiviert, suspendiert und in einer mit multiplen Proteinen (His-InlA, His-InlB, His-InlC, His-InlE, His-InlG, His-InlH und BSA) verschiedener Konzentration beschichteten MaxiSorp™ Mikrotiterplatte inkubiert. Anschließend wurden die noch adhärierenden Zellen lysiert und die Aktivität der lysosomalen Hexosaminidase gemessen. Die Hexosaminidase-Aktivität ist proportional zur Menge der adhärierenden Zellen. Die Adhärenz ist in willkürlichen Einheiten angegeben: 1,0 entspricht der jeweils stärksten gemessenen Aktivität in einem unabhängigen Versuch. Diese Grafik fasst drei unabhängige Versuche zusammen.



D.2.1.2 HepG2 Zellen

HepG2 Zellen (siehe C.2) wurden in mittlerer Dichte (höchstens 50% der Fläche sind besiedelt) zwei bis vier Tage kultiviert und dann für den Hexosaminidase Assay in Medium mit 0,4% (w/v) BSA suspendiert. MaxiSorp™ Mikrotiterplatten wurden mit den rekombinanten His₆-markierten Internalinen InlA, InlB, InlC, InlE, InlG und InlH, sowie mit BSA als Negativkontrolle beschichtet. Die Proteinverdünnungen wurden im Gegensatz zu den Versuchen mit HeLa Zellen (D.2.1.1) nun jedoch nicht auf Massenkonzentrationen, sondern auf molare Konzentrationen eingestellt. Die verwendeten Konzentrationen bei der Beschichtung reichten von 16 bis 1/128 µM (Verdünnungsschritte mit Faktor 2).

Wie in Abbildung 22 zu sehen ist, zeigten HepG2 Zellen vorwiegend eine Affinität für His-InlB. Bereits eine geringe Beschichtungskonzentration (0,125 µM und weniger) genügte für eine signifikant gegenüber dem Hintergrund erhöhte Adhärenz. Bei zwei Tage alten Zellen war auch eine Bindung an InlA zu beobachten, die jedoch etwa um den Faktor 4 schwächer war als die Bindung an InlB. Bei älteren Zellen war diese Bindung nicht zu messen. Die übrigen getesteten Proteine banden auch bei hohen Konzentrationen keine Zellen.

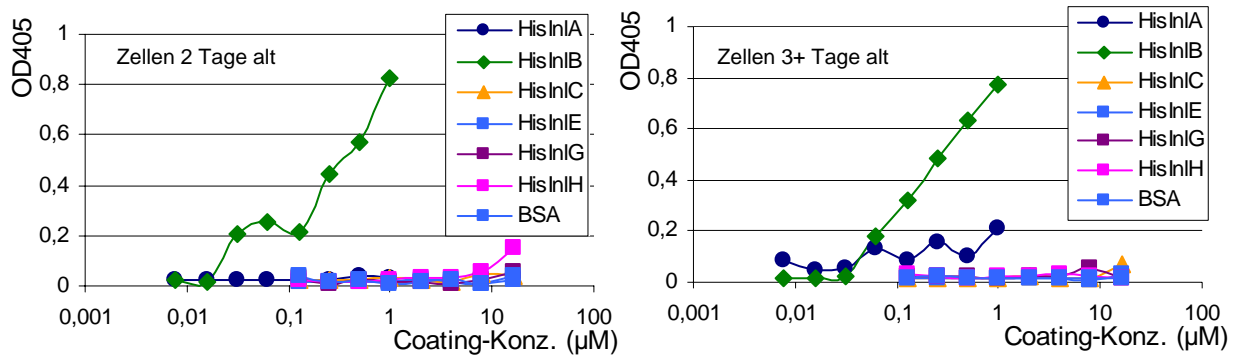
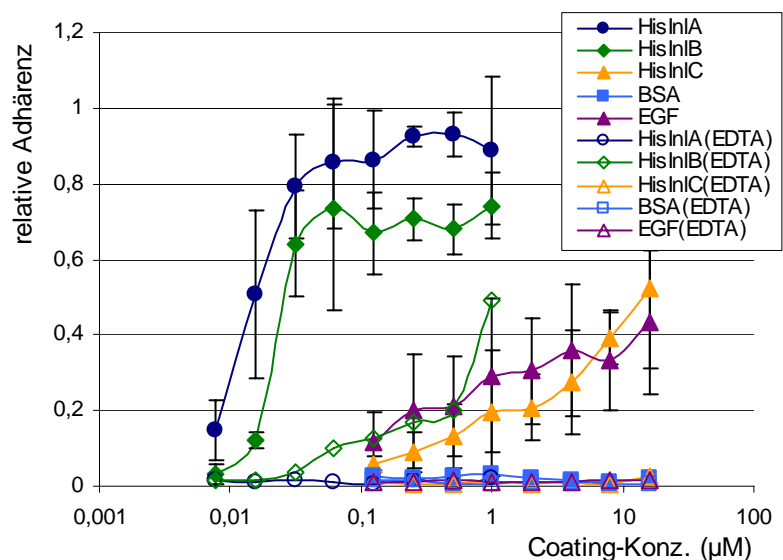


Abbildung 22. Messung der Zelladhärenz mittels Hexosaminidase Assay. HepG2 Zellen wurden zwei (*linke Grafik*) bzw. über drei Tage (*rechte Grafik*) lang zu semikonfluenter Dichte kultiviert, suspendiert und in einer mit multiplen Proteinen (His-InlA, His-InlB, His-InlC, His-InlE, His-InlG, His-InlH und BSA) verschiedener Konzentration beschichteten MaxiSorp™ Mikrotiterplatte inkubiert. Anschließend wurden die noch adhärenenden Zellen lysiert und die Aktivität der lysosomalen Hexosaminidase gemessen. Die Hexosaminidase-Aktivität ist proportional zur Menge der adhärenenden Zellen. Als Maß für die Adhärenz ist hier die gemessene OD₄₀₅ angegeben. Gezeigt sind zwei beispielhafte Versuche.

D.2.1.3 Caco-2 Zellen

Caco-2 Zellen (siehe C.2) wurden zu semikonfluenter Dichte (70-80% der Fläche sind besiedelt) kultiviert und dann für den Hexosaminidase Assay in Medium mit 0,4% (w/v) BSA suspendiert. MaxiSorp™ Mikrotiterplatten wurden mit den His₆-markierten Proteinen InlA, InlB und InlC, sowie EGF (Epidermal Growth Factor), und BSA als Negativkontrolle beschichtet. Die verwendeten Konzentrationen bei der Beschichtung reichten von 16 bis 1/128 µM (Verdünnungsschritte mit Faktor 2).

Abbildung 23. Messung der Zelladhärenz mittels Hexosaminidase Assay. Caco-2 Zellen wurden einen Tag lang zu semikonfluenter Dichte (70-80%) kultiviert, suspendiert und in einer mit multiplen Proteinen (His-InlA, His-InlB, His-InlC, EGF und BSA) verschiedener Konzentration beschichteten MaxiSorp™ Mikrotiterplatte in Abwesenheit und Gegenwart von 10 mM EDTA inkubiert. Anschließend wurden die noch adhärenenden Zellen lysiert und die Aktivität der lysosomalen Hexosaminidase gemessen. Die Hexosaminidase-Aktivität ist proportional zur Menge der adhärenenden Zellen. Die Adhärenz ist in willkürlichen Einheiten angegeben: 1,0 entspricht der jeweils stärksten gemessenen Aktivität in einem unabhängigen Versuch. Diese Grafik fasst drei unabhängige Versuche zusammen.



Die Adhärenz ist in willkürlichen Einheiten angegeben: 1,0 entspricht der jeweils stärksten gemessenen Aktivität in einem unabhängigen Versuch. Diese Grafik fasst drei unabhängige Versuche zusammen.

Caco-2 Zellen adhärten am stärksten an InlA. Die Adhärenz erreichte bei etwa 16 nM Beschichtungskonzentration 50% ihres maximalen Wertes. Die Bindung an InlB, InlC und EGF zeigte sich stark vom Alter der Kultur und der erreichten Zelldichte abhängig. Adhärenz an InlC war am stärksten bei Zellen, die nur einen Tag nach Aussaat semikonfluent gewachsen waren. Im Falle von InlC und EGF wurde bei jeweils etwa 16 µM Beschichtungskonzentration eine 50-prozentige Adhärenz erreicht. In Gegenwart von 10 mM

EDTA war mit einer Ausnahme keine Bindung mehr zu beobachten. Die Adhärenz an InIB wurde durch EDTA nur teilweise beeinflusst (siehe Abbildung 23).

Die Internaline InIE, InIG und InIH waren in keinem Versuch (bei verschiedenen Zelldichten und Zeit nach Splitten der Zellen) in der Lage Caco-2 Zellen zu binden (Daten nicht gezeigt).

D.3 Untersuchung listerieller Promotoren

D.3.1 Aufreinigung von PrfA Proteinen

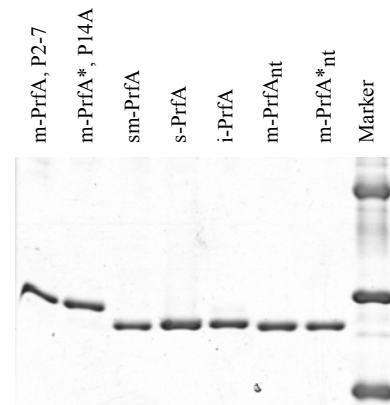
Zur Untersuchung PrfA-abhängiger Promotoren in zellfreien *in vitro* Systemen wurden diverse PrfA Proteine benötigt. Dazu wurden in dieser Arbeit aus dem pQE30 Vektor und den proteinkodierenden Sequenzen für PrfA von *L. monocytogenes* und *L. seeligeri* die Plasmide pQE_sm-PrfA und pQE_s-PrfA kloniert und in *E. coli* M15 transformiert. Die in diesen Bakterien überexprimierten His₆-markierten Proteine wurden anschließend aufgereinigt (siehe C.10).

Tabelle 3 zeigt alle verwendeten PrfA Proteine, ihre in dieser Arbeit verwendeten Namen, die Herkunft und gibt eine kurze Beschreibung. All diese Proteine konnten sehr sauber isoliert werden. Abbildung 24 zeigt eine Auswahl der verwendeten Proteine in einer SDS-PAGE. Die Einführung einer Enterokinaseschnittstelle (MRGSHHHHHHGSACDDDDK..., Erkennungssequenz in Fettschrift) zeigt einen weit größeren Einfluss auf das Laufverhalten als die alleinige Addition einer His₆-Markierung (MRGSHHHHHH...); Proteine mit Enterokinaseschnittstelle wandern im Gel deutlich langsamer.

Name	Beschreibung	Herkunft, Hersteller
m-PrfA _{nt}	wildtypisches PrfA von <i>L. monocytogenes</i>	Stefanie Müller-Altrock & Nico Marr
m-PrfA* _{nt}	wie m-PrfA _{nt} , aber mit G145S Substitution	Stefanie Müller-Altrock & Nico Marr
m-PrfA	wildtypisches PrfA von <i>L. monocytogenes</i> mit N-terminaler His ₆ -Markierung und anschließender Enterokinaseschnittstelle	Regine Böckmann & diese Arbeit
m-PrfA*	wie m-PrfA, aber mit G145S Substitution	Stefanie Müller-Altrock
s-PrfA	wildtypisches PrfA von <i>L. seeligeri</i> mit N-terminaler His ₆ -Markierung	diese Arbeit
sm-PrfA	wie s-PrfA, doch C-terminale 38 AS entsprechen denen von m-PrfA (Hybridprotein)	diese Arbeit
i-PrfA	wildtypisches PrfA von <i>L. ivanovii</i> mit N-terminaler His ₆ -Markierung	Stefanie Müller-Altrock

Tabelle 3. Übersicht über die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten PrfA Proteine.

Abbildung 24. Mit Coomassie Blau gefärbte SDS-PAGE (12% Acrylamid) der verwendeten PrfA-Proteine. Aufgetragen wurde jeweils 1 µg. Die Markerbanden repräsentieren Proteine der Größen 45, 31 und 21,5 kDa.



D.3.2 Internalin Promotoren von *L. ivanovii*

L. ivanovii besitzt ebenso wie *L. monocytogenes* eine Reihe von Proteinen, die zur Familie der Internaline gezählt werden. Im Gegensatz zum humanpathogenen *L. monocytogenes* besitzt das tierpathogene Bakterium *L. ivanovii* eine Vielzahl von so genannten kleinen Internalinen. Mit Ausnahme von *i-inlB1*, das für ein großes Internalin kodiert, besitzen diese Internalin-Promotoren PrfA-Boxen und werden PrfA-abhängig reguliert (siehe Tabelle 4), wie für einige der Internaline von *L. ivanovii* bereits *in vivo* gezeigt wurde (Domínguez-Bernal *et al.*, 2006; Engelbrecht *et al.*, 1998b).

In dieser Arbeit wurden einige Promotoren dieser Internaline nun in einem zellfreien System mit Hilfe der "run off" *in vitro* Transkription (C.21) mit listerieller RNA-Polymerase (C.20) weiter untersucht. Hierzu wurden die jeweiligen Promotorsequenzen in den Vektor pUC18 kloniert (C.3, C.4.3). Anschließend wurde die Vektor-DNA stromabwärts des Promotors durch Restriktionsverdau linearisiert und als Template eingesetzt. Ferner wurde untersucht, wie sich die Anwesenheit verschiedener PrfA Proteine (vorwiegend m-PrfA, m-PrfA* und i-PrfA) auf die Transkriptionsaktivität auswirkt.

Gen	PrfA-Box (mismatches)	Spacer	-10-Box
<i>i-inlA</i>	TTAACA TA agTaca (3)	22 bp	TATTAT
<i>i-inlB2</i>	TTAA ct TT TG TTat (2)	22 bp	TAGAAT
<i>i-inlL</i>	TTAA ct TT TG TTat (2)	22 bp	TAAAAT
<i>i-inlK</i>	a TA act TT TG TTat (3)	22 bp	TAAAAT
<i>i-inlB1</i>	c TA act TT TG TTat (3)	22 bp	TAAAAT
<i>i-inlJ</i>	TTAA ct TT TG TTat (2)	22 bp	TACAAT
<i>i-inlI</i>	TTAACA TT TG TTat (1)	22 bp	TAAAAT
<i>i-inlH</i>	TTAA ct TT TG TTat (2)	21 bp	TAAAAT
<i>i-inlG</i>	TTAA ct TT TG TTgt (3)	22 bp	TAAAAT
<i>i-inlF</i>	TTAA ct TT TG TTat (2)	22 bp	TAGAAT
<i>i-inlE</i>	TTAACA TT TG TTAA (0)	22 bp	TATGAT
<i>i-inlC</i>	TTAAC g C T TG TTAA (1)	22 bp	TAACAT
<i>i-inlD</i>	TTAA ct TT TG TTat (2)	22 bp	TATTAT

Tabelle 4. Promotorelemente PrfA-regulierter Internalingene von *L. ivanovii*. Die Reihenfolge entspricht der Organisation im Genom. Gene aus unterschiedlichen Clustern sind durch Linien getrennt. Abweichungen von der Konsensussequenz der PrfA-Box sind durch kleine Buchstaben in Fettschrift angezeigt. Der Vollständigkeit halber sind auch Elemente einer Sequenz von *i-inlB1* angegeben (grau hinterlegt), die einem PrfA-abhängigen Promotor ähnelt (modifiziert und erweitert nach Altrock, 2002).

Wie in Abbildung 25 zu sehen ist, zeigen die Promotoren von *i-inlC*, *i-inlE*, *i-inlF*, *i-inlI* und *i-inlK* (bezeichnet als *Pi-inlC*, *Pi-inlE*, *Pi-inlF*, *Pi-inlI* und *Pi-inlK*) alle eine durch PrfA zu verstärkende Transkription. Bei *Pi-inlK*, dessen PrfA-Box drei Abweichungen zur Konsensussequenz zeigt, konnte die Transkription nur durch höhere Konzentrationen von PrfA gesteigert werden. Während z.B. die Transkription bei *Pi-inlC* und *Pi-inlC* in Gegenwart von 5,5 nM m-PrfA* gegenüber der Basistranskription um den Faktor 11 (*Pi-inlC*) bzw. 7 (*Pi-inlC*) erhöht ist, wird bei *Pi-inlK* selbst mit 22 nM m-PrfA* nur knapp ein Faktor von 3 erreicht (Messungen der Transkriptmengen erfolgten mit ImageQuant™, siehe C.23).

In der Promotorregion von *i-inlB1* sind Elemente zu finden, welche einem PrfA-abhängigen Promotor ähnlich sind und die denen von *i-inlK* bis auf eine Base gleichen (siehe Tabelle 4). Die Spacerregion und vor allem der Bereich stromaufwärts der "PrfA-Boxen" zeigen aber größere Unterschiede (siehe Abbildung 26). Versuche von Stefanie Müller-Altrock zeigten jedoch *in vivo* und *in vitro*, dass *i-inlB1* nicht PrfA-abhängig transkribiert wird (Domínguez-Bernal *et al.*, 2006; Stefanie Müller-Altrock, persönliche Mitteilung).

Bei den Promotoren von *inlC* und *i-inlC* lassen sich Unterschiede in der Anzahl der Transkripte feststellen. Während beim PrfA-abhängigen Promotor von *inlC* vier Transkripte zu erkennen sind, die sich in ihrer Länge jeweils nur um ein oder zwei Nukleotide unterscheiden, sind bei *i-inlC* nur zwei deutlich zu sehen (siehe Abbildung 25). Die Sequenzen der beiden Promotoren unterscheiden sich allerdings weder in den Promotorelementen (PrfA-Box und -10-Box) noch im Bereich des Transkriptionsstarts, sondern vor allem in den flankierenden Regionen um die PrfA-Box (siehe Abbildung 27).

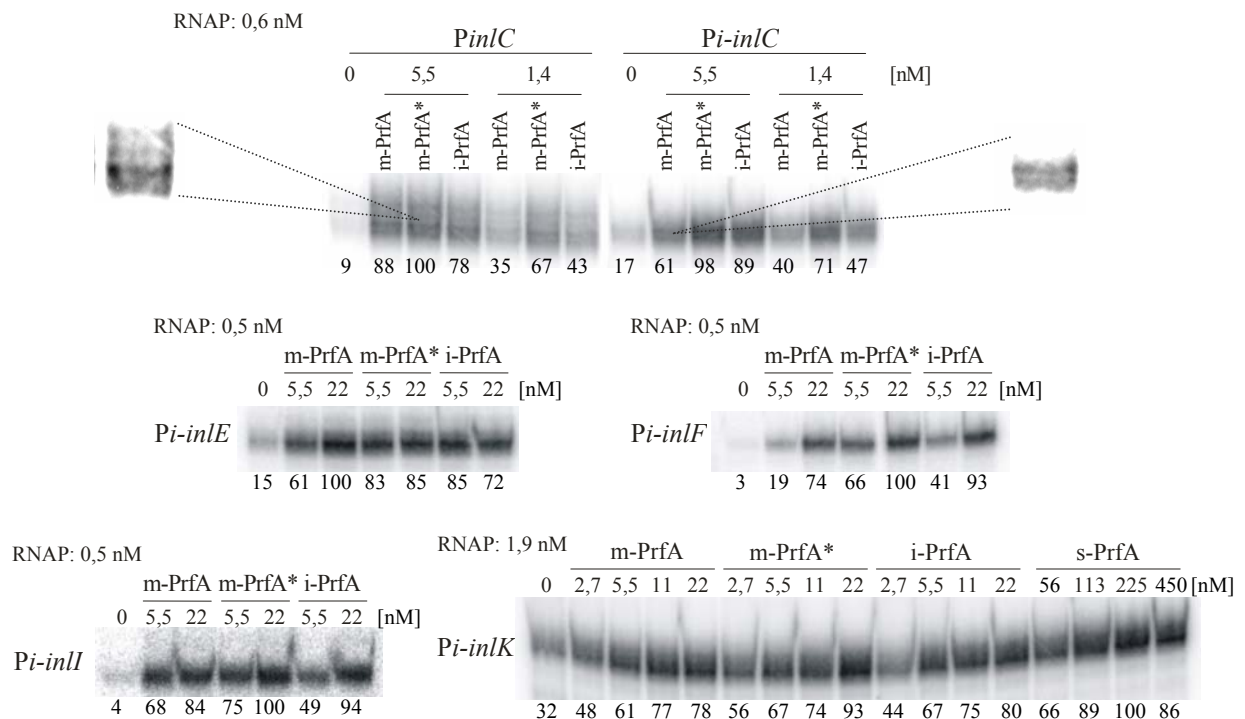
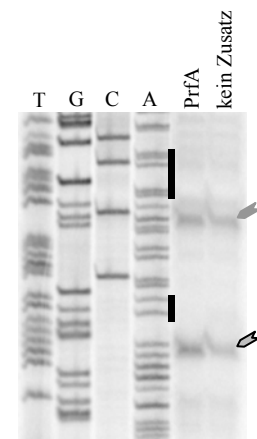


Abbildung 25. "Run off" *in vitro* Transkription mit verschiedenen Internalin Promotoren. Transkription wurde aktiviert mit den PrfA Proteinen m-PrfA, m-PrfA* und i-PrfA (sowie s-PrfA in Falle von *Pi-inlK*). Es wurden jeweils 16 nM Template DNA verwendet. Markierung der mRNA erfolgte mit [α^{32} P]-CTP. Konzentrationen von PrfA und RNA Polymerase (RNAP) sind jeweils in der Abbildung angegeben. Zahlen unter den Banden geben die relative Aktivität an (gemessen mit ImageQuant™). Die jeweils stärksten gemessenen Aktivitäten in einem Gel wurden dabei auf Wert 100 gesetzt.

Abbildung 28. *Rechts*: Primer Extension Analyse des Promotors von *i-inlE*, unter dem Einfluss von PrfA (27 nM). Die mRNA wurde in einer "run off" *in vitro* Transkription mit 1,3 nM RNA Polymerase gewonnen. Promotorelemente in der Sequenz werden durch schwarze Balken angezeigt; Transkripte durch Pfeile. *Unten*: Sequenz der in pUC18 klonierten Promotorregion (Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen). Promotorelemente des PrfA-abhängigen Promotors (PrfA-Box und -10-Box) sind schwarz, Startsites der detektierten Transkripte grau hinterlegt. Die Protein kodierende Sequenz ist in Großbuchstaben angegeben.



```

gaattcctatacacatttataatgtttatctaaaaagcgggaatcgtttaacatttgtaa|tgacgag|gaatttatatttcaag|tatgat|gt
gta|tatagagatgaggaaaatggatgtgaaagaatttgaatgaagagaaaatttccagaaaggttccgcgatgaaaatttctctttctaat
tttttaaggagtgaaatcaGTGAGAAAAAGTAATTGGATCC

```

D.3.2.2 *inlA*-Promotor von *L. monocytogenes* und *L. ivanovii*

Durch Vergleiche des kürzlich sequenzierten Genoms von *L. ivanovii* PAM 55 *) mit dem von *L. monocytogenes* EGDe konnten verschiedene offene Leserahmen (ORF) identifiziert werden, die für Internalin-ähnliche Proteine kodieren. Hierbei zeigte sich, dass der ORF mit der Bezeichnung IPF 930.1 hohe Ähnlichkeit, mit dem Gen *inlA* von *L. monocytogenes* hat. Auf Proteinebene besteht eine Ähnlichkeit von 76,7% (bei Verwendung der Matrix BLOSUM 62) und 68,0% Identität (siehe G.1.2 Abbildung 47). Auch im Promotorbereich existieren große Ähnlichkeiten. Beide Gene besitzen die Merkmale eines SigB- und eines PrfA-abhängigen Promotors (siehe Abbildung 30, unten). In "run off" *in vitro* Transkriptionsstudien und mittels Primer Extension wurde der Promotor dieses Gens (im Folgenden *i-inlA* genannt) nun auch experimentell im direkten Vergleich mit dem Promotor von *inlA* weiter untersucht. Die Promotorregionen von *inlA* (*PinlA*) und *i-inlA* (*Pi-inlA*) wurden in pUC18 kloniert (siehe C.4.3, C.3 und G.1.1) und die linearisierten Plasmide als Template in "run off" *in vitro* Transkriptionen eingesetzt. Um eine etwaige Spezies-spezifische Anpassung der PrfA-abhängigen Promotoren an PrfA Proteine zu untersuchen, wurde die Transkription in Gegenwart von m-PrfA, m-PrfA* und i-PrfA durchgeführt. Da das hierbei eingesetzte radioaktiv markierte Nukleotid im Unterschuss vorliegt, kann keine Transkription erfolgen, wenn dieses Nukleotid in den ersten drei bis vier transkribierten Basen vorkommt. Deshalb wurden Experimente mit verschiedenen radioaktiv markierten Nukleotiden durchgeführt, um einen Überblick über alle möglichen Transkripte dieser Promotorregionen zu erhalten.

Wie in Abbildung 29 zu sehen ist, erhielt man mit den beiden Promotoren jeweils sehr unterschiedliche Transkripte bei der Verwendung eines bestimmten Nukleotids. Bei [α^{32} P]-CTP waren mit beiden Promotoren wie erwartet die meisten Transkripte zu detektieren, da die Promotorbereiche der untersuchten Gene relativ C-arm sind. Bei *PinlA* war sowohl ein längeres PrfA-unabhängig transkribiertes Produkt zu erkennen, als auch ein etwas kürzeres PrfA-abhängig transkribiertes Produkt, das auch bei Verwendung von [α^{32} P]-ATP synthetisiert wurde. Bei *Pi-inlA* ergab sich ein ähnliches Bild, jedoch war die Abhängigkeit

*) Laboratoire GMP, Institut Pasteur, Département de Biologie Moléculaire in Kooperation mit Pascale Cossart, Unité des Interactions Bactéries-Cellules, Institut Pasteur, mit José-Antonio Vazquez-Boland, Universidad de Leon, und mit dem Kompetenzzentrum PathoGenoMik Würzburg (Werner Goebel and Jürgen Kreft, Universität Würzburg, Trinad Chakraborty, Universität Giessen, Jürgen Wehland, Braunschweig)

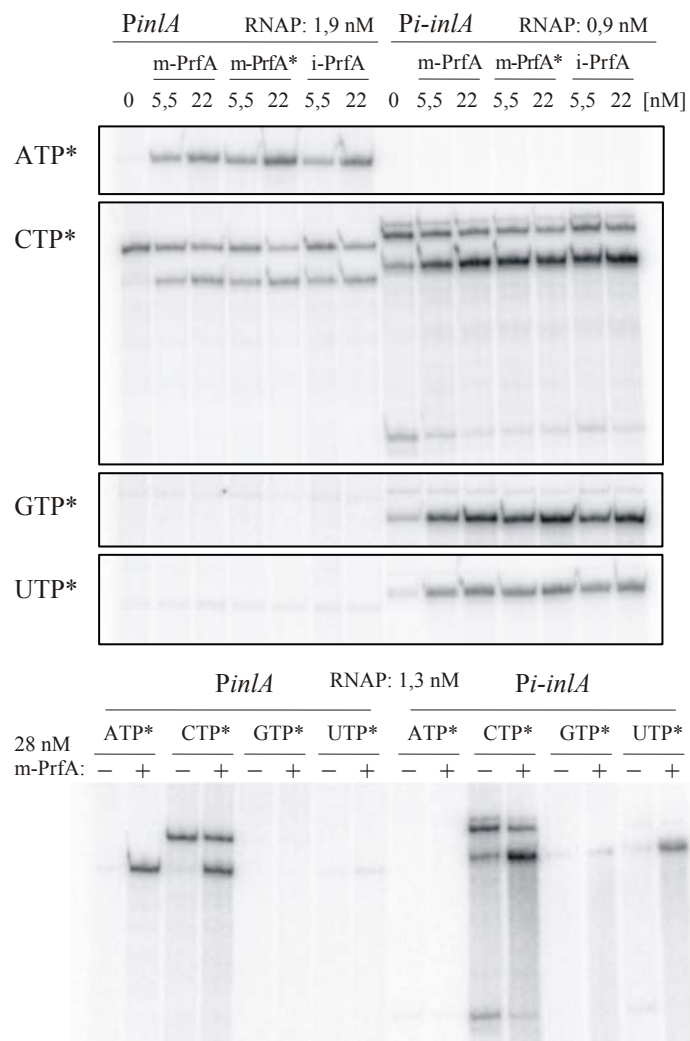
von PrfA weniger deutlich, da das Basislevel der Transkription beim PrfA-abhängigen Promotor weit höher war. Ein solches Transkript konnte auch bei Verwendung von [α^{32} P]-GTP und [α^{32} P]-UTP detektiert werden, wobei insbesondere bei letzterem die PrfA-Abhängigkeit deutlicher zu erkennen war. Bei *Pi-inlA* gab es mit [α^{32} P]-CTP zudem ein kurzes Transkript, das von PrfA negativ reguliert wurde.

Eine Anpassung der Promotoren an die PrfA Proteine war nicht zu erkennen. Bemerkenswert ist jedoch die Transkription eines PrfA-abhängigen Produkts von *Pi-inlA* bei Unterschuss von GTP, da gezeigt werden konnte, dass solche Promotoren abundantes GTP benötigen (Luo *et al.*, 2004). Bei direktem Vergleich der Ansätze mit verschiedenen Nukleotiden in einem Gel (Abbildung 29, unten) war jedoch eine vergleichsweise geringe Produktmenge dieses Transkripts zu erkennen.

Abbildung 29. "Run off" *in vitro* Transkription mit den Promotoren von *inlA* (*PinlA*) und *i-inlA* (*Pi-inlA*) unter Verwendung verschiedener [α^{32} P]-markierter Nukleotide. Es wurden jeweils 16 nM Template DNA verwendet und die Transkription in Abhängigkeit von den PrfA Proteinen m-PrfA, m-PrfA* und i-PrfA untersucht. Die Konzentrationen der PrfA Proteine und der RNA Polymerase (RNAP) sind jeweils in der Abbildung angegeben.

Oben: in vier getrennt durchgeführten *in vitro* Transkriptionsexperimenten wurden die gleichen Konzentrationen der drei getesteten PrfA Proteine verwendet und jeweils die Art des [α^{32} P]-markierten Nukleotids ausgetauscht.

Unten: in einem *in vitro* Transkriptions Experiment wurden die vier [α^{32} P]-markierten Nukleotide ohne und mit einer konstanten Menge m-PrfA eingesetzt.



Eine nähere Untersuchung erfolgte mittels Primer Extension Analyse. Dazu wurde zunächst in einer "kalten" *in vitro* Transkription (C.21.2.3) – bei der alle Nukleotide abundant sind – mRNA synthetisiert und diese anschließend in einer Primer Extension (siehe C.4.4, C.22) als Template eingesetzt. Da sowohl der PrfA- als auch der SigB-abhängige Promotor untersucht werden sollten, wurde für diesen Zweck eine RNA-Polymerase aus einer *L. monocytogenes* $\Delta prfA \Delta sigB$ Deletionsmutante aufgereinigt (siehe C.20, diese Polymerase wurde dann auch für alle anderen Experimente verwendet), um eine Kontamination mit PrfA und SigB zu verhindern.


```

1
mono (1) CAAaatggccccctcctttgattagtagtatattcctatctta-aagtgacttttatgttgaggcattaacatttggttaacga
ivan (1) CATtattatttctcctttgatttgatataagcctatctta-taaataatttcacatcgaatctttaacatttggttaaaga
seel (1) CATaattttccctccttcaaatattgtatagcttatcttagtcaacattaacatatttaagcattaacatttggttaatga

81
mono (80) cgataaagggacagcaggactagaataaagctataaagcaagcatataatattgcgtttc--atctttagaagcgaattt
ivan (80) cgttaaagttt-actagatttacaataaaaccataaaacaaaggatataatattgcgtttctaaatcttgaagcgaatct
seel (81) catcaaaagttattaaagactacaataatggtgttaaacaggagctataatattgcgtttc-aagctaataatgaagcgaat
```

161 240

```

mono (158) cgccaatattataattatcaaaaagagaggggtggcaaacggatatttggcattattaggttaaaaaatgtagaaggagagt
ivan (159) cgtcaatattatattgg---aaggagaggggtggaacataactacttggcattattaggttaaaaaatgtagaaggagagt
seel (160) cgccaatattattattttgaaatggggaggtggaagaaccagtttagtggaagaatg----aaaaagtgaaggggaga

241
mono (238) gaaacccATG
ivan (236) gaaacccATG
seel (235) gacaatgATG
```

Abbildung 31. ClustalW der Regionen zwischen den Protein kodierenden Sequenzen von *plcA* und *hly* aus *L. monocytogenes* (mono), *L. ivanovii* (ivan) und *L. seeligeri* (seel). Elemente der PrfA-abhängigen Promotoren (die gemeinsame PrfA-Box und -10-Boxen) sind schwarz hinterlegt, Startcodons der Translation sind in Großbuchstaben angegeben.

Die von Mengaud *et al.* angegebenen Elemente für den zweiten PrfA-abhängigen Promotor (-35- und -10-Box von P2) sind dunkelgrau (Mengaud *et al.*, 1989), die von Domann *et al.* angegebenen Elemente für den PrfA-unabhängigen Promotor (-35- und -10-Box von P3) in *L. monocytogenes* hellgrau hinterlegt (Domann *et al.*, 1993).

Diese Versuche zeigten (Abbildung 32), dass die drei Sequenzen trotz ihrer hohen Ähnlichkeit von 92,8% (siehe G.1.2 Abbildung 48) einige Unterschiede in den Transkripten aufweisen. Alle zeigen wie erwartet PrfA-Abhängigkeit, doch ist bei *i-Phly* und *s-Phly* ein höheres Niveau an Basistranskription zu sehen, das bei *m-Phly* nicht erkennbar ist. Durch einseitige Linearisierung konnte *i-Phly* ein kleines Transkript zugeordnet werden, das schätzungsweise 70 Nukleotide kürzer ist als das PrfA-abhängige *i-Phly* Transkript, und das bei Zugabe von PrfA verschwindet (Abbildung 32, grauer Pfeil). Der Promotor *s-Phly* besitzt offensichtlich zwei Startsites, die in gleichem Maße verwendet werden. Die Transkription von *s-PplcA* lässt sich durch PrfA besser verstärken, als die von *m-* und *i-PplcA*. Zwei Transkripte des *s-PplcA*, ein größeres und ein kleineres, werden durch PrfA negativ reguliert (Abbildung 32, schwarze Pfeile). Bei allen drei Spezies ist eine Vielzahl von nahezu gleich großen Transkripten von *PplcA* zu sehen. Während *s-PplcA* und *s-Phly* in etwa gleichem Maße transkribiert werden, überwiegt bei den anderen beiden Spezies die Transkription von *Phly*.

(Vergleich HH1 zu HH2 und PP1 zu PP2) hatte dabei nur wenig Einfluss auf die Transkription. Der direkte Vergleich der Menge an Transkript von *Phly* mit *PplcA* mit HP als Template zeigte, dass *PplcA* weniger als halb so stark transkribiert wird wie *Phly*. Dies stimmt auch mit den Beobachtungen aus den Versuchen mit Plasmid-DNA als Template überein (siehe Abbildung 32, Pm).

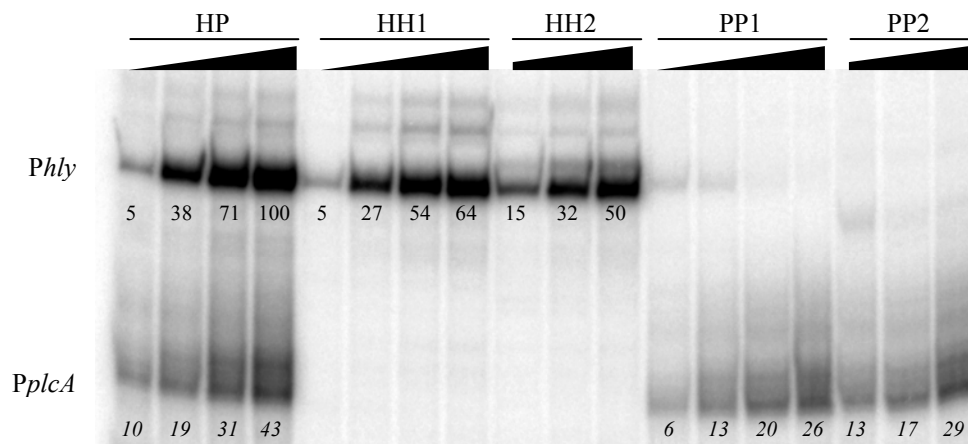


Abbildung 34. *In vitro* Transkription mit verschiedenen PCR-Produkten der *plcA/hly* Promotorregion von *L. monocytogenes* als Template (jeweils 400 fmol). Fragment HP beinhaltet die gesamte Region, HH1 den *hly*-Promotor inklusive der -10-Box des *plcA*-Promotors, HH2 den *hly*-Promotor ohne -10-Box des *plcA*-Promotors, PP1 den *plcA*-Promotor inklusive der -10-Box des *hly*-Promotors, PP2 den *plcA*-Promotor ohne -10-Box des *hly*-Promotors. Markierung erfolgte mit [α^{32} P]-CTP. Als Transkriptionsaktivator wurde m-PrfA in den Mengen (0,) 1,4, 5,5 und 27 nM verwendet (bei HH2 und PP2 fehlt die Probe ohne Zugabe von PrfA). Zahlen unter den Banden geben die relative Aktivität an (gemessen mit ImageQuant™, *hly*-Banden in normaler, *plcA*-Banden in kursiver Schrift). Die stärkste gemessene Aktivität wurde auf Wert 100 gesetzt.

D.3.4 Aktivität verschiedener PrfA Proteine

Die PrfA Proteine der drei *Listeria*spezies *L. monocytogenes*, *L. ivanovii* und *L. seeligeri* zeigen zueinander eine Ähnlichkeit von 97,5% und sind zu 64,6% identisch (siehe Abbildung 35). Da schon ein einzelner Aminosäureaustausch, wie in m-PrfA* die Substitution G145S, zu einer signifikanten Änderung in der Aktivität des Proteins führen kann, wurden die Aktivitäten dieser Proteine (m-PrfA, m-PrfA*, i-PrfA, s-PrfA und sm-PrfA, siehe Tabelle 3) gezielt an den *actA* und *hly* Promotoren der drei Spezies (im folgenden m-*PactA*, i-*PactA*, s-*PactA* und m-*Phly*, i-*Phly*, s-*Phly* genannt) in der "run off" *in vitro* Transkription untersucht. Dabei sollte auch festgestellt werden, ob eine Anpassung der Promotoren an ihre spezieeigenen PrfA Proteine vorliegt. Die getesteten Promotoren sind sich hinsichtlich PrfA- und -10-Box zwar sehr ähnlich, weisen jedoch vor allem in den umgebenden Sequenzen größere Unterschiede auf (siehe Abbildung 31 und Abbildung 36). Die paarweisen Identitäten von m-, i- und s-*Phly* reichen von 62,7% bis 75,5%, während es bei m-, i- und s-*PactA* sogar nur 49,7% bis 61,1% sind (siehe G.1.2 Abbildung 48 und Abbildung 49).

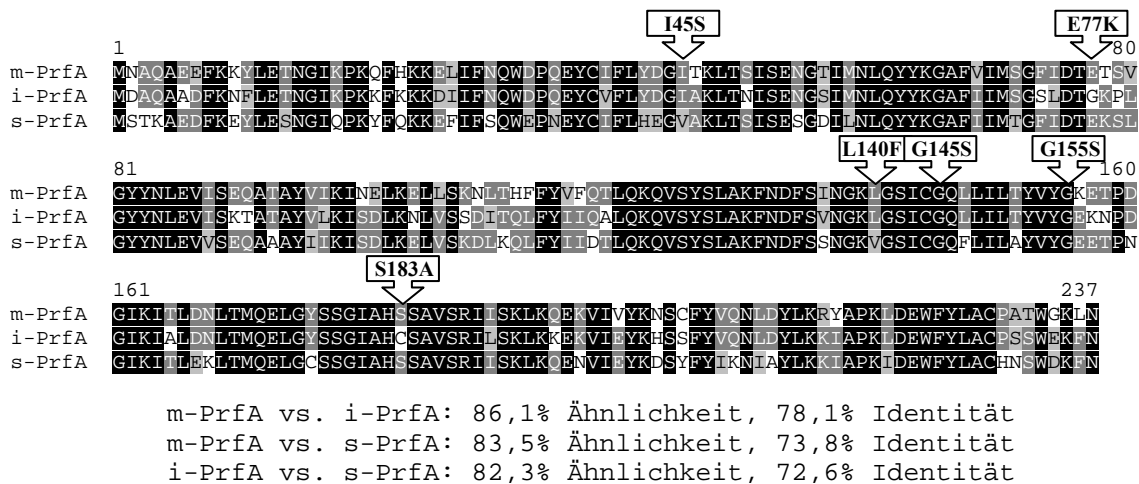


Abbildung 35. ClustalW Analyse der PrfA Proteine von *L. monocytogenes* (m-PrfA), *L. ivanovii* (i-PrfA) und *L. seeligeri* (s-PrfA). Die drei Proteine zeigen zusammen 97,5% Ähnlichkeit (bei Verwendung der Matrix BLOSUM 62) und 64,6% Identität. Paarweise Ähnlichkeiten und Identitäten sind unter dem Alignment angegeben. Mutationen, die zu einer Erhöhung der Aktivität von m-PrfA führen, sind durch Pfeile gekennzeichnet.



Abbildung 36. ClustalW Alignment der *actA* Promotorsequenzen von *L. monocytogenes* (mono), *L. ivanovii* (ivan) und *L. seeligeri* (seel). Elemente der PrfA-abhängigen Promotoren (PrfA- und -10-Boxen) sind schwarz hinterlegt, Startcodons sind in Großbuchstaben angegeben.

D.3.4.1 m-PrfA, m-PrfA*, i-PrfA und s-PrfA

Die PrfA Proteine m-PrfA, m-PrfA*, i-PrfA und s-PrfA wurden in Konzentrationen von 0,5 bis 4 nM bzw. 8 bis 64 nM im Falle von s-PrfA in "run off" *in vitro* Transkriptionen mit 16 nM Template DNA (*hly*-seitig linearisierte pUC_*plcA_hly*, pUC_*i-plcA_hly* und pUC_*s-plcA_hly*, sowie pUC_*actA*, pUC_*i-actA* und pUC_*s-actA*) eingesetzt. Die Konzentration der RNA-Polymerase betrug 1,3 nM bei den *hly*- und 1,9 nM bei den *actA*-Promotoren. Die Markierung der mRNA erfolgte mit [α^{32} P]-CTP. Die Aktivitäten der produzierten Transkripte wurden mit Storage Phosphor Screen und ImageQuant™ gemessen und in Abhängigkeit von

der eingesetzten PrfA Proteinkonzentration in ein Diagramm eingetragen. Die in einem solchen Diagramm ermittelte Steigung im linearen Bereich des Konzentrations-Aktivitäts-Graphen wurde als Maß für die spezifische Aktivität des getesteten PrfA Proteins herangezogen und mit der von m-PrfA (p.d. 100%) in Beziehung gesetzt (siehe auch D.3.4.2). Wie in Abbildung 37 zu sehen ist, war m-PrfA* wie erwartet das aktivste PrfA Protein, zeigte dabei aber eine weniger als doppelt so starke Aktivität wie die nächst aktivsten m- und i-PrfA, die gleich aktiv waren. Dagegen war s-PrfA etwa um den Faktor 20 weniger aktiv als m-PrfA. Eine etwaige Anpassung der Promotoren an die spezifischen PrfAs konnte nicht beobachtet werden.

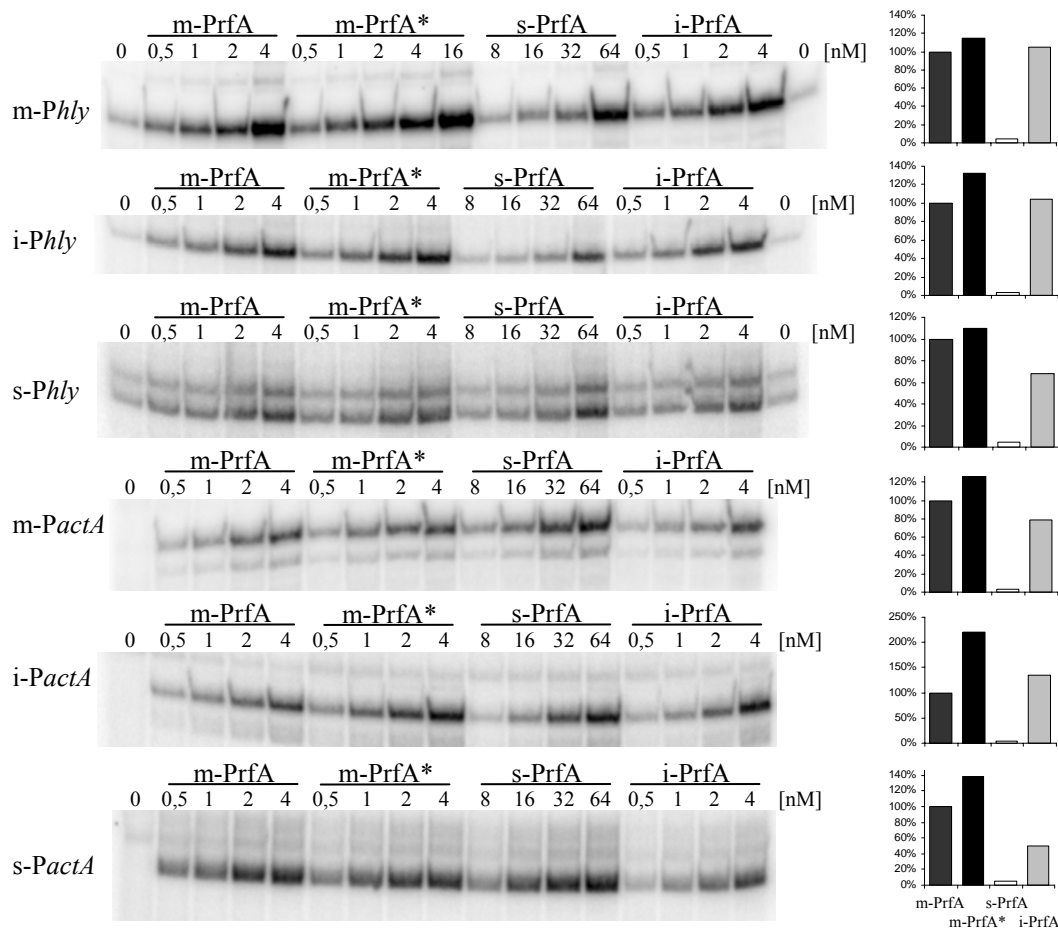


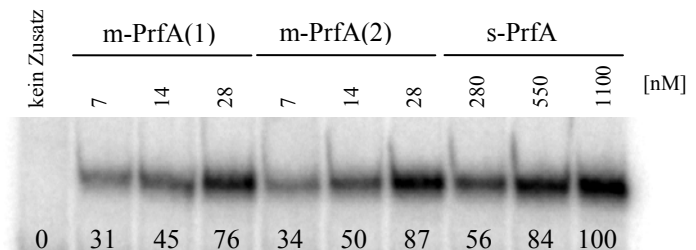
Abbildung 37. "Run off" *in vitro* Transkription mit den Promotorregionen von *hly* und *actA* aus den drei *Listeria*spezies *L. monocytogenes*, *L. ivanovii* und *L. seeligeri* (m-Phly, i-Phly, s-Phly, m-PactA, i-PactA, s-PactA) als Template (jeweils 16 nM linearisiertes Plasmid). Als Transkriptionsaktivatoren wurden die His₆-markierten PrfAs von *L. monocytogenes* (m-PrfA, m-PrfA*), *L. seeligeri* (s-PrfA) und *L. ivanovii* (i-PrfA) in den angezeigten Konzentrationen verwendet. Die Konzentration der RNA-Polymerase betrug 1,3 nM bei den *hly*- und 1,9 nM bei den *actA*-Promotoren. Markierung erfolgte mit [α^{32} P]-CTP.

Rechts daneben zeigen Balkendiagramme die relativ zu m-PrfA gemessenen Aktivierungspotentiale der verschiedenen PrfA Proteine.

Um zu untersuchen, warum s-PrfA eine so geringe spezifische Aktivität aufweist und weil vermutet wurde, dass dies evtl. mit der Aufreinigungsprozedur zusammenhängen könnte, wurde s-PrfA erneut und parallel mit m-PrfA aufgereinigt und in der *in vitro* Transkription zusammen mit der alten Charge m-PrfA getestet. Wie Abbildung 38 zeigt, ist das relative Verhältnis der Aktivitäten von m-PrfA und s-PrfA bei einem Faktor von etwa 20 auch nach erneuter Aufreinigung gleich geblieben. Auch die beiden m-PrfA Chargen besitzen nahezu

identische Aktivität, so dass man davon ausgehen kann, dass das Aufreinigungsverfahren selbst zuverlässig ist.

Abbildung 38. *In vitro* Transkription mit strikt PrfA-abhängigem *i-actA* Promotor von *L. ivanovii* als Template (16 nM). Markierung mit [α^{32} P]-CTP. Es wurden zwei Chargen wildtypisches His-PrfA von *L. monocytogenes* (m-PrfA) mit His-PrfA von *L. seeligeri* (s-PrfA) verglichen. Charge m-PrfA (2) und s-PrfA wurden parallel aufgereinigt, um Aktivitätsunterschiede aufgrund der Präparation auszuschließen. Zahlen unter den Banden zeigen die Produktmenge in relativen, willkürlichen Einheiten (quantifiziert mit ImageQuant™).



D.3.4.2 sm-PrfA

Um zu überprüfen, welche Unterschiede in der Sequenz von s-PrfA zu seiner vergleichsweise geringen Aktivität führen, wurde ein Hybridprotein (sm-PrfA) erzeugt, das s-PrfA bis auf die letzten C-terminalen 38 Aminosäurereste gleicht. Dieser C-Terminus wurde dabei durch jenen von m-PrfA ersetzt. In der C-terminalen Region besitzt s-PrfA einige Abweichungen von den Sequenzen von m- und i-PrfA (siehe Abbildung 35), weshalb zunächst dort der Grund für die geringe Aktivität vermutet wurde.

In "run off" *in vitro* Transkriptionen mit 16 nM Promotor-DNA von *L. monocytogenes* und *L. seeligeri* (s-*Phly* und m-*PactA*) wurden verschiedene Konzentrationen der PrfA Proteine m-PrfA, sm-PrfA und s-PrfA direkt miteinander verglichen. Wie in Abbildung 39 zu sehen ist, zeigte das Hybridprotein sm-PrfA eine gegenüber s-PrfA etwa um den Faktor drei erhöhte Aktivität. Dennoch lag die Aktivität von sm-PrfA immer noch etwa um den Faktor zehn unter der von m-PrfA.

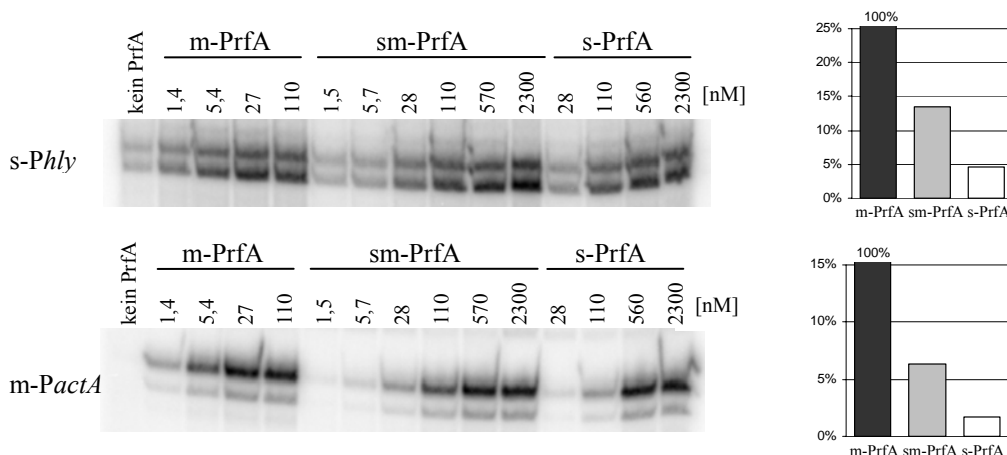


Abbildung 39. "Run off" *in vitro* Transkription mit den Promotorregionen von *hly* und *actA* aus *L. seeligeri* (s-*Phly*) bzw. *L. monocytogenes* (m-*PactA*) als Template (jeweils 16 nM linearisiertes Plasmid) und 1,9 nM RNA Polymerase. Markierung erfolgte mit [α^{32} P]-CTP. Als Transkriptionsaktivatoren wurden die His₆-markierten PrfAs von *L. monocytogenes* (m-PrfA), *L. seeligeri* (s-PrfA) und das Hybridprotein sm-PrfA verwendet. Rechts die relativ zu m-PrfA gemessenen Aktivierungspotentiale der verschiedenen PrfA Proteine. Wiedergegeben ist ein repräsentativer Versuch.

Wann immer in "run off" *in vitro* Transkriptionen, wie hier bei der Aktivitätsbestimmung von sm-PrfA, eine größere Bandbreite an verschiedenen PrfA Konzentrationen bei PrfA-abhängigen Promotoren eingesetzt wurde, konnte beobachtet werden, dass die mit ImageQuant™ gemessene Transkriptmenge nur bei niedrigen PrfA Konzentrationen (unter einem Viertel der die Reaktion absättigenden Konzentration) linear mit dieser ansteigt. An diese lineare Abhängigkeit schließt sich ein Bereich an, der mit logarithmischen Funktionen "gefittet" (= angepasst) werden kann. Sowohl lineare als auch logarithmische "Fits" eignen sich zur Bestimmung der relativen Aktivitäten und werden gebildet indem man die Summen der Quadrate der Abweichungen von den Messwerten minimiert. Lineare Fits ("Eichgeraden") haben die Form

$$T = m \times c_n (+ t)$$

wobei **T** die PrfA-abhängige Transkriptmenge (Transkriptmenge der Probe abzüglich der Transkriptmenge der Negativkontrolle ohne PrfA) ist und deren Wert relativ zur höchsten gemessenen PrfA-abhängigen Transkriptmenge angegeben wird, deren Wert auf 100 festgelegt wurde; **c_n** ist die molare Konzentration der eingesetzten PrfA Proteine und **m** die Steigung des Fits, welche ein Maß für die Aktivität des PrfAs ist. Die Variable **t** ist gleich Null, da die Gerade durch den Nullpunkt gehen muss (ohne PrfA keine PrfA-abhängige Transkription). Logarithmische Fits haben die Form

$$T = a \times \text{Ln}(c_n) + b$$

wobei der hier interessante Wert erst nach Umformung zu erhalten ist. Wenn die maximale Transkriptmenge, die durch Zugabe von PrfA zu erreichen ist, bekannt ist, so kann diejenige PrfA-Konzentration, bei der die Hälfte (50%) dieser Transkriptmenge erreicht wird (**c₅₀**), als reziprokes Maß für die Aktivität des PrfAs herangezogen werden.

Protein	s-Phly			m-PactA		
	c _n [nM]	T	Formel für Fit	c _n [nM]	T	Formel für Fit
m-PrfA	1,4	25	T = 10,05 nM ⁻¹ × c _n	1,4	15	T = 9,6184 nM ⁻¹ × c _n
	5,4	52	T = 18,042 × Ln(c _n) + 19,478	5,4	52	T = 28,904 × Ln(c _n) + 4,1649
	27	78	c₅₀ = 5,4 nM	27	100	c₅₀ = 4,9 nM
	110	73		110	95	
sm-PrfA	1,5	2	T = 1,3713 nM ⁻¹ × c _n	1,5	1	T = 0,5078 nM ⁻¹ × c _n
	5,7	9	T = 21,111 × Ln(c _n) - 29,295	5,7	4	T = 25,606 × Ln(c _n) - 67,058
	28	38	c₅₀ = 43 nM	28	17	c₅₀ = 97 nM
	110	71		110	55	
	570	80		570	95	
2300	100		2300	94		
s-PrfA	28	15	T = 0,4776 nM ⁻¹ × c _n	28	3	T = 0,1672 nM ⁻¹ × c _n
	110	52	T = 23,095 × Ln(c _n) - 60,272	110	17	(T = 22,883 × Ln(c _n) - 75,373)
	560	84	c₅₀ = 0,12 μM	560	94	c₅₀ = 0,24 μM
	2300	74		2300	90	

Tabelle 5. Mit ImageQuant™ gemessene Transkriptmengen von zwei "run off" *in vitro* Transkriptionen mit den Promotoren s-Phly bzw. m-PactA (siehe Abbildung 39). Angegeben sind neben den Namen der eingesetzten PrfA Proteine deren molare Konzentration (c_n) und die gemessene PrfA-abhängige Transkriptmenge T (Transkriptmenge der Probe abzüglich der Transkriptmenge der Negativkontrolle ohne PrfA) deren Wert relativ zur höchsten gemessenen PrfA-abhängigen Transkriptmenge (100) angegeben wird.

Hellgrau hinterlegt sind die Konzentrationen in denen eine lineare Abhängigkeit zwischen c_n und T besteht, grau die Transkriptmengen welche logarithmisch gefittet werden können. Eine grafische Darstellung dieser Tabelle findet sich in Abbildung 40.

Der Wert c_{50} errechnet sich nach

$$c_{50} = e^{[(50 - b) / a]}$$

Tabelle 5 und Abbildung 40 zeigen die gemessenen Werte für den Versuch, der in Abbildung 39 beispielhaft wiedergegeben ist. Beim Promotor **s-Phly** und den Proteinen m-, sm- und s-PrfA wurden für m die Werte 10, 1,4 und 0,48 nM⁻¹ ermittelt. Die relativen Aktivitäten von **m-PrfA:sm-PrfA:s-PrfA** verhalten sich also wie **21:3:1**. Bei den Werten für c_{50} aus dem logarithmischen Fit (5,4 nM, 43 nM und 0,12 µM) erhält man ein (reziprokes) Verhältnis von **22:3:1**, also nahezu das Gleiche wie für den linearen Fit. Beim Promotor **m-PactA** wurden für m die Werte 9,6, 0,51 und 0,17 nM⁻¹ errechnet, was hier zu einem Verhältnis von **58:3:1** führt. Die Werte für c_{50} (4,9 nM, 97 nM und 0,24 µM) ergeben ein Verhältnis von **49:2:1**, im Rahmen der Genauigkeiten also wieder ein sehr ähnliches Ergebnis.

In dieser Arbeit wurden nur Daten aus linearen Fits zum Vergleich der PrfA Aktivitäten herangezogen, doch zeigen diese Daten, dass bei Versuchen, in denen man keine Werte im linearen Bereich erhalten hat, logarithmische Fits ebenso einen Hinweis auf die relativen Aktivitäten geben können.

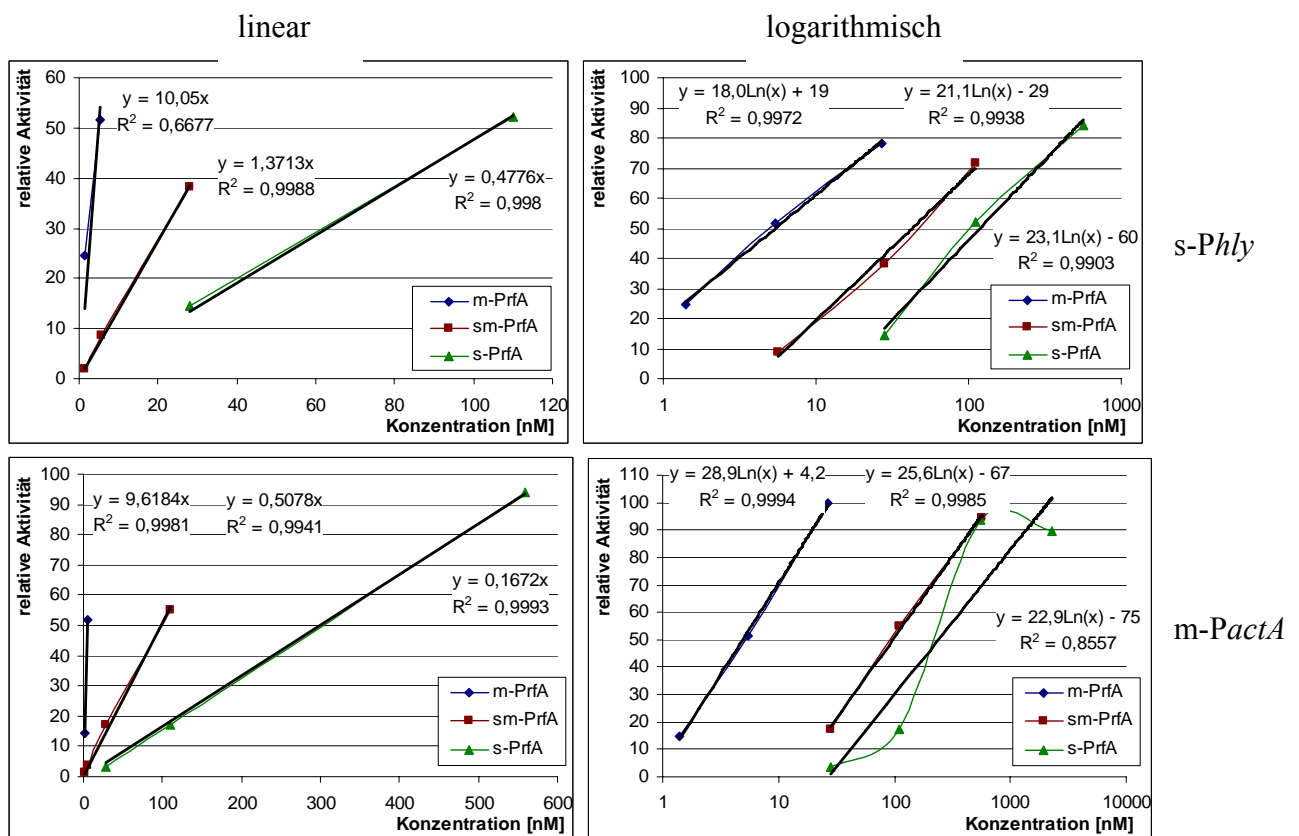


Abbildung 40. Grafische Darstellung von mit ImageQuant™ gemessenen Transkriptmengen in einer *in vitro* Transkription in Abhängigkeit von der eingesetzten PrfA Konzentration am Beispiel der Daten aus Tabelle 5 bzw. aus Abbildung 39. *Oben:* Ergebnisse von s-Phly. *Unten:* Ergebnisse von m-PactA. *Links:* Darstellung linearer Abhängigkeiten und Wiedergabe der Formeln für die linearen Trendlinien, sowie deren Bestimmtheitsmaß R^2 . *Rechts:* Darstellung logarithmischer Abhängigkeiten und Wiedergabe der Formeln für die logarithmischen Trendlinien, sowie deren Bestimmtheitsmaß R^2 .

D.3.4.3 Vergleich von s-PrfA und m-PrfA *in vivo*

Um zu überprüfen, ob die *in vitro* gemessene verringerte Aktivität von s-PrfA sich auch tatsächlich *in vivo* auswirkt, wurde ein Allelaustausch in *L. monocytogenes* EGDe vorgenommen, und die Expression der Virulenzgene *actA* und *hly* gemessen. Zusätzlich wurde die Mutante im Mausmodell auf ihre Virulenz hin überprüft.

D.3.4.3.1 Allelaustausch von m-*prfA* gegen s-*prfA* in *L. monocytogenes* EGDe

Um die Aktivität der PrfA-Proteine von *L. monocytogenes* und *L. seeligeri* auch *in vivo* zu überprüfen wurde in *L. monocytogenes* EGDe ein Allelaustausch von m-*prfA* gegen s-*prfA* vorgenommen. Um das Screening der Mutanten zu erleichtern wurde als Basis eine *prfA*-Deletionsmutante (Chatterjee *et al.*, 2006) verwendet, die nur einen kurzen Abschnitt des codierenden Bereichs von *prfA* besitzt.

Zunächst wurden die stromauf- und -abwärts von *prfA* gelegenen Genregionen aus *L. monocytogenes* EGDe (Primer und Produktgröße: *prfA_Salup*><*prfA_Alwup*, 306 bp; *prfA_Bsedn*><*prfA_Bamdn*, 317 bp) und die codierende Sequenz von s-*prfA* (*s-prfA_bnt*><*s-prfA_Bse*, 704 bp) aus *L. seeligeri* NRRL 33019 amplifiziert. Die Fragmente wurden über die Schnittstellen der Restriktionsenzyme Bsi HKA I und BseY I ligiert und über die Schnittstellen von Sal I und BamH I in den Vektor pLSV101 kloniert. Der so entstandene Vektor pLSV101_s-*prfA* wurde verwendet, um s-*prfA* per homologe Rekombination in *L. monocytogenes* EGDe Δ *prfA* zu inserieren (siehe C.8.12).

Parallel wurde der Vektor pLSV101_m-*prfA* hergestellt. Dazu wurde m-*prfA* mit den flankierenden Regionen aus *L. monocytogenes* EGDe amplifiziert (Primer und Produktgröße: *prfA_Salup*><*prfA_Bgldn*, 1288 bp) und über die Schnittstellen von Sal I und Bgl II in pLSV101 (behandelt mit BamH I anstatt Bgl II) kloniert. Die *prfA*-Deletionsmutante sollte damit in die wildtypische Form revertiert werden und bei den kommenden Experimenten als Kontrollstamm dienen, um einen möglichst identischen genetischen Hintergrund zu gewährleisten.

Die entstandenen Bakterienstämme wurden *L. monocytogenes* EGDe s-*prfA* bzw. *L. monocytogenes* EGDe m-*prfA* genannt.

D.3.4.3.2 Expression von ActA und Hly in *L. monocytogenes* EGDe s-*prfA*

L. monocytogenes EGDe s-*prfA* (*Lm s-prfA*), *L. monocytogenes* EGDe m-*prfA* (*Lm m-prfA*), *L. monocytogenes* EGDe (*Lm EGDe*) und *L. monocytogenes* EGDe Δ *actA* wurden in Minimalmedium (zur Zusammensetzung siehe C.6.1.4) mit 50 mM Cellobiose oder Glycerin bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 bis 0,7 kultiviert, da bekannt ist, dass Wachstum mit Cellobiose reprimierend auf die Expression der Virulenzgene wirkt, während Glycerin aktivierend ist. Zytosolische Proteine der Bakterien (zur Präparation siehe C.11.2) wurden für SDS-PAGE und nachfolgendem Immunoblot präpariert, um die Menge an ActA Protein zu detektieren. Die Kulturüberstände wurden in einem photometrischen Hämolyseassay (siehe C.12) eingesetzt.

Wie in Abbildung 41 zu sehen ist, war die Expression des ActA-Proteins im Wildtypstamm (*Lm EGDe*), der Revertante (*Lm m-prfA*) und der Mutante (*Lm s-prfA*) bei Wachstum in Glycerin-haltigem Minimalmedium gegenüber Cellobiose-haltigem stark erhöht. Auch zwischen den einzelnen Stämmen gab es erhebliche Unterschiede: *Lm s-prfA* zeigte vor allem bei Wachstum mit Glycerin gegenüber den anderen beiden Stämmen eine deutlich geringere ActA-Expression. Dagegen zeigte *Lm m-prfA* eine erhöhte Expression, auch gegenüber dem Wildtyp *Lm EGDe*, obwohl beide Stämme genetisch identisch sein sollten (und es in der *prfA*-Region, gemäß der Sequenzierung auch sind). Diese erhöhte Expression ist vor allem bei Wachstum in Cellobiose deutlich ausgeprägt.

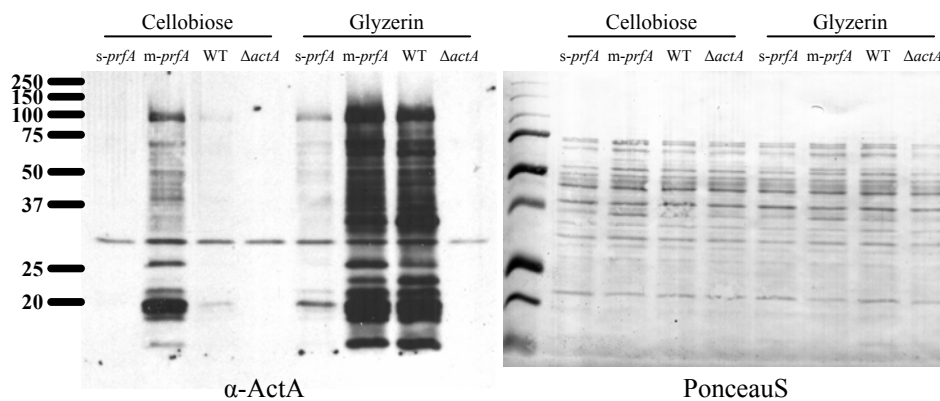
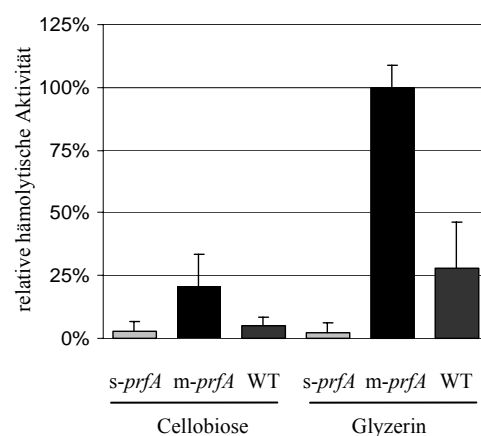


Abbildung 41. Detektion der exprimierten ActA Proteinmenge in verschiedenen Listeriastämmen mittels Western Blot. Die Bakterienstämme *L. monocytogenes* EGDe *s-prfA* (*s-prfA*), *L. monocytogenes* EGDe *m-prfA* (*m-prfA*), *L. monocytogenes* EGDe (WT) und *L. monocytogenes* EGDe $\Delta actA$ ($\Delta actA$) wurden in Minimalmedium mit 50 mM Cellobiose bzw. Glycerin bis zu einer OD_{600} von 0,6 bis 0,7 kultiviert und die zellulären Proteine isoliert. Pro Spur wurden 5 μ g Gesamtprotein aufgetragen. Dekoration erfolgte mit Kaninchen- α -ActA (1:1000) und Ziege- α -Kaninchen-HRP (1:10k). Detektiert mit ECL Plus Western Blotting Detection System (Amersham) und Röntgenfilm (Konica Minolta). Zur Überprüfung der Proteinmengen des Blots wurde zuvor eine Färbung mit PonceauS vorgenommen (rechts).

Die Ergebnisse der Hämolyseassays (siehe Abbildung 42) entsprechen qualitativ etwa der Expression von ActA. Die hämolytische Aktivität der *m-prfA*-haltigen Stämme, war bei Wachstum mit Glycerin gegenüber Wachstum mit Cellobiose stark erhöht, während *Lm s-prfA* nicht sichtbar induziert wurde. Zwischen den einzelnen Stämmen waren vor allem bei den aktivierenden Bedingungen in Glycerin-haltigem Medium starke Unterschiede zu erkennen: *Lm m-prfA* zeigte eine etwa drei- bis vierfach höhere hämolytische Aktivität als *Lm* EGDe, während dieser seinerseits eine mindestens zehnfach höhere Aktivität zeigte als *Lm s-prfA*. Weniger stark ausgeprägt aber tendenziell ähnlich waren die Ergebnisse bei Wachstum mit Cellobiose.

Abbildung 42. Relative hämolytische Aktivität verschiedener Listerienstämme. *L. monocytogenes* EGDe *s-prfA* (*s-prfA*), *L. monocytogenes* EGDe *m-prfA* (*m-prfA*) und *L. monocytogenes* EGDe (WT) wurden in Minimalmedium mit 50 mM Cellobiose bzw. Glycerin bis zu einer OD_{600} von 0,6 bis 0,7 kultiviert und die Kulturüberstände in einem photometrischem Hämolyseassay getestet (20 μ l Kulturüberstand in 1 ml ~2% Pferdeerythrozytensuspension, inkubiert bei 37 °C für 30 min). Die Aktivität wurde in jedem einzelnen Versuch auf das Mittel der gemessenen Werte für *m-prfA* (=100%) bezogen. Diese Abbildung fast drei unabhängige Versuche zusammen.

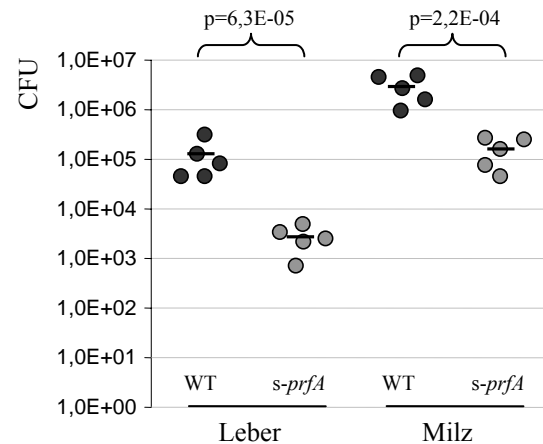


D.3.4.3.3 Virulenz von *L. monocytogenes* EGDe *s-prfA* im Mausmodell

Um festzustellen, ob die verringerte Aktivität von *s-prfA* auch im lebenden Organismus eine Virulenzattenuation bewirkt, wurden von Daniela I. M. Löffler Mäuse mit den Stämmen *L. monocytogenes* EGDe *s-prfA* und *L. monocytogenes* EGDe (wildtypische Kontrolle) infiziert. Dazu wurden je fünf weibliche C57BL/6 Mäuse intravenös mit 5×10^3 Bakterien in 100 μ l endotoxinfreier Saline (0,9% (w/v) NaCl) infiziert. Drei Tage nach der Infektion wurden den

Tieren Milz und Leber entnommen und homogenisiert. Verdünnungen bis 10^{-4} wurden dann auf BHI-Agarplatten ausplattiert um die Menge der Listerien in den Organen zu bestimmen. Das Ergebnis dieses Experiments ist in Abbildung 43 zu sehen. Sowohl in der Milz als auch der Leber war zwischen den beiden Stämmen jeweils ein hochsignifikanter Unterschied in der Menge der koloniebildenden Bakterien festzustellen. Die Anzahl der CFU von *Lm s-prfA* lag dabei etwa um 1,5 dekadische log-Stufen unter der des Wildtyps.

Abbildung 43. Mengen lebender Bakterien in den Organen Leber und Milz von Mäusen. Weiblichen C57BL/6 Mäusen wurden intravenös 5×10^3 Bakterien (*L. monocytogenes* EGDe (WT) und *L. monocytogenes* EGDe *s-prfA* (*s-prfA*)) injiziert. Nach drei Tagen wurde dann die Anzahl der koloniebildenden Bakterien (CFU) in den jeweiligen Organen bestimmt. Mit jedem Bakterienstamm wurden 5 Tiere (n=5) infiziert. Der Mittelwert jeder Gruppe (Stamm & Organ) ist als Strich wiedergegeben. Um die Unterschiede zwischen den Stämmen beurteilen zu können, wurden für die log-transformierten Werte Student's T-Tests durchgeführt, deren p-Werte ebenfalls angegeben sind.



E Diskussion

Listerien sind ubiquitär vorkommende Gram-positive Stäbchenbakterien, von denen die Spezies *Listeria monocytogenes* und *L. ivanovii* in der Lage sind bei Mensch und Tier das Krankheitsbild der Listeriose zu verursachen (Rocourt & Seeliger, 1985; Vázquez-Boland *et al.*, 2001b; Weis & Seeliger, 1975). Während *L. monocytogenes* vor allem beim Menschen zu Erkrankungen führt, kommt *L. ivanovii* vorwiegend bei Tieren als Krankheitserreger vor (Hof & Hefner, 1988). Aufgrund seiner Fähigkeit auch unter widrigen Umweltbedingungen zu überleben und sich zu vermehren, sowie seiner hohen Resistenz gegenüber Konservierungsmethoden stellt *L. monocytogenes* für die Lebensmittelindustrie eine stete Herausforderung dar (Donnelly, 1990, 2001; Schuchat *et al.*, 1991).

Eine Besonderheit der pathogenen Listerien ist es, dass sie auch in nicht-professionelle Phagozyten wie z.B. Darmepithelzellen eindringen können, indem sie mit Hilfe von zellwandassoziierten Proteinen, den so genannten Internalinen, ihre eigene Phagozytose induzieren (Gaillard *et al.*, 1991; Lingnau *et al.*, 1995). In der Wirtszelle lysieren sie die Phagosomenmembran, vermehren sich und bewegen sich durch Polymerisation von wirtszelleigenem Aktin durch das Zytosol. An der Zellmembran angekommen bilden sie Ausstülpungen, die von der benachbarten Zelle phagozytiert werden. Auch diese phagosomale Doppelmembran wird von den Listerien lysiert und der Infektionszyklus kann von vorne beginnen (Tilney & Portnoy, 1989).

Die für die gerade beschriebenen intrazellulären Vorgänge nötigen Gene sind bei den Spezies *L. monocytogenes*, *L. ivanovii* und *L. seeligeri* in der Pathogenitätsinsel LIPI-1 lokalisiert (Gouin *et al.*, 1994; Kreft *et al.*, 2002). Ihre Expression wird bei *L. monocytogenes* vorwiegend von PrfA, dem zentralen Regulatorprotein der Virulenzgene gesteuert, das selbst in LIPI-1 kodiert wird (Leimeister-Wächter *et al.*, 1990; Mengaud *et al.*, 1991a). Die Gene der Internaline liegen bei *L. monocytogenes* und *L. ivanovii* häufig geclustert außerhalb von LIPI-1 vor (Domínguez-Bernal *et al.*, 2006; Dramsi *et al.*, 1997; Gaillard *et al.*, 1991; Raffelsbauer *et al.*, 1998). Sie werden dabei in *L. monocytogenes* teilweise (Lingnau *et al.*, 1995) und in *L. ivanovii* überwiegend von PrfA reguliert (Domínguez-Bernal *et al.*, 2006).

In dieser Arbeit sollten die Eigenschaften der weniger gut beschriebenen Internaline von *L. monocytogenes* InlC, InlE, InlG und InlH näher untersucht werden. Zudem wurden die meist PrfA-abhängigen Promotoren von Internalingenen aus *L. ivanovii* und ausgesuchten Virulenzgenen von LIPI-1 (*plcA*, *hly* und *actA*) aus den drei Spezies *L. monocytogenes*, *L. ivanovii* und *L. seeligeri* untersucht. Letztere Spezies ist dabei besonders interessant, da *L. seeligeri* zwar mit LIPI-1 wichtige Virulenzgene besitzt, aber trotz des einen beschriebenen Falles, in dem *L. seeligeri* aus dem Liquor eines Meningitispatienten isoliert werden konnte (Rocourt *et al.*, 1986), als apathogen gilt.

E.1 Untersuchung der Internaline G, H, E und C

Die Deletion des *inlG/H/E* Genclusters oder des *inlC* Gens in *L. monocytogenes* EGD führte im Mausmodell zu einer Attenuierung der Virulenz (Engelbrecht *et al.*, 1996; Raffelsbauer *et al.*, 1998). Und auch eine Deletion des *inlH* Gens alleine führt dazu, dass die Listerien sich in Milz und Leber von infizierten Mäusen nicht mehr vermehren können (Schubert *et al.*, 2001). *In vitro* führte eine Deletion von *inlG/H/E* zu einer um den Faktor zwei bis vier erhöhten Invasion, was sowohl auf erhöhte Expression von InlA und InlB als auch auf fehlende kompetitive Effekte zurückgeführt wurde, während eine Deletion von *inlC* bei der Invasion von Caco-2 Zellen keinen signifikanten Effekt zeigt (Bergmann, 2002; Bergmann *et al.*, 2002). Außerdem konnte gezeigt werden, dass die InlA-abhängige Internalisierung *in vitro*

von InlC und den Internalinen InlG, InlH und InlE unterstützt wird (Bergmann, 2002; Bergmann *et al.*, 2002). Um die Zusammenhänge näher untersuchen zu können, wurden in dieser Arbeit Expressionsvektoren für His₆-markierte Proteine kloniert und die rekombinanten Internaline (InlA, InlB, InlC, InlE, InlG, InlH aus *L. monocytogenes* und i-InlE aus *L. ivanovii*) aufgereinigt, um Antikörper zu erzeugen und die Proteine in Interaktionsstudien einsetzen zu können.

E.1.1 Immunoblots

Mit den gereinigten Antigenen InlG, InlH und InlE wurden in Balb/c Mäusen polyklonale Antisera hergestellt. Darüber hinaus wurde in dieser Arbeit versucht, monoklonale Antikörperproduzenten durch chemische Fusion der murinen Milzzellen mit Myelomazellen (Peters & Baumgarten, 1992) zu erzeugen. Die polyklonalen Antikörper gegen InlE und InlG zeigten im Immunoblot, bei dem alle gereinigten Internaline verwendet wurden, eine hohe Spezifität. Zwei monoklonale Antikörper gegen InlG waren ebenfalls hoch spezifisch für ihr Antigen. Das polyklonale Antiserum gegen InlH (α -InlH) kreuzreagierte dagegen mit anderen Internalinen, dabei vor allem mit InlA, mit einem Teil der InlB Präparation und schwächer auch mit InlE und InlG.

In verschiedenen listeriellen Zellwandpräparaten und Überstandsproteinen konnten mit diesem kreuzreaktiven α -InlH Serum wie erwartet eine Reihe von Internalinen bzw. putativen Internalinen detektiert werden:

In *L. ivanovii* ATCC 19119 konnte sowohl mit α -InlA als auch α -InlH ein zellwandassoziiertes Protein detektiert werden, das in seiner Größe InlA aus *L. monocytogenes* entspricht. Über die Möglichkeit, dass es sich hierbei um ein i-InlA handeln könnte wird später noch näher eingegangen (siehe E.2.1.1). Unter Umständen wird dieses Protein genauso wie InlA auch in einer längeren Variante mit unprozessiertem C-Terminus in den Überstand sezerniert und kann auch dort unter den zahlreichen über 50 kDa schweren Überstandsproteinen gefunden werden, die von α -InlH dekoriert wurden.

Lingnau *et al.* fanden ein 24 kDa Protein im Kulturüberstand von *L. ivanovii*, das mit einem gegen InlC gerichteten monoklonalen Antikörper kreuzreagierte (Lingnau *et al.*, 1996). Dieses Protein konnte auch in dieser Arbeit detektiert werden, ebenso wie ein ~30 kDa Protein, das vermutlich mit i-InlC oder auch i-inlD identisch ist, aber im Vergleich zum 24 kDa Protein schwächer dekoriert bzw. exprimiert wird.

Das vor allem in Zellwandextrakten von *L. monocytogenes* EGDe detektierbare ~50 kDa Protein, das von α -InlH Serum dekoriert wird, ist wahrscheinlich mit InlH identisch. Dafür spricht zum einen die starke Dekoration mit α -InlH, zum anderem der Größenwechsel der Bande im Überstand, welcher der fehlenden Prozessierung durch die Sortase entspricht, wie es auch bei dem LPXTG Protein InlA der Fall ist. Zudem ist dieses Protein auch in einer *L. monocytogenes* EGD Δ *inlA/B* Deletionsmutante vorhanden, womit ausgeschlossen wäre, dass es sich um ein Abbauprodukt von InlA oder InlB handelt. Ein anderer möglicher Kandidat wäre das Genprodukt von *lmo0880*, welches ebenfalls ein zellwandgebundenes Protein dieser Größe ist und als Internalin-ähnlich bezeichnet wird (Chatterjee *et al.*, 2006). Dass InlH in der Δ *inlA/B* Deletionsmutante von *L. monocytogenes* EGD zu sehen ist im Wildtyp jedoch kaum, spricht dafür, dass das Fehlen der Internaline A und B zu einer Hochregulation von InlH führt. Der umgekehrte Effekt, dass die Deletion des *inlG/H/E* Clusters zu einer verstärkten Expression von InlA und InlB führt, wurde bereits früher beobachtet (Bergmann *et al.*, 2002) und kann auch in dieser Arbeit bestätigt werden.

Die Expression von InlH war nicht durch die Temperatur beeinflusst und war in BHI geringfügig höher als in LB Medium. Die größte InlH Proteinmenge in Zellwand- und Überstandsproteinen war in Übernachtskulturen zu finden. Der Unterschied in der Expression von InlH in *L. monocytogenes* EGDe und *L. monocytogenes* EGD kann nicht durch etwaige

Sequenzunterschiede in den *inlG/H/E* Clustern erklärt werden, da die beiden Stämme in dieser Region über 6 kb völlig identisch sind. Es sind jedoch andere regulatorische Mechanismen denkbar, die in den beiden Stämmen verschieden sind und die Auswirkungen auf die Expression von InlH haben könnten.

Mit den Antikörpern gegen InlE und InlG konnten keine Proteine in Präparaten aus Listerien detektiert werden, obwohl die Antikörper an die gereinigten rekombinanten Antigene sehr gut binden. Offensichtlich ist die Expression dieser Proteine unter den getesteten Bedingungen zu schwach. Auf Ebene der mRNA wurde in früheren Studien festgestellt, dass die Internalingene *inlG*, *inlH* und *inlE* vermutlich PrfA-unabhängig und polycistronisch transkribiert werden (Raffelsbauer *et al.*, 1998), weshalb eine ähnlich hohe Expression für alle drei Internaline aus diesem Cluster erwartet worden wäre. Jüngste Studien konnten im Verlauf der Infektion keine signifikante Regulation irgendeines der Gene *inlE*, *inlG* oder *inlH* feststellen (Chatterjee *et al.*, 2006). Da zumindest für InlH eindeutig gezeigt ist, dass es für das Überleben der Listerien in Leber und Milz von Mäusen wichtig ist, ist nicht auszuschließen, dass es für dieses Gen noch eigene Regulationsmechanismen gibt. In kürzlich durchgeführten Analysen von 40 verschiedenen *L. monocytogenes* Stämmen wurden drei Stämme des gleichen Ribotyps gefunden, die alle das selbe *inlH* Allel besitzen (Tsai *et al.*, 2006). Aufgrund der Wichtigkeit von *inlH* für das Überleben im Wirtsorganismus ist es nahe liegend, dass dessen Aufgabe in den übrigen Listerienstämmen von anderen Internalinen übernommen wird. Eventuell handelt es sich dabei um die Internaline InlC2 und InlD, da *inlH* vermutlich durch eine Fusion des 5'-Endes von *inlC2* und des 3'-Endes von *inlD* entstanden ist (Raffelsbauer *et al.*, 1998). Die Analysen von Tsai *et al.* deuten tatsächlich darauf hin, dass vor allem die Gene *inlB*, *inlC*, *inlC2* und *inlF* einer starken positiven Selektion unterliegen und deshalb vermutlich für den evolutiven Erfolg des Bakteriums besonders bedeutend sind (Tsai *et al.*, 2006).

E.1.2 Zelladhärenzassays

In dieser Arbeit durchgeführte Hexosaminidase Assays zur Untersuchung von Zelladhärenz (nach Landegren, 1984), zeigten, dass bei den untersuchten Zelltypen (Caco-2, HeLa, HepG2) keines der drei Internaline InlG, InlH oder InlE in der Lage ist Zellen zu binden. Dies muss nicht bedeuten, dass diese Internaline keine Bindungspartner auf Zelloberflächen besitzen, doch sind etwaige Bindungen offensichtlich nicht stark genug. Auch ist denkbar, dass nicht die passenden Zellen verwendet wurden und/oder die verwendeten Zellen nicht in der richtigen Wachstumsphase waren. Bergmann *et al.* vermuteten, dass bei Caco-2 Zellen die Internaline des *inlG/H/E* Clusters eventuell mit InlB um die Bindung an den gleichen Rezeptor konkurrieren (Bergmann *et al.*, 2002). Wenn dies stimmen sollte, so müsste man vermuten, dass die Bindung der Internaline G/H/E offensichtlich sehr schwach ist, da InlB die Zellen im Hexosaminidase Assay sehr gut bindet und damit der entsprechende zelluläre Rezeptor abundant sein muss. Letztendlich ist auch nicht klar, ob die aufgereinigten Proteine in einer aktiven Konformation vorliegen.

Die Versuche mit den Positivkontrollen InlA und InlB bestätigen jedoch die auch in Infektionsassays mit Deletionsmutanten (Bergmann *et al.*, 2002) beobachteten Abhängigkeiten. Die Proteinpräparate InlA und InlB sind also in diesem Assay aktiv. In Caco-2 Zellen ist InlA der stärkste Adhärenzfaktor und erreicht bei ca. 16 nM Konzentration während der Beschichtung der Mikrotiterplatten die Hälfte der maximalen Adhärenz, was sehr gut mit den Daten von Mengaud *et al.* (ca. 12 nM) übereinstimmt (Mengaud *et al.*, 1996). Auch in Infektionsassays spielt InlA bei Caco-2 Zellen die größte Rolle für die Adhäsion und zusammen mit InlB eine große Rolle für die Invasion, während InlA bei anderen Zellen (HBMEC) eher unwichtig ist (Bergmann *et al.*, 2002). Alle drei im Hexosaminidase Assay verwendeten Zelltypen (Caco-2, HepG2 und HeLa) adhären auch

oder sogar ausschließlich (HeLa) nur an InlB. Da HeLa Zellen kein E-Cadherin als Bindungspartner für InlA exprimieren (Vessey *et al.*, 1995) und InlB als sehr wirkungsvoller Faktor für die Invasion in HeLa Zellen beschrieben ist (Müller *et al.*, 1998), ist dies kein unerwartetes Ergebnis. Trotz des Fehlens von E-Cadherin bei HeLa Zellen ist jedoch gezeigt, dass eine Deletion von *inlA* die Invasivität etwa um den Faktor vier senkt (Lingnau *et al.*, 1995). HepG2 Zellen exprimieren E-Cadherin, doch ist vor allem InlB für die Invasion wichtig (Dramsi *et al.*, 1995). Da HepG2 Zellen im Hexosaminidase Assay jedoch nur an InlA adhärirten, wenn die Kultur nicht älter als zwei Tage war, ist zu vermuten, dass E-Cadherin in späteren Wachstumsphasen nicht mehr exprimiert wird.

An InlC banden im Zelladhärenztest nur semikonfluent gewachsene Caco-2 Zellen, die am Vortag ausgesät wurden. Diese Bindung erfolgte erst bei einer hohen Beschichtungskonzentration von über 25 bis 50 nM. Um 50% der maximalen Adhärenz zu erreichen war für InlC im Vergleich zu InlA die tausendfache Beschichtungskonzentration (16 µM im Vergleich zu 16 nM) nötig. In anderen Wachstumsphasen oder bei älteren Zellen war keine Bindung von Zellen an InlC zu detektieren. Diese Beobachtungen stimmen sehr gut mit Ergebnissen aus Invasionsassays mit *L. monocytogenes* Internalin-Deletionsmutanten überein. In den Versuchen von Bergmann *et al.* wurden Caco-2 Zellen verwendet, die einen Tag vor den Infektionsversuchen ausgesät wurden und die noch nicht zu einem konfluenten Monolayer zusammengewachsen waren. Nur unter diesen Bedingungen unterstützte InlC die InlA-abhängige Invasion (Bergmann, 2002). Bei einem Infektionsassay mit *L. monocytogenes* Δ *inlB/C/GHE* (d.h. von den untersuchten Internalinen ist nur noch InlA vorhanden) bewirkte Zugabe von rekombinantem InlC oder EGF (Epidermal Growth Factor) in das Medium auch nur unter diesen Bedingungen eine zwei- bis fünffache Erhöhung der Invasionsrate (Bergmann, 2002). Diese Effekte wurden darauf zurückgeführt, dass InlC wie EGF eine Aktivierung der PI3-Kinase verursachen könnte, der vermittelnde humane EGF-Rezeptor (HER) jedoch nur in dieser Wachstumsphase noch ausreichend zugänglich und aktivierbar ist (Bergmann, 2002; Bishop & Wen, 1994; Tong *et al.*, 1998). Es wurde schon früher gezeigt, dass die Aktivierung der PI3-Kinase für die Invasion von entscheidender Bedeutung ist (Ireton *et al.*, 1996), und dass InlB diese Aktivierung über die Bindung an den Met-Rezeptor, dem Rezeptor für HGF (Hepatocyte Growth Factor), verursachen kann (Shen *et al.*, 2000). Auch über den EGF-Rezeptor wurde bereits früher diskutiert, dass er bei der Aufnahme von Bakterien in nicht-professionelle Phagozyten eine wichtige Rolle spielen könnte (Galan *et al.*, 1992; Velge *et al.*, 1994). Deshalb wurde eine etwaige Bindung von InlC an HER untersucht. In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Manfred Scharl wurden Versuche mit hybriden Xiphophoruszellen durchgeführt, die ein Hybrid aus humanem EGF-Rezeptor und der Rezeptor-Tyrosin-Kinase Xmrk besitzen (Winkler *et al.*, 1994). Im Gegensatz zu EGF war das rekombinante InlC jedoch nicht in der Lage eine intrazelluläre Signalkaskade auszulösen. Die in dieser Arbeit durchgeführten Zelladhärenztests zeigten jedoch, dass InlC Caco-2 Zellen mit gleicher Stärke und zu den gleichen Wachstumsphasen binden kann wie auch EGF. Deshalb kann man vermuten, dass auch InlC an einen Rezeptor bindet, der wachstumsphasenabhängig auf der Zelloberfläche zugänglich ist, und der von den Zellen in der gleichen Wachstumsphase benötigt wird wie der EGF-Rezeptor. Auch wäre es möglich, dass InlC zwar an HER bindet, alleine jedoch nicht in der Lage ist dessen Dimerisierung zu vermitteln, was für eine Aktivierung der Tyrosin-Kinase notwendig wäre.

Versuche mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Walter Sebald eine direkte Interaktion von InlC und HER mittels Surface Plasmon Resonance (SPR) nachzuweisen glückten nicht. Doch könnte es sich hierbei um ein häufiger auftauchendes Problem von Internalinen in diesem System handeln, da auch die Interaktion von InlA mit E-Cadherin mittels SPR nicht nachweisbar war (Thomas Wollert, persönliche Mitteilung).

E.2 Untersuchung PrfA-abhängiger Promotoren

Die Expression der Virulenzgene wird in *L. monocytogenes* und *L. ivanovii* in den meisten Fällen durch den zentralen Regulator PrfA gesteuert (Domínguez-Bernal *et al.*, 2006; Engelbrecht *et al.*, 1998a; Engelbrecht *et al.*, 1998b; Kreft & Vázquez-Boland, 2001; Mengaud *et al.*, 1991a). In dieser Arbeit wurden die Promotoren von Internalingenen aus *L. ivanovii*, sowie weitere Virulenzgene (*plcA*, *hly*, *actA*) der Spezies *L. monocytogenes*, *L. ivanovii* und *L. seeligeri* mit Hilfe eines zellfreien *in vitro* Transkriptionssystems (Lalic-Mülthaler *et al.*, 2001) untersucht, um deren Aktivität und PrfA-Abhängigkeit unabhängig vom physiologischen Hintergrund der Bakterien analysieren zu können, da die Aktivität von PrfA *in vivo* von zahlreichen Determinanten modifiziert wird (Dickneite *et al.*, 1998; Ermolaeva *et al.*, 2004; Milenbachs *et al.*, 1997; Milenbachs Lukowiak *et al.*, 2004; Renzoni *et al.*, 1997; Ripio *et al.*, 1996).

Dazu wurden im Rahmen dieser und thematisch verwandter Arbeiten His₆-markierte PrfA Proteine aus *L. monocytogenes* (m-PrfA und m-PrfA*), *L. ivanovii* (i-PrfA) und *L. seeligeri* (s-PrfA), sowie unmarkierte PrfA Proteine aus *L. monocytogenes* (m-PrfA_{nt} und m-PrfA*_{nt}) aufgereinigt (siehe auch D.3.1, Tabelle 3). Die Proteine m-PrfA* und m-PrfA*_{nt} tragen die von Ripio *et al.* beschriebene G145S Substitution, die zu einer Hyperaktivität führt (Ripio *et al.*, 1997b). Diese gereinigten Proteine wurden in einem zellfreien *in vitro* Transkriptionssystem (Lalic-Mülthaler *et al.*, 2001) mit Promotor-DNA als Template eingesetzt, um die Promotoren auf ihre PrfA-Abhängigkeit zu überprüfen, die Aktivität der PrfA Proteine zu messen und/oder etwaige Anpassungen der Promotoren verschiedener *Listeria*spezies an die PrfA Proteine eigener oder fremder Spezies zu finden. Eigens zu diesem Zweck wurde in dieser Arbeit RNA-Polymerase aus *L. monocytogenes* $\Delta prfA \Delta sigB$ (Stritzker *et al.*, 2005) aufgereinigt, die somit weder PrfA noch SigB als Kontamination enthält, um neben PrfA-abhängigen auch SigB-abhängige Promotoren untersuchen zu können.

E.2.1 Internalin Promotoren von *L. ivanovii*

Bei *L. ivanovii* konnte kürzlich eine LIPI-2 genannte Pathogenitätsinsel identifiziert werden, die eine Reihe von Genen für kleine, sezernierte und wenige große Internaline enthält (Domínguez-Bernal *et al.*, 2006). Deren Expression wird *in vivo* mit einer Ausnahme (*i-inlB1*) durch PrfA reguliert (Domínguez-Bernal *et al.*, 2006; Engelbrecht *et al.*, 1998a; Engelbrecht *et al.*, 1998b). Außerhalb dieser Pathogenitätsinsel wurden Gene für wahrscheinlich zellwandverankerte Internalin-ähnliche Proteine gefunden, deren Promotoren über die Motive PrfA-abhängiger Promotoren verfügen (laufendes Sequenzierungsprojekt des Laboratoire GMP, Institut Pasteur, Département de Biologie Moléculaire).

Zur Analyse dieser Promotoren wurden im Rahmen dieser und thematisch verwandter Arbeiten die Promotorsequenzen der Internaline *inlA* und *inlC* (bezeichnet als *PinlA* und *PinlC*) aus *L. monocytogenes*, sowie von *i-inlA*, *i-inlC*, *i-inlE*, *i-inlF*, *i-inlI* und *i-inlK* (bezeichnet als *Pi-inlA*, *Pi-inlC*, *Pi-inlE*, *Pi-inlF*, *Pi-inlI* und *Pi-inlK*) aus *L. ivanovii* jeweils in den Vektor pUC18 kloniert und nach Linearisierung als Template in der "run off" *in vitro* Transkription mit listerieller RNA-Polymerase untersucht. Dabei wurden vorwiegend die His₆-markierten PrfA Proteine m-PrfA, m-PrfA* und i-PrfA als Transkriptionsaktivatoren verwendet. Der direkte Vergleich von m-PrfA und i-PrfA sollte dabei auch Aufschluss darüber geben, ob speziesspezifische Anpassungen der Promotoren an diese PrfA Proteine vorliegen.

Alle in dieser Arbeit untersuchten Promotoren zeigten wie erwartet PrfA-abhängige Transkription, doch gab es auch spezifische Eigenheiten, die unter Umständen Rückschlüsse auf die Funktionsweise eines PrfA-abhängigen Promotors zulassen:

Bei den Promotoren *PinlC* und *Pi-inlC* gab es mehrere ähnlich lange PrfA-abhängige Transkripte, die sich in ihrer Größe wahrscheinlich nur um jeweils ein oder zwei Nukleotide unterscheiden. Während *PinlC* etwa vier stärkere Transkripte produzierte, waren es bei *Pi-inlC* nur zwei. Die beiden Promotorsequenzen sind über einen Bereich von über 200 bp zu 90% identisch und unterscheiden sich weder in der PrfA- oder -10-Box noch im Bereich des Transkriptionsstarts, sondern vor allem in den flankierenden Regionen um die PrfA-Box. Deshalb ist anzunehmen, dass diese Unterschiede für die verschiedene Anzahl an Transkripten verantwortlich sind. Vielleicht erlauben die flankierenden Bereiche bei der PrfA-Box von *PinlC* ein leichtes "Wobbling". Dafür sprechen die Sequenzen TTATTA direkt vor der PrfA-Box, die bei *Pi-inlC* nicht vorhanden ist (siehe D.3.2 Abbildung 27), und welche die ersten drei Basen der PrfA-Box zweifach widerspiegelt. Da jedoch der Abstand zwischen PrfA-Box und -10-Box eine kritische Determinante ist, müsste ein ebensolches Wobbling auch in der Region der -10-Box möglich sein. Akzeptable alternative -10-Boxen (bei Zugrundelegung der Konsensussequenz TATAAT; Helmann, 1995) befinden sich bei *PinlC* jedoch erst neun Nukleotide stromaufwärts bzw. fünf Nukleotide stromabwärts. Ebenso könnte es sein, dass die verschiedenen detektierten Produkte lediglich Abbauprodukte der eigentlichen mRNA sind, die sich durch verschieden weit fortgeschrittenen Abbau an "Sollbruchstellen" des 3'-Terminus unterscheiden. Ein Abbau am 5'-Terminus ist unwahrscheinlich, da sich dort die mRNAs von *PinlC* und *Pi-inlC* nicht unterscheiden.

Sowohl *PinlC* als auch *Pi-inlC* besitzen ein gewisses Basislevel an Transkription in der Abwesenheit von PrfA. In beiden Fällen haben diese PrfA-unabhängigen Transkripte die gleichen Größen wie die durch PrfA induzierten Transkripte, weshalb davon auszugehen ist, dass hier jeweils die gleichen -10-Boxen verwendet werden. Im Falle von *PinlC* wurde kürzlich ein PrfA-unabhängiger Promotor beschrieben, der mit dem PrfA-abhängigen überlappt und etwa gleich große Transkripte wie der PrfA-abhängige Promotor erzeugt (Luo *et al.*, 2004). Dieser PrfA-unabhängige Promotor besitzt als -35-Box die Sequenz TTTAAA, die sich direkt an die PrfA-Box anschließt. In *Pi-inlC* ist diese Sequenz durch TATAAG ersetzt, was vom Konsensus TTGACA (Konsensus für SigA-abhängigen Promotor in *B. subtilis* (Helmann, 1995)) weit stärker abweicht. Dennoch zeigt *Pi-inlC* in seiner Transkription ein höheres Basislevel als *PinlC*. Allerdings hat sich gezeigt, dass die Sequenz der -10-Box auf die der -35-Box abgestimmt sein muss, denn eine Substitution der Box TTTAAA durch die "ideale" Box TTGACA führte in *PinlC* zu einer Verschlechterung der PrfA-unabhängigen Transkription, während ein gleichzeitiger Austausch der -10-Box TAACAT durch TATAAT den PrfA-unabhängigen Promotor wiederherstellte (Luo *et al.*, 2004). Somit ist nicht ganz klar, welche -35-Box als Partner für die -10-Box TAACAT perfekt wäre. Da *Pi-inlC* die stärkere Basistranskription zeigt, könnte man vermuten, dass die Sequenz TATAAG diesem idealen Partner sogar näher kommt als die Sequenz TTTAAA von *PinlC*.

Der Promotor *Pi-inlK* zeigte eine geringere PrfA-Abhängigkeit als die anderen getesteten Promotoren *PinlA*, *Pi-inlA*, *PinlC*, *Pi-inlC*, *Pi-inlE*, *Pi-inlF* oder *Pi-inlI*. Während *Pi-inlK* in Gegenwart von 22 nM m-PrfA* nur etwa dreimal so viel Transkript produziert wie in der Negativkontrolle ohne PrfA, erreichen die Promotoren *PinlC* und *Pi-inlC* bereits bei 5,5 nM m-PrfA* das 11- bzw. 7-fache ihrer Basistranskriptmenge. Dies ist mit großer Wahrscheinlichkeit auf die drei Abweichungen zur Konsensussequenz in der PrfA-Box von *Pi-inlK* zurückzuführen. Der Promotor von *i-inlB1* (*Pi-inlB1*) ist *Pi-inlK* sehr ähnlich. *Pi-inlB1* und *Pi-inlK* sind von der PrfA-Box bis zu den Startcodons der Translation fast zu 74% identisch, und auch die "PrfA-Box" von *Pi-inlB1* besitzt drei Abweichungen. Interessanterweise ist *Pi-inlB1* nicht PrfA-abhängig (Domínguez-Bernal *et al.*, 2006; Stefanie Müller-Altrock, persönliche Mitteilung). Ein Grund für diesen Unterschied könnte sein, dass die PrfA-Box von *Pi-inlK* zwei Abweichungen besitzt, die das Palindrom an sich erhalten, während die Abweichungen in der "PrfA-Box" von *Pi-inlB1* dies nicht tun. Da es jedoch noch

mindestens einen weiteren PrfA-abhängigen Promotor mit drei völlig unpalindromischen Abweichungen in der PrfA-Box gibt (*Pi-inlA*, wird in E.2.1.1 diskutiert), kann dies nicht der einzige Grund sein. Vor allem stromaufwärts der PrfA-Box unterscheiden sich die Promotoren *Pi-inlB1* und *Pi-inlK* in größerem Maße. Da PrfA auch bis zu zehn Basen stromaufwärts bindet (Dickneite *et al.*, 1998; Vega *et al.*, 1998), könnte dort der Grund für die beobachteten Unterschiede in der PrfA-Abhängigkeit liegen.

Der einzige Promotor bei Internalingenen mit einer perfekten PrfA-Box bei *L. ivanovii* ist *Pi-inlE*. Er besitzt zudem einen idealen Abstand zwischen PrfA-Box und -10-Box von 22 bp. Die -10-Box selbst (TATGAT) entspricht bis auf eine Base dem Konsensus für SigA-abhängige Promotoren (TATAAT). Im Vergleich zu Promotoren wie *Pi-inlF* oder *Pi-inlI* besitzt *Pi-inlE* ein relativ hohes Basislevel an Transkription und steigert die Transkriptmenge bei Zugabe von 22 nM PrfA lediglich um den Faktor sechs. Die Transkription von *Pi-inlE* wurde deshalb zusätzlich in Primer Extension Experimenten analysiert, um Gewissheit über den Transkriptionsstart zu erhalten und weitere Aussagen machen zu können. Die Transkription startet wie erwartet mit fünf Basen Abstand zur -10-Box, und zwar unabhängig davon, ob es sich um das Basistranskript oder um das PrfA-abhängige Transkript handelt. Genauso wie bei *PinlC* (Luo *et al.*, 2004) und *Pi-inlC* könnte hier ein PrfA-unabhängiger Promotor mit dem PrfA-abhängigen überlappen, wobei sich beide die -10-Box teilen. Als -35-Box käme hier die Sequenz ATGACG (...TTAACA TT TGTAA TGACG...) in Frage, die mit der PrfA-Box um eine Base überlappt. Das A anstelle eines T an erster Stelle ist kritisch zu bewerten, da bei der -35-Box eines SigA-abhängigen Promotors vor allem die ersten Basen konserviert sind (Helmann, 1995).

Bei keinem der untersuchten Promotoren von Internalingenen konnten speziesspezifische Anpassungen von PrfA Proteinen an arteigene Promotoren festgestellt werden. Die PrfA Proteine sind für jeden Promotor beliebig austauschbar, wobei ihre spezifischen Aktivitätsunterschiede unabhängig davon sind, aus welcher Spezies der Promotor stammt.

E.2.1.1 *inlA* von *L. monocytogenes* und *L. ivanovii*

Die Internaline InlA und InlB sind bei *L. monocytogenes* die wichtigsten Invasionsfaktoren (Cossart & Lecuit, 1998; Dramsi *et al.*, 1995; Gaillard *et al.*, 1991). Da auch *L. ivanovii* in humanen Zellen stark invasiv ist (Schlech *et al.*, 1994) und monoklonale Antikörper gegen InlA auch auf der Oberfläche von *L. ivanovii* binden (Sawyer *et al.*, 1996) könnte es sein, dass auch *L. ivanovii* über mindestens ein zellwandgebundenes, großes Internalin verfügt, welches die Aufnahme in nicht-professionelle Phagozyten induzieren kann. Für das Vorhandensein spricht auch der Fund eines in dieser Arbeit detektierten zellwandassoziierten Proteins aus *L. ivanovii* Zellwandextrakten, das von seiner Größe der von InlA entspricht und das von α -InlA und α -InlH Seren dekoriert wird (siehe auch E.1).

Im Rahmen der Sequenzierung von *L. ivanovii* durch das Laboratoire GMP wurden von Robert Lampidis mehrere Internalin-ähnliche Gene identifiziert, die über LRR und LPXTG-Motiv verfügen und somit zu den großen Internalinen gezählt werden müssten, darunter auch der offene Leserahmen mit der Bezeichnung IPF 930.1. Wie die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, handelt es sich dabei mit größter Wahrscheinlichkeit um das Pendant von *inlA* aus *L. monocytogenes* in *L. ivanovii*. IPF 930.1 wurde deshalb in dieser Arbeit als *i-inlA* bezeichnet. Die Gene *inlA* und *i-inlA* kodieren für Proteine mit 800 bzw. 798 Aminosäureresten, deren Aminosäuresequenzen eine Ähnlichkeit von 77% besitzen. Sowohl *inlA* als auch *i-inlA* besitzen lange 5' untranslatierte Regionen (5'-UTR), die zu 59% identisch sind. Für *inlA* konnte gezeigt werden, dass diese 5'-UTR regulatorische Funktionen besitzt (Stritzker *et al.*, 2005). Beide Gene besitzen einen PrfA-abhängigen und einen SigB-abhängigen Promotor, deren Aktivität in dieser Arbeit experimentell in Primer Extension Analysen nachgewiesen wurde. Die Promotorbereiche von *inlA* (*PinlA*) und *i-inlA* (*Pi-inlA*) sind vom Bereich des SigB-abhängigen bis zum PrfA-abhängigen Promotor zu fast 80% identisch.

Sigma B (SigB) ist ein Faktor, der auf bestimmte Stressreize hin exprimiert wird und hauptsächlich Gene aktiviert, die für das Überleben des Bakteriums (wie *Bacillus*, *Listeria*, *Staphylococcus*) unter widrigen Bedingungen nötig sind (Chaturongakul & Boor, 2004; Kazmierczak *et al.*, 2003). Darüber hinaus konnte auch gezeigt werden, dass SigB Virulenzgene wie *inlA*, *inlB* und *bsh* (Gallensalz-Hydrolase; Dussurget *et al.*, 2002) aktivieren kann (Kazmierczak *et al.*, 2003) und dass selbst der Hauptregulator der Virulenzgene PrfA teilweise unter der Kontrolle von SigB steht (Nadon *et al.*, 2002; Rauch *et al.*, 2005; Schwab *et al.*, 2005).

Da die Regulation durch PrfA, SigB (Kim *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2005) und wahrscheinlich auch posttranskriptionell durch eine 5'-UTR in den *inlA*-Genen beider Spezies offenbar sehr ähnlich sind, wird i-InlA in *L. ivanovii* vermutlich unter den jeweilig gleichen Bedingungen im Verlauf einer Infektion exprimiert wie auch InlA in *L. monocytogenes*. Das und die hohe Ähnlichkeit der Proteine selbst lässt den Schluss zu, dass i-InlA auch für den gleichen Zweck benötigt wird wie InlA: zur Überwindung der ersten Barriere in Form des Darmepithels. Für *L. monocytogenes* ist gezeigt, dass gerade epitheliale Zellen durch InlA-abhängige Mechanismen invadiert werden (Gaillard *et al.*, 1991), wobei InlC eine unterstützende Rolle übernimmt (Bergmann *et al.*, 2002). InlB ist sowohl für das Eindringen in Epithelzellen (Lingnau *et al.*, 1995) als auch in viele andere Zelltypen verantwortlich (Braun *et al.*, 1999; Greiffenberg *et al.*, 1998), während InlG, InlH und InlE *in vivo* erst im weiteren Verlauf der Infektion einen Einfluss zu haben scheinen (Raffelsbauer *et al.*, 1998). Es könnte also sein, dass sowohl *L. monocytogenes* als auch *L. ivanovii* mit ihren Internalinen (i-)InlA und (i-)InlC die Darmbarriere bei Mensch und Tier überwinden, der unterschiedliche Wirtstropismus danach jedoch durch die sehr divergierende Ausstattung mit Internalinen (siehe B.2.3, Tabelle 2) determiniert wird.

E.2.2 Untersuchung des *plcA/hly* Promotors

Die PrfA-abhängigen Promotoren der Virulenzgene von *plcA* (kurz *PplcA*) und *hly* (*Phly*) in LIPI-1 teilen sich in *L. monocytogenes* (m-*PplcA*, m-*Phly*), *L. ivanovii* (i-*PplcA*, i-*Phly*) und *L. seeligeri* (s-*PplcA*, s-*Phly*) eine gemeinsame perfekte PrfA-Box, von der aus die Transkription der beiden Gene in jeweils entgegengesetzter Richtung stattfindet (Chakraborty *et al.*, 2000; Sheehan *et al.*, 1995). Dabei ist bisher unklar, ob und wie zwischen den Transkriptionen der beiden Gene unterschieden wird.

Zur Analyse der Promotoren wurden in dieser Arbeit die *plcA*- und *hly*-Promotorsequenzen der drei untersuchten *Listeria*spezies jeweils in den Vektor pUC18 kloniert. Durch unterschiedliche Linearisierung des Plasmids konnten dadurch in der "run off" *in vitro* Transkription die Promotoren getrennt (einseitige Linearisierung) oder gleichzeitig (nach beidseitigem Restriktionsverdau) untersucht werden.

Wie sich zeigte sind beide Promotoren aller drei Spezies voll funktionsfähig und zeigen wie erwartet PrfA-Abhängigkeit. Bei allen drei Spezies produziert der *PplcA* eine Vielzahl von nahezu gleich großen Transkripten und wirkt gegenüber *Phly* unfokussiert. Ähnliches war bereits bei den Promotoren *PinlC* und *Pi-inlC* beobachtet worden.

Trotz der hohen Sequenzähnlichkeiten der Promotoren (92,8%) gibt es jedoch auch signifikante Unterschiede:

Das Basislevel der Transkription ist bei den Promotoren i-*Phly* und s-*Phly* gegenüber dem von m-*Phly* deutlich erhöht. Dafür kann die perfekte PrfA-Box nicht verantwortlich sein, da sie in allen drei Spezies identisch ist. Die -10-Boxen von s-*Phly* bzw. i-*Phly* (TACAAT) und m-*Phly* (TAGAAT) weichen jedoch in einer Base voneinander ab ohne dabei den Grad der Abweichung vom Konsensus (TATAAT) zu verändern. Es ist jedoch unwahrscheinlich, dass dies der Grund für unterschiedliche Basislevel sein sollte. Vielmehr scheint es plausibel, dass die zahlreichen Unterschiede in den unmittelbar zur PrfA-Box benachbarten Sequenzen einen

Einfluss haben. Bei *s-Phly* schließt an die PrfA-Box mit einer Base überlappend die Sequenz ATGACA an (...TTAACA TT TGTTAA TGACA...), die von einer idealen -35-Box (Konsensus: TTGACA) nur um eine Base abweicht. Ähnliches konnte auch beim *Pi-inlE* beobachtet werden, der an derselben Stelle die Sequenz ATGACG besitzt und ebenfalls über ein hohes Basislevel verfügt. Obwohl die ersten Basen in der -35-Box normalerweise die konserviertesten sind (Helmann, 1995), scheint diese Abweichung bei dieser Art von Promotor tolerabel zu sein. Somit könnte bei *s-Phly* auch in Abwesenheit von PrfA ein PrfA-unabhängiges Transkript entstehen, das nahezu den gleichen Transkriptionsstart aufweist wie das PrfA-abhängige Transkript, wie es auch schon beim Promotor von *inlC* gezeigt wurde (Luo *et al.*, 2004). Da *i-Phly* in diesem Sequenzbereich jedoch kaum von *m-Phly* abweicht und dennoch ein höheres Basislevel besitzt, kann dies nicht die einzige Erklärung sein. Vermutlich spielen hier mehrere Faktoren eine Rolle, die mit den vorhandenen Ergebnissen nicht zu eruieren sind. Die insgesamt höhere Aktivität von *i-Phly* gegenüber *m-Phly* kann vielleicht noch durch den geringeren Abstand der PrfA-Box von der -10-Box erklärt werden, der 22 statt 23 Basen beträgt. Dieser Abstand ist für die Spacerregion ideal. Allerdings ist die Transkription mit 23 bp Abstand gegenüber 22 bp nur wenig reduziert (Luo *et al.*, 2004; Luo *et al.*, 2005).

Bei *i-Phly* konnte zusätzlich ein Transkript entdeckt werden, das um schätzungsweise 70 Nukleotide kürzer ist als das PrfA-abhängige Transkript. Die Transkription dieses kleinen Produkts wird durch die Zugabe von PrfA gehemmt. Durch *in silico* Analysen mit Hilfe eines sogenannten "neuronalen Netzwerkes" (http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html; Reese, 2001) kann man in *i-Phly* stromabwärts des PrfA-abhängigen Promotors einen möglichen Promotor entdecken, der für dieses kleine Transkript verantwortlich sein könnte (siehe Abbildung 44). Auch in diesem Fall gibt es sehr ähnliche Promotorelemente in der Sequenz von *m-Phly*, ohne dass im *in vitro* Experiment bei *m-Phly* ein entsprechendes PrfA-unabhängiges Transkript dieser Größe detektierbar wäre. Eine weitere Möglichkeit für unterschiedliche Transkriptionseffizienz wäre der Unterschuss an bestimmten Nukleotiden, in diesem Falle CTP, in der Reaktion der "run off" *in vitro* Transkription, falls das im Unterschuss befindliche Nukleotid in den ersten drei bis vier transkribierten Basen des Transkripts vorkommt (Lalic-Mülthaler *et al.*, 2001). Dies ist hier jedoch nicht der Fall. Weder bei *i-Phly*, noch bei *m-Phly* ist bei den vorausgesagten Transkriptionsstarts C zu finden, sondern nur A und G. Allerdings ist das Netzwerk nicht explizit für grampositive Bakterien trainiert, so dass in der Bewertung dieser beiden putativen Promotoren Zweifel bleiben. Der vermutete mit der PrfA-Box überlappende PrfA-unabhängige Promotor von *s-Phly* wird vom Netzwerk bestätigt.

In der Literatur werden für *m-Phly* drei Promotoren "P1", "P2" und "P3" beschrieben (Domann *et al.*, 1993; Mengaud *et al.*, 1989), wobei hier in dieser Arbeit der Nomenklatur von Domann *et al.* gefolgt wird. P1 ist der "klassische" PrfA-abhängige Promotor mit einer perfekten PrfA-Box, einer 23 bp langen Spacerregion und einer -10-Box. Die Promotoren P2 und P3 liegen stromabwärts, wobei P2 mit P1 überlappt (siehe Abbildung 44). In den *in vitro* Transkriptionsstudien waren jedoch Produkte der von Mengaud *et al.* und Domann *et al.* entdeckten Promotoren, dem PrfA-abhängigen P2 (Mengaud *et al.*, 1989; dort P1 genannt) und dem PrfA-unabhängigen P3 (Domann *et al.*, 1993), kaum oder gar nicht zu detektieren. Dies kann im Falle von P2 durch die Verwendung von [α -³²P]-CTP erklärt werden, da die erste transkribierte Base nach Domann *et al.* ein C sein könnte (siehe Abbildung 44), allerdings wäre nach Mengaud *et al.* auch das darauf folgende A möglich. In den Arbeiten von Lalic-Mülthaler *et al.* verhielt es sich bei Verwendung von [α -³²P]-GTP genau umgedreht: das Produkt von P2 war in diesem Falle dominant und das Transkript von P1 vergleichsweise schwach (Lalic-Mülthaler *et al.*, 2001). Nach Luo *et al.* benötigt eine PrfA-abhängige Transkription abundantes GTP (Luo *et al.*, 2004), womit die reduzierte

2001) findet man tatsächlich zwei putative Promotoren, die für PrfA-unabhängige Transkripte verantwortlich sein könnten. Die Transkripte der beiden Promotoren wären etwa 15 bis 16 Basen kürzer bzw. 20 bis 21 Basen länger als das dominante PrfA-abhängige Transkript. Das kürzere Transkript könnte also tatsächlich von einem dieser Promotoren stammen, das längere ist jedoch zu lang, um mit dem experimentell detektierten Produkt übereinstimmen zu können. In beiden Fällen wäre die negative Beeinflussung der Transkription durch PrfA leicht durch die Überschneidungen der Promotoren mit dem PrfA-abhängigen Promotor und somit durch eine sterische Hinderung durch den Komplex aus PrfA und RNA-Polymerase zu erklären.

Weitere Aussagen über das Verhältnis der *in vitro* Transkription von *m-Phly* und *m-PplcA* konnten mit PCR-Produkten als Templates gemacht werden. Hierbei enthielt das Produkt HP die gesamte Promotorregion von *plcA* und *hly*, PP1 den *m-PplcA* mit -10-Box von *m-Phly*, PP2 den *m-PplcA* ohne -10-Box von *m-Phly*, HH1 den *m-Phly* mit -10-Box von *m-PplcA* und HH2 den *m-Phly* ohne -10-Box von *m-PplcA*.

Wie schon in den Versuchen mit Plasmid-DNA als Template zu erkennen war, ist bei HP als Template die Menge an Transkript von *m-Phly* im Vergleich zu *m-PplcA* mehr als doppelt so hoch. Bei der Verwendung der kürzeren Templates (HH1, HH2, PP1, PP2) nahm die Menge an Transkript gegenüber der Verwendung von HP sowohl beim *hly*- als auch dem *plcA*-Promotor um wenigstens ein Drittel ab. Dabei spielte das Vorhandensein der jeweilig anderen -10-Box (Vergleich HH1 zu HH2 und PP1 zu PP2) eine kleinere Rolle. Dies bestätigt frühere Beobachtungen in EMSA Versuchen, dass sich bei Verwendung von kurzen DNA-Sonden (28 bp) weit schlechter DNA-PrfA-Komplexe (genannt CIII) bilden als mit längeren DNA-Sonden (>100 bp) (Dickneite *et al.*, 1998). Wichtig ist hierbei aber wahrscheinlich nicht nur die Gesamtlänge der DNA. Bei HH2 (211 bp) nimmt die Transkriptionsaktivität gegenüber HP um die Hälfte ab, während die Transkription beim kürzeren PP2 (178 bp) nur um ein Drittel gegenüber HP abnimmt. Der Verlust der -10-Box von *PplcA* in HH2 gegenüber HH1 führt zu einer Reduktion der Transkriptionsaktivität um fast ein Viertel. Daraus kann man schließen, dass bei *Phly* die Regionen stromaufwärts der PrfA-Box für die Bindung von PrfA und damit für die Transkriptionsaktivierung von Bedeutung sind. Für *PplcA* scheint dagegen das Vorhandensein der -10-Box von *Phly* (PP1 im Vergleich zu PP2) keine besondere Rolle zu spielen. Frühere Untersuchungen mit DNaseI-Footprint-Versuchen ergaben, dass PrfA noch bis zu 10 bp stromaufwärts der PrfA-Box direkt bindet (Dickneite *et al.*, 1998; Vega *et al.*, 1998). Die Ergebnisse der Versuche zeigen jedoch, dass auch noch weiter stromaufwärts gelegene Bereiche für *Phly* und in geringerem Maße auch für *PplcA* von Bedeutung sind.

Die Aktivität des *Phly* ließ sich mit HP als Template durch die Zugabe von 27 nM PrfA um etwa den Faktor 20 steigern. Dieser Faktor stimmt sehr gut mit den Ergebnissen aus der Literatur überein. So steigt beispielsweise die Expression von *hly* intrazellulär in der murinen Makrophagenzelllinie J774 ebenfalls um den Faktor 20 (Moors *et al.*, 1999).

E.2.3 Artspezifische Unterschiede in der Aktivität von PrfA

PrfA ist der zentrale Regulator der Virulenzgene im humanpathogenen Bakterium *Listeria monocytogenes* (Leimeister-Wächter *et al.*, 1990) und wurde ebenfalls im tierpathogenen Keim *L. ivanovii* und dem apathogenen *L. seeligeri* gefunden (Gouin *et al.*, 1994; Lampidis *et al.*, 1994). In den pathogenen Spezies ist PrfA für die Expression von Faktoren verantwortlich, welche vorwiegend das Invadieren und Überleben in eukaryotischen Zellen ermöglichen (Vázquez-Boland *et al.*, 2001b).

In dieser Arbeit wurden gereinigte PrfA Proteine der verschiedenen *Listeria*spezies verwendet, um *in vitro* deren Eigenschaften bei der Transkriptionsaktivierung unterschiedlicher PrfA-abhängiger Gene zu analysieren. Für die Analyse wurde ein zellfreies

System gewählt, da die spezifische Aktivität der PrfA Proteine *in vivo* von den Wachstumsbedingungen und anderen Faktoren beeinflusst wird (Dickneite *et al.*, 1998; Ermolaeva *et al.*, 2004; Milenbachs *et al.*, 1997; Milenbachs Lukowiak *et al.*, 2004; Renzoni *et al.*, 1997; Ripio *et al.*, 1996), und diese Einflüsse in den untersuchten Spezies unterschiedlich sein könnten (Kreft & Vázquez-Boland, 2001). Während wildtypisches PrfA von *Listeria monocytogenes in vivo* unter bestimmten Wachstumsbedingungen, wie z.B. Wachstum im reichen Vollmedium BHI, stark in seiner Aktivität inhibiert wird, ist PrfA* (G145S) unter den selben Bedingungen konstitutiv aktiv und kann auch durch Zugabe von Aktivkohle nicht weiter in seiner Aktivität gesteigert werden (Ripio *et al.*, 1996). Gereinigtes rekombinantes m-PrfA zeigt dagegen *in vitro* bei PrfA-abhängigen Promotoren eine hohe die Transkription steigernde Aktivität. Diese Aktivität ist dabei vergleichbar mit der von m-PrfA* (Luo *et al.*, 2004; Vega *et al.*, 2004). Es ist also anzunehmen, dass die *in vivo* und *in vitro* beobachteten Unterschiede in der Aktivität von PrfA eher durch einen inhibitorischen Faktor hervorgerufen werden, der bei der Aufreinigung des Proteins verloren geht. Jüngste Untersuchungen, die in diesem inhibitorischen Faktor ein Element für einen Quorum-Sensing-Mechanismus sehen (Ermolaeva *et al.*, 2004), bestätigen diese Annahme.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden mit den gereinigten Proteinen sowohl die Promotoren von Internalingenen aus *L. monocytogenes* und *L. ivanovii* (siehe E.2.1), als auch die Promotoren von *actA* (m-*PactA*, i-*PactA*) und *hly* (m-*Phly*, i-*Phly*) aus den gerade genannten Spezies und *L. seeligeri* (s-*PactA*, s-*Phly*) mittels *in vitro* Transkription untersucht. Parallel hierzu wurden von Regina Ecke "electro mobility shift assays" (EMSA oder "Bandshift" Experimente) mit denselben Proteinen und den Promotoren *PactA* und *Phly* durchgeführt, um die Bindung der Proteine an die PrfA-Box zu untersuchen. Zusätzlich konnten von Gerald Seidel mittels "surface plasmon resonance" (SPR, Biacore) die Gleichgewichtskonstanten der Dissoziation (K_D) für die Interaktion der Proteine m-PrfA_{nt}, m-PrfA*_{nt}, m-PrfA und i-PrfA mit einer 28 bp langen DNA-Sequenz gemessen werden, welche die perfekte PrfA-Box mit den flankierenden sieben Basen von m-*Phly* enthält (Mauder *et al.*, 2006).

Zusätzlich zu den Experimenten *in vitro* wurde zudem ein *prfA*-Allelaustausch in *L. monocytogenes* EGDe vorgenommen. Hierfür wurde dessen *prfA*-Gen durch das von *L. seeligeri* (s-*prfA*) ersetzt, um auch *in vivo* etwaige Unterschiede in der Expression von Virulenzgenen dokumentieren zu können.

E.2.3.1 DNA-Bindung von PrfA Proteinen

Die von Gerald Seidel durchgeführten SPR-Messungen ergaben folgende Gleichgewichtskonstanten (K_D): $4,6 \pm 0,6 \times 10^{-9}$ M (m-PrfA_{nt}), $\sim 8,2 \pm 0,6 \times 10^{-11}$ M (m-PrfA*_{nt}), $6,0 \pm 1,0 \times 10^{-10}$ M (m-PrfA) und $3,6 \pm 0,1 \times 10^{-10}$ M (i-PrfA) (Mauder *et al.*, 2006). Da für diese Proteine die K_D -Werte im nanomolaren Bereich liegen, kann man bei der Annahme, dass das zytosolische Volumen eines Listeriums bei etwa 1×10^{-16} bis 2×10^{-16} Litern liegt, davon ausgehen, dass bereits einige wenige Moleküle PrfA genügen, um an die PrfA-Box zu binden. Die Bindung von PrfA scheint den ersten Schritt für die Transkription eines PrfA-abhängigen Promotors darzustellen, da zuvorige Bindung der RNA-Polymerase an die DNA zu einer Hemmung der rein PrfA-abhängigen Transkription führt (Vega *et al.*, 2004), wie es analog auch schon bei Crp-abhängigen Promotoren der Klasse II gezeigt wurde (Zhang & Schleif, 1996). Die von Eiting *et al.* gemessenen Gleichgewichtskonstanten für PrfA und PrfA* liegen mit $9 \pm 1 \times 10^{-7}$ M (PrfA) und $5 \pm 1 \times 10^{-8}$ M (PrfA*) (Eiting *et al.*, 2005) um etwa drei dekadische Größenordnungen höher als die von Gerald Seidel gemessenen Werte. Dies kann unter Umständen mit den verschiedenen Arten der Proteinaufreinigung zusammenhängen oder aber auch mit den unterschiedlichen Puffern, die bei der SPR verwendet wurden, da diese vor allem in den verwendeten pH-Werten (pH 7,4 gegenüber pH 8,5 (Eiting *et al.*)) stark voneinander abweichen. In beiden Fällen zeigt die G145S Mutante gegenüber der wildtypischen Form des PrfA Proteins eine erhöhte Affinität für die Ziel-DNA. Der Faktor für

diese Erhöhung beträgt 18 bei den His₆-markierten Proteinen (Eiting *et al.*) und etwa 50 bei den unmarkierten Proteinen.

Die von Regina Ecke durchgeführten EMSA Versuche zeigten, dass m-PrfA* und i-PrfA mit vergleichbarer Affinität deutlich stärker an die PrfA-Box binden als m-PrfA oder gar s-PrfA. Bei Letzterem war in den meisten Fällen überhaupt kein Komplex aus PrfA und markierter Sonden-DNA (dieser Komplex wird CIII genannt) zu detektieren, während der CIII von m-PrfA um mindestens zwei dekadische Größenordnungen schwächer war als der von i-PrfA und m-PrfA*. Dieses Ergebnis war sowohl bei *PactA* als auch *Phly* aller drei Spezies zu beobachten.

Was der Grund für die hohe Bindungsaffinität von i-PrfA im Vergleich zu m-PrfA ist, konnte bisher noch nicht geklärt werden. Da sich i-PrfA im EMSA jedoch sehr ähnlich wie m-PrfA* verhält, könnte es sein, dass i-PrfA eine der Veränderungen gegenüber m-PrfA aufweist, die schon zuvor für hyperaktive PrfA Proteine beschrieben wurden (Ripio *et al.*, 1997b; Sheehan *et al.*, 1996; Shetron-Rama *et al.*, 2003; Vega *et al.*, 1998; Vega *et al.*, 2004; Wong & Freitag, 2004). Beim Vergleich der Aminosäuresequenzen von i-PrfA und m-PrfA in Abbildung 35, in der auch bereits beschriebene Mutationen eingetragen sind, fällt bei i-PrfA der Cysteinrest 183 auf, der unter Umständen wie die beschriebene S183A Substitution (Sheehan *et al.*, 1996) für eine erhöhte Aktivität bzw. DNA-Bindung verantwortlich sein könnte.

Auffällig ist die Diskrepanz der Messungen aus SPR und EMSA bezüglich der Bindung von i-PrfA. Die gemessene K_D für i-PrfA war mit $3,6 \times 10^{-10}$ M nur unwesentlich kleiner als die von m-PrfA mit 6×10^{-10} M. Dieser kleine Unterschied von weniger als Faktor zwei erklärt nicht den über hundertfachen Unterschied bei der Bindung in den EMSA Versuchen. Die Versuchsbedingungen sind jedoch sehr verschieden. In der SPR wurden Oligonukleotide mit einer Länge von 28 bp untersucht. Da DNA dieser Länge im EMSA jedoch nur schwach mit PrfA interagiert, wurden wie auch schon in früheren Untersuchungen längere DNA-Sonden (100+ bp) verwendet (Dickneite *et al.*, 1998; Freitag *et al.*, 1993; Sheehan *et al.*, 1996), die mit PrfA einen stärkeren Komplex eingehen. In DNaseI-Footprint-Versuchen konnte gezeigt werden, dass PrfA bei *Phly* auch die Positionen -58 bis -33 relativ zum Transkriptionsstart schützt (Dickneite *et al.*, 1998; Vega *et al.*, 1998). Somit bindet PrfA nicht nur an der 14 bp langen PrfA-Box, sondern auch 10 bp stromaufwärts und 2 bp stromabwärts, weshalb außer der PrfA-Box auch die flankierenden Sequenzen eine Rolle bei der DNA-Bindung spielen könnten.

Abgesehen von diesen detaillierten Ergebnissen zeigen beide Methoden (SPR und EMSA) gleiche Tendenzen für die Bindung der PrfA Proteine und bestätigen nochmals, dass die gereinigten Proteine auch ohne die Anwesenheit etwaiger aktivierender Faktoren (wie Paf; Böckmann *et al.*, 1996) selbst voll aktiv sind. Allerdings wäre es unter Umständen möglich, dass der unbekannte PrfA aktivierende Faktor Paf auch in *E. coli* M15 vorhanden ist und bei der Aufreinigung der rekombinanten Proteine kopurifiziert wurde oder auf anderen Wegen in die Präparate gelangt ist.

E.2.3.2 Bildung von geschlossenem Transkriptionskomplex und Transkriptionsaktivierung

Im Gegensatz zur Bildung von CIII in den EMSA Versuchen konnte ein geschlossener Komplex aus RNA-Polymerase, PrfA und DNA (dieser Komplex wird CI genannt), der die Voraussetzung für PrfA-abhängige Transkription ist, bei allen eingesetzten PrfA Proteinen und allen getesteten Promotoren beobachtet werden. Der große Unterschied zwischen m-PrfA und i-PrfA in der DNA-Bindung (CIII) übertrug sich nicht auf die Bildung von CI. Für eine abgesättigte Bildung dieses Komplexes (definiert durch das Austitrieren des CII, der den Komplex aus RNA-Polymerase und DNA-Sonde darstellt) mit m-*Phly* waren sowohl bei m-PrfA als auch bei i-PrfA 60 nM Protein nötig. Bei m-PrfA* waren es lediglich 18 nM. Für die abgesättigte Bildung von CI bei s-PrfA war jedoch mit 3,5 μ M eine etwa 60-mal höhere

Konzentration an s-PrfA nötig als für m-PrfA oder i-PrfA. Im Vergleich zu m-PrfA* betrug dieser Faktor sogar rund 200 (Mauder *et al.*, 2006).

Bei der Untersuchung der Promotoren *Phly* und *PactA* der drei Spezies mittels *in vitro* Transkription ließen sich zwar kleinere Unterschiede in den Transkripten feststellen – insbesondere s-*Phly* besitzt eine höhere Basistranskription und zwei Transkriptionsstarts – doch hat sich gezeigt, dass die PrfA-abhängigen Promotoren von *L. seeligeri* voll funktionsfähig sind. Auch die EMSA Studien ergaben, dass die aktiven PrfAs an die PrfA-Boxen der Promotoren von *L. seeligeri* binden und zusammen mit RNA-Polymerase einen geschlossenen Komplex bilden können (Mauder *et al.*, 2006). Eine speziesspezifische Anpassung von Promotoren und PrfA Proteinen gleicher Spezies konnte weder in den "run off" *in vitro* Transkriptionsassays aus dieser Arbeit noch in den EMSA Versuchen von Regina Ecke nachgewiesen werden. Das heißt, dass z.B. m-PrfA im Vergleich zu i-PrfA bei den Promotoren aller drei Spezies die grundsätzlich gleiche spezifische Aktivität besitzt.

Die Fähigkeit zur Bildung von CI stimmt sehr gut mit den in den *in vitro* Transkriptionsexperimenten erhaltenen Daten überein, allerdings sind die Unterschiede zwischen den einzelnen PrfA Proteinen noch kleiner. Während i-PrfA und m-PrfA praktisch gleiche Aktivität zeigen, ist die Aktivität von m-PrfA* weniger als doppelt so hoch. Der Unterschied zwischen s-PrfA und i-PrfA bzw. m-PrfA beträgt bei den *hly*-Promotoren etwa Faktor 20.

Die Ergebnisse aus Bindungsstudien und Transkriptionsexperimenten zeigen, dass für eine effiziente Transkriptionsaktivierung mehr als nur eine gute DNA-Bindung nötig ist. Besonders deutlich wird dies im Falle von s-PrfA. Das PrfA von *L. seeligeri* bindet nur schlecht an alle getesteten Promotoren und zeigt auch nur eine geringe Transkriptionsaktivierung. Dies lässt vermuten, dass bei PrfA-abhängigen Promotoren eine gute Bindung an die PrfA-Box eine notwendige Voraussetzung für die Bildung eines aktiven Transkriptionskomplexes ist. Darüber hinaus könnte die Interaktion des PrfA Proteins mit der RNA-Polymerase von gleichrangiger Bedeutung sein, da die Proteine m-PrfA, m-PrfA* und i-PrfA trotz der großen Unterschiede in der DNA-Bindung alle ähnlich gut dazu in der Lage sind die Transkription zu aktivieren. Weiterhin könnten *in vivo* beobachtete Unterschiede in der Expression von Virulenzgenen nicht nur durch unterschiedliche Bindungsaffinitäten dieser drei PrfA Proteine an die Promotoren PrfA-abhängiger Gene begründet werden, sondern auch durch unterschiedliche Wechselwirkung mit den bereits postulierten inhibitorischen Faktoren, welche die spezifische Aktivität von PrfA regulieren (Herro *et al.*, 2005; Sonja Mertins, persönliche Mitteilung).

E.2.3.3 Einfluss der His₆-Markierung

Beim Vergleich von His₆-markierten und unmarkierten PrfA Proteinen ergab sich, dass die Markierung die Bindung von PrfA an die Ziel-DNA verstärkt. Messungen mittels SPR ergaben für m-PrfA_{nt} eine K_D von 4,6×10⁻⁹ M und für m-PrfA eine K_D von 6×10⁻¹⁰ M. His₆-markiertes PrfA bindet somit etwa um den Faktor sieben bis acht mal besser an die PrfA-Box als das unmarkierte Protein. Die hyperaktiven PrfA Proteine m-PrfA*_{nt} und m-PrfA* konnten mit SPR jedoch leider nicht verglichen werden, da die Bindung von m-PrfA* zu stark war und damit außerhalb des Messbereichs des Gerätes lag. Der Vergleich von His₆-markierten und unmarkierten PrfA Proteinen in EMSA Versuchen von Regina Ecke (in diesem Fall mit dem Promotor von *hly*) ergab ein sehr ähnliches Bild. Hier waren allerdings die Bindungen der normalen "wildtypischen" Proteine an die DNA-Sonde (gemessen durch die Menge an CIII) zu schwach für einen validen Vergleich. Bei den hyperaktiven Proteinen m-PrfA*_{nt} und m-PrfA* war jedoch zu erkennen, dass die His₆-Markierung die Bindung etwa um den Faktor zehn verbessert. Die Ergebnisse der beiden experimentellen Ansätze stimmen folglich gut miteinander überein (Mauder *et al.*, 2006). Wodurch die verbesserte Bindung zustande kommt ist jedoch nicht ganz klar. Als Grund könnte die Addition der positiv geladenen

Aminosäurereste von Histidin angeführt werden, die somit eine unspezifische Bindung des Proteins an die negativ geladene DNA verstärken. Histidinseitenketten sind die einzigen, die bei physiologischen pH-Werten ihre Ladung ändern können. Die Seitenkette eines Histidinrestes besitzt einen pKs-Wert von 6,7 bis 7,1, d.h. in diesem pH-Bereich liegt der Aminosäurerest zu 50% in protonierter Form vor. Die oben genannten Versuche wurden bei pH-Werten von 7,4 (SPR) und 7,9 (EMSA) durchgeführt, womit die Histidinreste noch zu einem gewissen Teil protoniert und damit geladen sein dürften. Betrachtet man die geschätzten pI-Werte (Gasteiger *et al.*, 2005; InforMax, 2003; Moszer *et al.*, 1995; Stryer, 1988) von m-PrfA_{nt} (pI 8,1 bis 8,2) und m-PrfA (pI 7,1 bis 7,5) so fällt jedoch auf, dass eine positive Ladung unter den verwendeten Versuchsbedingungen eher beim unmarkierten PrfA zu erwarten wäre. Grund für den niedrigeren pI von m-PrfA sind die unter physiologischen Bedingungen negativ geladenen Aspartatreste der Enterokinaseschnittstelle. Die ungleiche Ladung der Proteine erscheint somit als Begründung für die unterschiedlichen Bindungsaffinitäten im EMSA unplausibel. In den Messungen mittels SPR ist ein solcher Effekt sogar ganz auszuschließen da als Negativkontrolle und Referenz stets ein Oligonukleotid ohne PrfA-Box verwendet wurde. Eventuell bewirkt die Markierung jedoch eine Konformationsänderung des Proteins, die sich günstig auf die DNA-Bindung auswirkt. Obwohl die His₆-Markierung die Bindung an die Ziel-DNA verbessert, führt sie in EMSA Versuchen nicht gleichzeitig zu einer proportional höheren Bildung von CI. Auch *in vitro* Transkriptionsstudien mit den markierten und unmarkierten PrfA Proteinen (durchgeführt von Stefanie Müller-Altrock) zeigten keine Erhöhung der Transkription, die mit der höheren DNA-Bindung übereinstimmen würde. Sowohl die Bildung von CI als auch die Transkriptionsaktivität wurden durch His₆-markierte PrfA Proteine gegenüber ihren unmarkierten Pendanten höchstens um den Faktor zwei verstärkt (Mauder *et al.*, 2006). Die Beobachtungen, dass verbesserte DNA-Bindung nicht zu einer proportionalen Verstärkung der Bildung von geschlossenen Transkriptionskomplexen (CI) oder einer ebenso erhöhten Transkriptionsaktivität führt, bestätigen nochmals die bereits erwähnten Schlussfolgerungen, dass für eine gute Transkription neben der Bindung an die DNA weitere Faktoren eine Rolle spielen, wie z.B. die Wechselwirkung mit der RNA-Polymerase.

E.2.3.4 Hybridprotein sm-PrfA

Da s-PrfA eine vergleichsweise niedrige Aktivität aufweist, die nicht mit etwaigen Fehlern bei der Präparation des Proteins erklärt werden konnte, wurde dessen Aminosäuresequenz mit denen von m-PrfA und i-PrfA verglichen und dort nach möglichen Gründen für die geringe Aktivität gesucht. Dabei fiel eine Häufung von Abweichungen im C-terminalen Teil von s-PrfA auf, die unter Umständen für die verringerte Aktivität verantwortlich sein könnten. Der C-Terminus von PrfA ist für die Interaktion des Proteins mit der Ziel-DNA verantwortlich, und es konnte bereits gezeigt werden, dass sein Fehlen zu einem Verlust der DNA-Bindung führt (Herler *et al.*, 2001).

Um zu überprüfen, welchen Einfluss die C-terminalen Aminosäuresubstitutionen im Vergleich zu m-PrfA auf die Aktivität von s-PrfA haben, wurde in dieser Arbeit ein Hybridprotein (sm-PrfA) aus s-PrfA und m-PrfA hergestellt. Dieses sm-PrfA gleicht s-PrfA bis auf die letzten C-terminalen 38 Aminosäurereste, welche durch die 38 C-terminalen Aminosäurereste von m-PrfA ersetzt wurden. Die Proteine m-PrfA, sm-PrfA und s-PrfA wurden dann in direktem Vergleich mittels *in vitro* Transkriptionsstudien am *hly* Promotor von *L. seeligeri* (s-*Phly*) und am *actA* Promotor von *L. monocytogenes* (m-*PactA*) getestet. Parallel wurden von Regina Ecke auch hier wieder EMSA Versuche mit diesen Proteinen und einer DNA-Sonde mit dem *hly* Promotor durchgeführt.

Die EMSA Studien ergaben keine miteinander vergleichbaren PrfA-DNA-Komplexe (CIII), da die Bindung dieser PrfA Proteine an die DNA-Sonde offensichtlich zu schwach war. Somit kann die Bindung der Proteine an die Ziel-DNA leider nicht direkt verglichen werden.

Komplexe aus RNA-Polymerase und DNA-Sonde (CII) und geschlossene Transkriptionskomplexe aus RNA-Polymerase, PrfA Protein und DNA-Sonde (CI) konnten jedoch beobachtet werden. Bei der Verwendung von m-PrfA ging der CII bei einer PrfA-Konzentration von 60 nM vollständig in den CI über. Dies geschah bei der Verwendung von sm-PrfA bei einer Konzentration von 2,8 μ M und bei der Verwendung von s-PrfA bei einer Konzentration von 3,5 μ M. Die in dieser Arbeit durchgeführten *in vitro* Transkriptionsstudien ergaben für m-PrfA:sm-PrfA:s-PrfA ein Aktivitätsverhältnis von 21:3:1 bei der Verwendung von s-*Phly* und ein Verhältnis von 58:3:1 bei der Verwendung von m-*PactA*. Die Unterschiede der Verhältnisse bei den beiden Promotoren können vielleicht damit erklärt werden, dass die PrfA-Box von s-*Phly* vollständig dem Konsensus entspricht, während die PrfA-Box von m-*PactA* an Position 14 eine Abweichung gegenüber dem Konsensus aufweist. Unter Umständen sind die weniger aktiven PrfA Proteine s-PrfA und sm-PrfA nicht so gut in der Lage an leicht abweichende PrfA-Boxen zu binden.

Diese Ergebnisse zeigen deutlich, dass sm-PrfA gegenüber s-PrfA eine verbesserte Aktivität besitzt, doch konnte mit dem Austausch des C-Terminus die Aktivität von PrfA aus *L. seeligeri* nur zu einem kleinen Teil wiederhergestellt werden. Demzufolge müssen andere Unterschiede in der Aminosäuresequenz für die niedrige Aktivität von s-PrfA hauptverantwortlich sein. Denkbar wäre natürlich auch ein synergistisches Wirken von mehreren über die Sequenz von s-PrfA verstreuten Substitutionen im Vergleich zu m-PrfA, welche zu dieser Inaktivierung führen.

E.2.3.5 Verminderte Aktivität von s-PrfA *in vivo*

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Mutanten *Listeria monocytogenes* EGDe m-*prfA* (*Lm* m-*prfA*) und *L. monocytogenes* EGDe s-*prfA* (*Lm* s-*prfA*) hergestellt. Dies sind Derivate von *L. monocytogenes* EGDe Δ *prfA* (Chatterjee *et al.*, 2006), bei denen durch homologe Rekombination die jeweiligen proteinkodierenden Sequenzen der *prfA*-Allele von *L. monocytogenes* EGDe und *L. seeligeri* an die Stelle des ursprünglichen *prfA*-Gens inseriert wurden. Im Falle von *Lm* m-*prfA* sollte damit zur Kontrolle der wildtypische Zustand wiederhergestellt werden, während in *Lm* s-*prfA* die Auswirkungen der *in vitro* beobachteten schwachen Aktivität von s-PrfA auch *in vivo* untersucht werden sollten.

Lm s-*prfA* zeigte in Western Blot und Hämolyseassays wie erwartet nur eine äußerst schwache Expression der PrfA-abhängigen Virulenzgene *actA* und *hly*. So war beispielsweise die hämolytische Aktivität von *Lm* s-*prfA* bei Wachstum mit Glycerin gegenüber *L. monocytogenes* EGDe Wildtyp um mehr als Faktor 10 verringert. Erstaunlicherweise unterschied sich aber auch *Lm* m-*prfA* durch eine stark erhöhte Virulenzgenexpression vom Wildtyp, obwohl diese beiden Stämme eigentlich genetisch identisch sein sollten. In der *prfA*-Genregion wurde diese Identität auch durch Sequenzierung verifiziert. Sowohl *Lm* s-*prfA* als auch *Lm* m-*prfA* wurden jedoch aus der gleichen *prfA*-Deletionsmutante hergestellt, bei der etwaige andere Veränderungen in der Virulenzgenexpression durch das Fehlen von PrfA zunächst maskiert sein könnten.

Im Mausmodell zeigte sich, dass *Lm* s-*prfA* auch eine insgesamt attenuierte Virulenz aufweist. Die Anzahl der Mutanten in Milz und Leber war um 1,5 log-Stufen hochsignifikant geringer als die des Wildtyps.

Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass die auch *in vitro* beobachtete verringerte Aktivität von s-PrfA, sich auch *in vivo* manifestiert. Dafür kann alleine die Proteinsequenz verantwortlich gemacht werden, da in *Lm* s-*prfA* (und *Lm* m-*prfA*) die Expression des *prfA*-Gens immer noch unter Kontrolle der originalen Promotoren von *L. monocytogenes* steht und nur die proteinkodierende Sequenz ausgetauscht wurde. Die Apathogenität von *L. seeligeri* kann also zumindest teilweise auf Veränderungen in der Proteinstruktur von PrfA zurück geführt werden.

E.2.3.6 Evolutiver Status von *L. seeligeri* als potentielles Pathogen

Die *Listeria* Pathogenitätsinsel (LIPI-1), die unter anderem die Gene für PrfA (*prfA*) und Hämolyisin (*hly*) enthält, kann in den drei Spezies *L. monocytogenes*, *L. ivanovii* und *L. seeligeri* gefunden werden (Kreft *et al.*, 2002), jedoch nicht in den übrigen Spezies wie z.B. *L. innocua* oder *L. welshimeri*, welche beide die Pathogenitätsinsel in getrennten evolutionären Prozessen verloren haben (Chakraborty *et al.*, 2000; Schmid *et al.*, 2005). Während LIPI-1 bei den pathogenen Spezies *L. monocytogenes* und *L. ivanovii* hohe Ähnlichkeit aufweist, besitzt LIPI-1 beim apathogenen *L. seeligeri* wesentliche Unterschiede im Vergleich zu den erstgenannten (Chakraborty *et al.*, 2000; Gouin *et al.*, 1994). Es wurde bisher noch nicht geklärt, ob LIPI-1 von *L. seeligeri* eine inaktivierte Form einer früher voll funktionstüchtigen Pathogenitätsinsel darstellt, oder ob es sich um die LIPI-1 eines Bakteriums handelt, das sich evolutiv noch nicht an das Überleben in eukaryotischen Zellen angepasst hat (Schmid *et al.*, 2005). Die Ergebnisse dieser Arbeit sprechen eher für die erste Möglichkeit.

Von Karunasagar *et al.* konnte bereits gezeigt werden, dass Teile des pathogenen Potentials von *L. seeligeri* durch Einbringen von plasmidkodiertem *plcA/prfA* aus *L. monocytogenes* restauriert werden können. So ist *L. seeligeri* nach Komplementation mit einer PrfA exprimierenden Gensequenz in der Lage genug eigenes Hämolyisin (Seeligeriolysin, SLO) zu produzieren und damit aus dem Phagosom der Wirtszelle zu entkommen (Karunasagar *et al.*, 1997). Dies zeigt, dass *in vivo* sowohl der Promotor des *hly*-Gens von *L. seeligeri* (*s-Phly*) als auch das von *hly* kodierte SLO selbst voll aktiv sind. Die in dieser Arbeit durchgeführten *in vitro* Untersuchungen konnten ebenfalls die Funktionstüchtigkeit von *s-Phly* und auch die von *s-PactA* und *s-PplcA* nachweisen. Während das spezieeigene *s-PrfA* bei diesen Promotoren eine mindestens 20-fach niedrigere Aktivität zeigt, können *m-PrfA* und *i-PrfA* genauso gut an *s-Phly* und *s-PactA* binden und die Transkription aktivieren wie sie es bei den entsprechenden Promotoren von *L. monocytogenes* und *L. ivanovii* vermögen. Die untersuchten PrfA-abhängigen Promotoren in der LIPI-1 von *L. seeligeri* entsprechen demnach denen einer pathogenen *Listeria*spezies.

Das *s-PrfA* Protein zeigt allgemein bei den PrfA-abhängigen Promotoren der eigenen und anderer Spezies eine geringe spezifische Aktivität, die vermutlich auf die zahlreichen nicht stillen Mutationen in *prfA* von *L. seeligeri* zurückzuführen sind. Das und die geringe Expression des *prfA*-Gens, ausgelöst durch die Insertion eines abweichend transkribierten offenen Leserahmens (*orfE* genannt) zwischen *plcA* und *prfA*, welcher u. a. den autoregulatorischen Loop vor dem *prfA*-Gen zerstört (Karunasagar *et al.*, 1997; Kreft *et al.*, 1999; Vázquez-Boland *et al.*, 2001b), führen vermutlich dazu, dass die Gesamtaktivität an PrfA in *L. seeligeri* nicht ausreicht, um bei Bedarf erfolgreich Virulenzgene zu exprimieren. Daraus lässt sich die Schlussfolgerung ziehen, dass es sich bei der LIPI-1 von *L. seeligeri* eher um eine inaktivierte Form handelt, als um eine noch ungenügend evolvierte Form, die noch nicht für das Überleben in eukaryotischen Zellen angepasst ist.

E.2.4 Ausblick

In Zukunft wären weitere Untersuchung der Internaline von *L. monocytogenes* und *L. ivanovii* vor dem Hintergrund des Wirtstropismus denkbar. Auch die Rolle von *i-InlA* könnte in folgenden Studien näher untersucht werden. Dazu wären Hexosaminidase Assays mit rekombinantem *i-InlA*, wie sie in dieser Arbeit bereits mit anderen Internalinen durchgeführt wurden eine erste, einfache Möglichkeit, um die Bindung des Proteins an Zelloberflächen zu überprüfen. Zusätzlich könnten auch die für *InlA* von *L. monocytogenes* durchgeführten Versuche zur Phagozytose von *InlA*-beschichteten Latex-Beads (Lecuit *et al.*, 1997) mit *i-InlA* wiederholt werden. Letztendlich könnten Invasionsassays mit $\Delta i-inlA$ Mutanten von *L. ivanovii* die Bedeutung dieses Internalins für die Infektion klären.

Zur genaueren Untersuchung der *plcA*- und *hly*-Promotoren von *L. ivanovii* und *L. seeligeri* wären Primer Extension Experimente nützlich. Analog zu den Arbeiten von Luo *et al.* könnten zudem Mutationen in die Promotersequenzen eingefügt werden, um die Auswirkungen bestimmter Sequenzabschnitte auf die Transkription zu analysieren (Luo *et al.*, 2004).

Die bereits geäußerte Vermutung, dass für eine hohe spezifische PrfA-Aktivität die Bindung an die DNA zwar notwendig aber nicht allein ausschlaggebend ist, könnte weiter überprüft werden. Dafür wären gezielte Mutationen des PrfA Proteins hilfreich, die für die Interaktion mit der RNA-Polymerase zuständig sind. Auch könnte man noch prüfen, wie PrfA mit RNA-Polymerase aus anderen Spezies, z.B. mit kommerziell verfügbarer MEGAscript® T7 RNA Polymerase, interagiert, um zu sehen ob PrfA spezielle Anpassungen an die listerielle RNA-Polymerase besitzt.

Um die Gründe für die geringe spezifische Aktivität von s-PrfA weiter zu analysieren, könnten zusätzliche Hybridproteine oder gezielt mutierte PrfA Proteine in Transkriptionsassays und EMSA Versuchen eingesetzt werden. Als Alternative zum bisherigen sm-PrfA wurde bereits ein Expressionsvektor für ein weiteres Hybridprotein kloniert, bei dem der Sequenzübergang von s-PrfA zu m-PrfA nach dem Aminosäurerest L110 (s₁₁₀m-PrfA) anstatt nach I199 (s₁₉₉m-PrfA, in dieser Arbeit sm-PrfA genannt) stattfindet (siehe D.3.4 Abbildung 35). Der Vergleich von m-PrfA, s₁₁₀m-PrfA, s₁₉₉m-PrfA und s-PrfA sollte weitere Aufschlüsse darüber geben in welchem Bereich der Aminosäuresequenz der entscheidende Verlust der Aktivität von s-PrfA verursacht wird.

Genauso könnte bei i-PrfA ein gezielter Austausch des Aminosäurerestes C183 durch einen Serinrest (C183S) klären, ob dieser Cysteinrest der Grund für die hohe DNA-Bindung von i-PrfA ist.

Zur Klärung der Frage, ob *in vivo* die schwache Aktivität von s-PrfA alleine für den apathogenen Phänotyp von *L. seeligeri* verantwortlich ist, könnten auch dort Allelaustausche vorgenommen werden. Dabei könnte sowohl geklärt werden, ob in einem *L. seeligeri* mit m-*prfA* womöglich *orfE* hauptsächlich für die geringe Gesamtaktivität von PrfA ist, oder ob ein spezifisch aktives m-PrfA trotz *orfE* in der Lage wäre die Virulenzgene zu aktivieren. Abhängig vom Ausgang dieser Analysen wäre es im weiteren denkbar eine Restauration des pathogenen Phänotyps von *L. seeligeri* durch Deletion von *orfE* und/oder einen *prfA*-Allelaustausch zu versuchen, da noch völlig unbekannt ist, ob die übrige Genausstattung von *L. seeligeri* (z.B. Internalingene) für ein intrazelluläres Pathogen *in vivo* ausreichend ist, auch wenn ein Einzelfall dies vermuten lässt (Rocourt *et al.*, 1986).

F Quellen

- Abram, M., Schluter, D., Vuckovic, D., Wraber, B., Doric, M., & Deckert, M. (2003) Murine model of pregnancy-associated *Listeria monocytogenes* infection. *FEMS Immunol Med Microbiol* **35**: 177-182.
- Aiba, H., Fujimoto, S., & Ozaki, N. (1982) Molecular cloning and nucleotide sequencing of the gene for *E. coli* cAMP receptor protein. *Nucleic Acids Res* **10**: 1345-1361.
- Altrock, S. (2002) Genetische Organisation und Transkription eines Virulenz-assoziierten, instabilen Chromosomenabschnitts von *Listeria ivanovii*. In *Lehrstuhl für Mikrobiologie Würzburg: Bayerische Julius-Maximilians-Universität*, pp. 212.
- Alvarez-Domínguez, C., Roberts, R., & Stahl, P.D. (1997a) Internalized *Listeria monocytogenes* modulates intracellular trafficking and delays maturation of the phagosome. *J Cell Sci* **110 (Pt 6)**: 731-743.
- Alvarez-Domínguez, C., Vázquez-Boland, J.A., Carrasco-Marin, E., Lopez-Mato, P., & Leyva-Cobian, F. (1997b) Host cell heparan sulfate proteoglycans mediate attachment and entry of *Listeria monocytogenes*, and the listerial surface protein ActA is involved in heparan sulfate receptor recognition. *Infect Immun* **65**: 78-88.
- Benshushan, A., Tsafrir, A., Arbel, R., Rahav, G., Ariel, I., & Rojansky, N. (2002) *Listeria* infection during pregnancy: a 10 year experience. *Isr Med Assoc J* **4**: 776-780.
- Berg, O.G., & von Hippel, P.H. (1988) Selection of DNA binding sites by regulatory proteins. II. The binding specificity of cyclic AMP receptor protein to recognition sites. *J Mol Biol* **200**: 709-723.
- Bergmann, B. (2002) Funktionale Untersuchung neuer Internaline von *Listeria monocytogenes*. In *Lehrstuhl für Mikrobiologie Würzburg: Bayerische Julius-Maximilians-Universität*.
- Bergmann, B., Raffelsbauer, D., Kuhn, M., Götz, M., Hom, S., & Goebel, W. (2002) InlA- but not InlB-mediated internalization of *Listeria monocytogenes* by non-phagocytic mammalian cells needs the support of other internalins. *Mol Microbiol* **43**: 557-570.
- Bierne, H., & Cossart, P. (2002) InlB, a surface protein of *Listeria monocytogenes* that behaves as an invasin and a growth factor. *J Cell Sci* **115**: 3357-3367.
- Bierne, H., Mazmanian, S.K., Trost, M., Pucciarelli, M.G., Liu, G., Dehoux, P., Jansch, L., Garcia-del Portillo, F., Schneewind, O., & Cossart, P. (2002) Inactivation of the *srtA* gene in *Listeria monocytogenes* inhibits anchoring of surface proteins and affects virulence. *Mol Microbiol* **43**: 869-881.
- Bishop, W.P., & Wen, J.T. (1994) Regulation of Caco-2 cell proliferation by basolateral membrane epidermal growth factor receptors. *Am J Physiol* **267**: G892-900.
- Böckmann, R., Dickneite, C., Middendorf, B., Goebel, W., & Sokolovic, Z. (1996) Specific binding of the *Listeria monocytogenes* transcriptional regulator PrfA to target sequences requires additional factor(s) and is influenced by iron. *Mol Microbiol* **22**: 643-653.
- Böckmann, R., Dickneite, C., Goebel, W., & Bohne, J. (2000) PrfA mediates specific binding of RNA polymerase of *Listeria monocytogenes* to PrfA-dependent virulence gene promoters resulting in a transcriptionally active complex. *Mol Microbiol* **36**: 487-497.
- Bohne, J., Sokolovic, Z., & Goebel, W. (1994) Transcriptional regulation of *prfA* and PrfA-regulated virulence genes in *Listeria monocytogenes*. *Mol Microbiol* **11**: 1141-1150.
- Braun, L., Dramsi, S., Dehoux, P., Bierne, H., Lindahl, G., & Cossart, P. (1997) InlB: an invasion protein of *Listeria monocytogenes* with a novel type of surface association. *Mol Microbiol* **25**: 285-294.
- Braun, L., Nato, F., Payrastra, B., Mazie, J.C., & Cossart, P. (1999) The 213-amino-acid leucine-rich repeat region of the *Listeria monocytogenes* InlB protein is sufficient for entry into mammalian cells, stimulation of PI 3-kinase and membrane ruffling. *Mol Microbiol* **34**: 10-23.
- Braun, L., Ghebrehwet, B., & Cossart, P. (2000) gC1q-R/p32, a C1q-binding protein, is a receptor for the InlB invasion protein of *Listeria monocytogenes*. *Embo J* **19**: 1458-1466.
- Bubert, A., Köhler, 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.
- Busby, S., & Ebright, R.H. (1994) Promoter structure, promoter recognition, and transcription activation in prokaryotes. *Cell* **79**: 743-746.
- Busby, S., & Ebright, R.H. (1997) Transcription activation at class II CAP-dependent promoters. *Mol Microbiol* **23**: 853-859.
- Busby, S., & Ebright, R.H. (1999) Transcription activation by catabolite activator protein (CAP). *J Mol Biol* **293**: 199-213.

- Cabanes, D., Sousa, S., Cebria, A., Lecuit, M., Garcia-del Portillo, F., & Cossart, P. (2005) Gp96 is a receptor for a novel *Listeria monocytogenes* virulence factor, Vip, a surface protein. *Embo J* **24**: 2827-2838.
- Chakraborty, T., Leimeister-Wächter, 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.
- Chakraborty, T., Hain, T., & Domann, E. (2000) Genome organization and the evolution of the virulence gene locus in *Listeria* species. *Int J Med Microbiol* **290**: 167-174.
- Chatterjee, S.S., Hossain, H., Otten, S., Kuenne, C., Kuchmina, K., Machata, S., Domann, E., Chakraborty, T., & Hain, T. (2006) Intracellular gene expression profile of *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun* **74**: 1323-1338.
- Chaturongakul, S., & Boor, K.J. (2004) RsbT and RsbV contribute to sigmaB-dependent survival under environmental, energy, and intracellular stress conditions in *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol* **70**: 5349-5356.
- Chico-Calero, I., Suárez, M., González-Zorn, B., Scotti, M., Slaghuis, J., Goebel, W., & Vázquez-Boland, J.A. (2002) Hpt, a bacterial homolog of the microsomal glucose-6-phosphate translocase, mediates rapid intracellular proliferation in *Listeria*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 431-436.
- Chomczynski, P., Mackey, K., Drews, R., & Wilfinger, W. (1997) DNAzol: a reagent for the rapid isolation of genomic DNA. *Biotechniques* **22**: 550-553.
- Collins, M.D., Wallbanks, S., Lane, D.J., Shah, J., Nietupski, R., Smida, J., Dorsch, M., & Stackebrandt, E. (1991) Phylogenetic analysis of the genus *Listeria* based on reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA. *Int J Syst Bacteriol* **41**: 240-246.
- Cossart, P., Vicente, M.F., Mengaud, J., Baquero, 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.
- 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., & Jonquières, R. (2000) Sortase, a universal target for therapeutic agents against gram-positive bacteria? *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 5013-5015.
- Cowart, R.E., & Foster, B.G. (1985) Differential effects of iron on the growth of *Listeria monocytogenes*: minimum requirements and mechanism of acquisition. *J Infect Dis* **151**: 721-730.
- Cummins, A.J., Fielding, A.K., & McLauchlin, J. (1994) *Listeria ivanovii* infection in a patient with AIDS. *J Infect* **28**: 89-91.
- Dabiri, G.A., Sanger, J.M., Portnoy, D.A., & Southwick, F.S. (1990) *Listeria monocytogenes* moves rapidly through the host-cell cytoplasm by inducing directional actin assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**: 6068-6072.
- 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.
- Dickneite, C., Böckmann, R., Spory, A., Goebel, W., & Sokolovic, Z. (1998) Differential interaction of the transcription factor PrfA and the PrfA-activating factor (Paf) of *Listeria monocytogenes* with target sequences. *Mol Microbiol* **27**: 915-928.
- Domann, E., Leimeister-Wächter, M., Goebel, W., & Chakraborty, T. (1991) Molecular cloning, sequencing, and identification of a metalloprotease gene from *Listeria monocytogenes* that is species specific and physically linked to the listeriolysin gene. *Infect Immun* **59**: 65-72.
- Domann, E., Wehland, J., Niebuhr, K., Haffner, C., Leimeister-Wächter, M., & Chakraborty, T. (1993) Detection of a *prfA*-independent promoter responsible for listeriolysin gene expression in mutant *Listeria monocytogenes* strains lacking the PrfA regulator. *Infect Immun* **61**: 3073-3075.
- Domann, E., Zechel, S., Lingnau, A., Hain, T., Darji, A., Nichterlein, T., Wehland, J., & Chakraborty, T. (1997) Identification and characterization of a novel PrfA-regulated gene in *Listeria monocytogenes* whose product, IrpA, is highly homologous to internalin proteins, which contain leucine-rich repeats. *Infect Immun* **65**: 101-109.
- Domínguez-Bernal, G. (2001) Caracterización de LIPI-2, una nueva isla de patogenicidad de *Listeria*. In *Facultad de Veterinaria, Departamento de Patología Animal I* Madrid: Universidad Complutense de Madrid.
- Domínguez-Bernal, G., Müller-Altrock, S., González-Zorn, B., Scotti, M., Herrmann, P., Monzo, H.J., Lacharme, L., Kreft, J., & Vázquez-Boland, J.A. (2006) A spontaneous genomic deletion in *Listeria ivanovii* identifies LIPI-2, a species-specific pathogenicity island encoding sphingomyelinase and numerous internalins. *Mol Microbiol* **59**: 415-432.
- Donnelly, C.W. (1990) Concerns of microbial pathogens in association with dairy foods. *J Dairy Sci* **73**: 1656-1661.
- Donnelly, C.W. (2001) *Listeria monocytogenes*: a continuing challenge. *Nutr Rev* **59**: 183-194.

- 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.
- Dramsi, S., Biswas, I., Maguin, E., Braun, L., Mastroeni, P., & Cossart, P. (1995) Entry of *Listeria monocytogenes* into hepatocytes requires expression of *inIB*, 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.
- Drevets, D.A., Sawyer, R.T., Potter, T.A., & Campbell, P.A. (1995) *Listeria monocytogenes* infects human endothelial cells by two distinct mechanisms. *Infect Immun* **63**: 4268-4276.
- Drevets, D.A. (1998) *Listeria monocytogenes* virulence factors that stimulate endothelial cells. *Infect Immun* **66**: 232-238.
- Dussurget, O., Cabanes, D., Dehoux, P., Lecuit, M., Buchrieser, C., Glaser, P., & Cossart, P. (2002) *Listeria monocytogenes* bile salt hydrolase is a PrfA-regulated virulence factor involved in the intestinal and hepatic phases of listeriosis. *Mol Microbiol* **45**: 1095-1106.
- Ebright, R.H. (1993) Transcription activation at Class I CAP-dependent promoters. *Mol Microbiol* **8**: 797-802.
- Eiting, M., Hagelucken, G., Schubert, W.D., & Heinz, D.W. (2005) The mutation G145S in PrfA, a key virulence regulator of *Listeria monocytogenes*, increases DNA-binding affinity by stabilizing the HTH motif. *Mol Microbiol* **56**: 433-446.
- 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.
- Engelbrecht, F., Dickneite, C., Lampidis, R., Götz, M., DasGupta, U., & Goebel, W. (1998a) Sequence comparison of the chromosomal regions encompassing the internalin C genes (*inlC*) of *Listeria monocytogenes* and *L. ivanovii*. *Mol Gen Genet* **257**: 186-197.
- Engelbrecht, F., Domínguez-Bernal, G., Hess, J., Dickneite, C., Greiffenberg, L., Lampidis, R., Raffelsbauer, D., Daniels, J.J., Kreft, J., Kaufmann, S.H., Vázquez-Boland, J.A., & Goebel, W. (1998b) A novel PrfA-regulated chromosomal locus, which is specific for *Listeria ivanovii*, encodes two small, secreted internalins and contributes to virulence in mice. *Mol Microbiol* **30**: 405-417.
- Ermolaeva, S., Belyi, Y., & Tartakovskii, I. (1999) Characteristics of induction of virulence factor expression by activated charcoal in *Listeria monocytogenes*. *FEMS Microbiol Lett* **174**: 137-141.
- Ermolaeva, S., Novella, S., Vega, Y., Ripio, M.T., Scortti, M., & Vázquez-Boland, J.A. (2004) Negative control of *Listeria monocytogenes* virulence genes by a diffusible autorepressor. *Mol Microbiol* **52**: 601-611.
- Farber, J.M., & Peterkin, P.I. (1991) *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiol Rev* **55**: 476-511.
- 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.
- Freitag, N.E., & Portnoy, D.A. (1994) Dual promoters of the *Listeria monocytogenes prfA* transcriptional activator appear essential in vitro but are redundant in vivo. *Mol Microbiol* **12**: 845-853.
- 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., Berche, P., Frehel, C., Gouin, E., & Cossart, P. (1991) Entry of *L. 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., Jaubert, F., & Berche, P. (1996) The *inlAB* locus mediates the entry of *Listeria monocytogenes* into hepatocytes *in vivo*. *J Exp Med* **183**: 359-369.
- Galan, J.E., Pace, J., & Hayman, M.J. (1992) Involvement of the epidermal growth factor receptor in the invasion of cultured mammalian cells by *Salmonella typhimurium*. *Nature* **357**: 588-589.
- Garandeau, C., Régliez-Poupet, H., Dubail, I., Beretti, J.L., Berche, P., & Charbit, A. (2002) The sortase SrtA of *Listeria monocytogenes* is involved in processing of internalin and in virulence. *Infect Immun* **70**: 1382-1390.
- Garges, S., & Adhya, S. (1985) Sites of allosteric shift in the structure of the cyclic AMP receptor protein. *Cell* **41**: 745-751.
- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M.R., Appel, R.D., & Bairoch, A. (2005) *Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server* Humana Press.
- Geiger, B., Ayalon, O., Ginsberg, D., Volberg, T., Rodriguez Fernandez, J.L., Yarden, Y., & Ben-Ze'ev, A. (1992) Cytoplasmic control of cell adhesion. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **57**: 631-642.
- Geoffroy, C., Gaillard, J.L., Alouf, J.E., & Berche, P. (1989) Production of thiol-dependent haemolysins by *Listeria monocytogenes* and related species. *J Gen Microbiol* **135**: 481-487.

- Glaser, P., Frangeul, L., Buchrieser, C., Rusniok, C., Amend, A., Baquero, F., Berche, P., Bloecker, H., Brandt, P., Chakraborty, T., Charbit, A., Chetouani, F., Couve, E., de Daruvar, A., Dehoux, P., Domann, E., Domínguez-Bernal, G., Duchaud, E., Durant, L., Dussurget, O., Entian, K.D., Fsihi, H., Garcia-del Portillo, F., Garrido, P., Gautier, L., Goebel, W., Gomez-Lopez, N., Hain, T., Hauf, J., Jackson, D., Jones, L.M., Kaerst, U., Kreft, J., Kuhn, M., Kunst, F., Kurapkat, G., Madueno, E., Maitournam, A., Vicente, J.M., Ng, E., Nedjari, H., Nordsiek, G., Novella, S., de Pablos, B., Perez-Diaz, J.C., Purcell, R., Rimmel, B., Rose, M., Schlueter, T., Simoes, N., Tierrez, A., Vázquez-Boland, J.A., Voss, H., Wehland, J., & Cossart, P. (2001) Comparative genomics of *Listeria* species. *Science* **294**: 849-852.
- González-Zorn, B., Domínguez-Bernal, G., Suárez, M., Ripio, M.T., Vega, Y., Novella, S., Rodríguez, A., Chico, I., Tierrez, A., & Vázquez-Boland, J.A. (2000) SmcL, a novel membrane-damaging virulence factor in *Listeria*. *Int J Med Microbiol* **290**: 369-374.
- Gouin, E., Mengaud, J., & Cossart, P. (1994) The virulence gene cluster of *Listeria monocytogenes* is also present in *Listeria ivanovii*, an animal pathogen, and *Listeria seeligeri*, a nonpathogenic species. *Infect Immun* **62**: 3550-3553.
- Gray, M.L., & Killinger, A.H. (1966) *Listeria monocytogenes* and listeric infections. *Bacteriol Rev* **30**: 309-382.
- Gregory, S.H., Sagnimeni, A.J., & Wing, E.J. (1996) Expression of the *inlAB* operon by *Listeria monocytogenes* is not required for entry into hepatic cells in vivo. *Infect Immun* **64**: 3983-3986.
- Greiffenberg, L., Sokolovic, Z., Schnittler, H.J., Spory, A., Böckmann, R., Goebel, W., & Kuhn, M. (1997) *Listeria monocytogenes*-infected human umbilical vein endothelial cells: internalin-independent invasion, intracellular growth, movement, and host cell responses. *FEMS Microbiol Lett* **157**: 163-170.
- Greiffenberg, L., Goebel, W., Kim, K.S., Weiglein, I., Bubert, A., Engelbrecht, F., Stins, M., & Kuhn, M. (1998) Interaction of *Listeria monocytogenes* with human brain microvascular endothelial cells: InlB-dependent invasion, long-term intracellular growth, and spread from macrophages to endothelial cells. *Infect Immun* **66**: 5260-5267.
- Greiffenberg, L., Goebel, W., Kim, K.S., Daniels, J., & Kuhn, M. (2000) Interaction of *Listeria monocytogenes* with human brain microvascular endothelial cells: an electron microscopic study. *Infect Immun* **68**: 3275-3279.
- Harman, J.G. (2001) Allosteric regulation of the cAMP receptor protein. *Biochim Biophys Acta* **1547**: 1-17.
- Helmann, J.D. (1995) Compilation and analysis of *Bacillus subtilis* sigma A-dependent promoter sequences: evidence for extended contact between RNA polymerase and upstream promoter DNA. *Nucleic Acids Res* **23**: 2351-2360.
- Herler, M., Bubert, A., Götz, M., Vega, Y., Vázquez-Boland, J.A., & Goebel, W. (2001) Positive selection of mutations leading to loss or reduction of transcriptional activity of PrfA, the central regulator of *Listeria monocytogenes* virulence. *J Bacteriol* **183**: 5562-5570.
- Herro, R., Poncet, S., Cossart, P., Buchrieser, C., Gouin, E., Glaser, P., & Deutscher, J. (2005) How Seryl-Phosphorylated HPr Inhibits PrfA, a Transcription Activator of *Listeria monocytogenes* Virulence Genes. *J Mol Microbiol Biotechnol* **9**: 224-234.
- Heyduk, T., & Lee, J.C. (1989) *Escherichia coli* cAMP receptor protein: evidence for three protein conformational states with different promoter binding affinities. *Biochemistry* **28**: 6914-6924.
- Hof, H., & Hefner, P. (1988) Pathogenicity of *Listeria monocytogenes* in comparison to other *Listeria* species. *Infection* **16 Suppl 2**: S141-144.
- Houts, G.E., Miyagi, M., Ellis, C., Beard, D., & Beard, J.W. (1979) Reverse transcriptase from avian myeloblastosis virus. *J Virol* **29**: 517-522.
- Hueck, C.J., & Hillen, W. (1995) Catabolite repression in *Bacillus subtilis*: a global regulatory mechanism for the gram-positive bacteria? *Mol Microbiol* **15**: 395-401.
- InforMax (2003) Vector NTI. InforMax, Inc.
- Ireton, K., Payrastra, B., Chap, H., Ogawa, W., Sakaue, H., Kasuga, M., & Cossart, P. (1996) A role for phosphoinositide 3-kinase in bacterial invasion. *Science* **274**: 780-782.
- Ireton, K., Payrastra, B., & Cossart, P. (1999) The *Listeria monocytogenes* protein InlB is an agonist of mammalian phosphoinositide 3-kinase. *J Biol Chem* **274**: 17025-17032.
- Jensen, V.B., Harty, J.T., & Jones, B.D. (1998) Interactions of the invasive pathogens *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes*, and *Shigella flexneri* with M cells and murine Peyer's patches. *Infect Immun* **66**: 3758-3766.
- Johansson, J., Mandin, P., Renzoni, A., Chiaruttini, C., Springer, M., & Cossart, P. (2002) An RNA thermosensor controls expression of virulence genes in *Listeria monocytogenes*. *Cell* **110**: 551-561.
- Jonquière, R., Bierne, H., Fiedler, F., Gounon, P., & Cossart, P. (1999) Interaction between the protein InlB of *Listeria monocytogenes* and lipoteichoic acid: a novel mechanism of protein association at the surface of gram-positive bacteria. *Mol Microbiol* **34**: 902-914.
- Jonquière, R., Pizarro-Cerda, J., & Cossart, P. (2001) Synergy between the N- and C-terminal domains of InlB for efficient invasion of non-phagocytic cells by *Listeria monocytogenes*. *Mol Microbiol* **42**: 955-965.

- Joseph, B., Przybilla, K., Stuhler, C., Schauer, K., Slaghuis, J., Fuchs, T.M., & Goebel, W. (2006) Identification of *Listeria monocytogenes* genes contributing to intracellular replication by expression profiling and mutant screening. *J Bacteriol* **188**: 556-568.
- Junttila, J.R., Niemela, S.I., & Hirn, J. (1988) Minimum growth temperatures of *Listeria monocytogenes* and non-haemolytic *Listeria*. *J Appl Bacteriol* **65**: 321-327.
- Karunasagar, I., Senghaas, B., Krohne, G., & Goebel, W. (1994) Ultrastructural study of *Listeria monocytogenes* entry into cultured human colonic epithelial cells. *Infect Immun* **62**: 3554-3558.
- Karunasagar, I., Lampidis, R., Goebel, W., & Kreft, J. (1997) Complementation of *Listeria seeligeri* with the *plcA-prfA* genes from *L. monocytogenes* activates transcription of seeligerolysin and leads to bacterial escape from the phagosome of infected mammalian cells. *FEMS Microbiol Lett* **146**: 303-310.
- Katouzian-Safadi, M., Blazy, B., Cremet, J.Y., Le Caer, J.P., Rossier, J., & Charlier, M. (1993) Photo-cross-linking of CRP to nonspecific DNA in the absence of cAMP. DNA interacts with both the N- and C-terminal parts of the protein. *Biochemistry* **32**: 1770-1773.
- Kazmierczak, M.J., Mithoe, S.C., Boor, K.J., & Wiedmann, M. (2003) *Listeria monocytogenes* sigma B regulates stress response and virulence functions. *J Bacteriol* **185**: 5722-5734.
- Kim, H., Boor, K.J., & Marquis, H. (2004) *Listeria monocytogenes* sigmaB contributes to invasion of human intestinal epithelial cells. *Infect Immun* **72**: 7374-7378.
- Kim, H., Marquis, H., & Boor, K.J. (2005) SigmaB contributes to *Listeria monocytogenes* invasion by controlling expression of *inlA* and *inlB*. *Microbiology* **151**: 3215-3222.
- Köhler, G., & Milstein, C. (1975) Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* **256**: 495-497.
- Köhler, S., Bubert, A., Vogel, M., & Goebel, W. (1991) Expression of the *iap* gene coding for protein p60 of *Listeria monocytogenes* is controlled on the posttranscriptional level. *J Bacteriol* **173**: 4668-4674.
- Kolb, A., Busby, S., Buc, H., Garges, S., & Adhya, S. (1993) Transcriptional regulation by cAMP and its receptor protein. *Annu Rev Biochem* **62**: 749-795.
- Körner, H., Sofia, H.J., & Zumft, W.G. (2003) Phylogeny of the bacterial superfamily of Crp-Fnr transcription regulators: exploiting the metabolic spectrum by controlling alternative gene programs. *FEMS Microbiol Rev* **27**: 559-592.
- Kreft, J., Vázquez-Boland, J.A., Ng, E., & Goebel, W. (1999) Virulence gene clusters and putative pathogenicity islands in *Listeria*. In *Pathogenicity islands and other mobile genetic elements*. Kaper, J. & Hacker, J. (eds). Washington D.C.: American Society for Microbiology, pp. 219-232.
- Kreft, J., & Vázquez-Boland, J.A. (2001) Regulation of virulence genes in *Listeria*. *Int J Med Microbiol* **291**: 145-157.
- Kreft, J., Vázquez-Boland, J.A., Altmann, S., Domínguez-Bernal, G., & Goebel, W. (2002) Pathogenicity islands and other virulence elements in *Listeria*. *Curr Top Microbiol Immunol* **264**: 109-125.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Lalic-Mülthaler, M., Bohne, J., & Goebel, W. (2001) *In vitro* transcription of PrfA-dependent and -independent genes of *Listeria monocytogenes*. *Mol Microbiol* **42**: 111-120.
- Lampidis, R., Gross, R., Sokolovic, Z., Goebel, W., & Kreft, J. (1994) The virulence regulator protein of *Listeria ivanovii* is highly homologous to PrfA from *Listeria monocytogenes* and both belong to the Crp-Fnr family of transcription regulators. *Mol Microbiol* **13**: 141-151.
- Landegren, U. (1984) Measurement of cell numbers by means of the endogenous enzyme hexosaminidase. Applications to detection of lymphokines and cell surface antigens. *J Immunol Methods* **67**: 379-388.
- 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.
- Lecuit, M., Dramsi, S., Gottardi, C., Fedor-Chaiken, M., Gumbiner, B., & Cossart, P. (1999) A single amino acid in E-cadherin responsible for host specificity towards the human pathogen *Listeria monocytogenes*. *Embo J* **18**: 3956-3963.
- Lecuit, M., Hurme, R., Pizarro-Cerda, J., Ohayon, H., Geiger, B., & Cossart, P. (2000) A role for alpha- and beta-catenins in bacterial uptake. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 10008-10013.
- Lecuit, M., Nelson, D.M., Smith, S.D., Khun, H., Huerre, M., Vacher-Lavenu, M.C., Gordon, J.I., & Cossart, P. (2004) Targeting and crossing of the human maternofetal barrier by *Listeria monocytogenes*: role of internalin interaction with trophoblast E-cadherin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 6152-6157.
- Leimeister-Wächter, M., Haffner, C., Domann, E., Goebel, W., & Chakraborty, T. (1990) Identification of a gene that positively regulates expression of listeriolysin, the major virulence factor of *Listeria monocytogenes*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**: 8336-8340.
- 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 *inlA* and *inlB* genes, whose products mediate bacterial

- entry into tissue culture cell lines, by PrfA-dependent and -independent mechanisms. *Infect Immun* **63**: 3896-3903.
- Lingnau, A., Chakraborty, T., Niebuhr, K., Domann, E., & Wehland, J. (1996) Identification and purification of novel internalin-related proteins in *Listeria monocytogenes* and *Listeria ivanovii*. *Infect Immun* **64**: 1002-1006.
- Lou, Y., & Yousef, A.E. (1997) Adaptation to sublethal environmental stresses protects *Listeria monocytogenes* against lethal preservation factors. *Appl Environ Microbiol* **63**: 1252-1255.
- Luo, Q., Rauch, M., Marr, A.K., Müller-Altrock, S., & Goebel, W. (2004) *In vitro* transcription of the *Listeria monocytogenes* virulence genes *inlC* and *mpl* reveals overlapping PrfA-dependent and -independent promoters that are differentially activated by GTP. *Mol Microbiol* **52**: 39-52.
- Luo, Q., Herler, M., Müller-Altrock, S., & Goebel, W. (2005) Supportive and inhibitory elements of a putative PrfA-dependent promoter in *Listeria monocytogenes*. *Mol Microbiol* **55**: 986-997.
- Mandin, P., Fsihi, H., Dussurget, O., Vergassola, M., Milohanic, E., Toledo-Arana, A., Lasa, I., Johansson, J., & Cossart, P. (2005) VirR, a response regulator critical for *Listeria monocytogenes* virulence. *Mol Microbiol* **57**: 1367-1380.
- Marino, M., Banerjee, M., Jonquières, R., Cossart, P., & Ghosh, P. (2002) GW domains of the *Listeria monocytogenes* invasion protein InlB are SH3-like and mediate binding to host ligands. *Embo J* **21**: 5623-5634.
- Marquis, H., Goldfine, H., & Portnoy, D.A. (1997) Proteolytic pathways of activation and degradation of a bacterial phospholipase C during intracellular infection by *Listeria monocytogenes*. *J Cell Biol* **137**: 1381-1392.
- Marr, A.K., Joseph, B., Mertins, S., Ecke, R., Müller-Altrock, S., & Goebel, W. (2006) Over-expression of PrfA leads to growth inhibition of *Listeria monocytogenes* in glucose-containing culture media by interfering with glucose uptake.
- Mauder, N., Ecke, R., Mertins, S., Löffler, D.I.M., Seidel, G., Sprehe, M., Hillen, W., Goebel, W., & Müller-Altrock, S. (2006) Species-specific differences in the activity of PrfA, the key regulator of listerial virulence genes. *J Bacteriol*.
- Mekalanos, J.J. (1992) Environmental signals controlling expression of virulence determinants in bacteria. *J Bacteriol* **174**: 1-7.
- Mengaud, J., Vicente, M.F., & Cossart, P. (1989) Transcriptional mapping and nucleotide sequence of the *Listeria monocytogenes hlyA* region reveal structural features that may be involved in regulation. *Infect Immun* **57**: 3695-3701.
- Mengaud, J., Dramsi, S., Gouin, E., Vázquez-Boland, J.A., Milon, G., & Cossart, P. (1991a) Pleiotropic control of *Listeria monocytogenes* virulence factors by a gene that is autoregulated. *Mol Microbiol* **5**: 2273-2283.
- Mengaud, J., Geoffroy, C., & Cossart, P. (1991b) 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.
- 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.
- Milenbachs Lukowiak, A., Mueller, K.J., Freitag, N.E., & Youngman, P. (2004) Deregulation of *Listeria monocytogenes* virulence gene expression by two distinct and semi-independent pathways. *Microbiology* **150**: 321-333.
- Moors, M.A., Levitt, B., Youngman, P., & Portnoy, D.A. (1999) Expression of listeriolysin O and ActA by intracellular and extracellular *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun* **67**: 131-139.
- Moszer, I., Glaser, P., & Danchin, A. (1995) SubtiList: a relational database for the *Bacillus subtilis* genome. *Microbiology* **141** (Pt 2): 261-268.
- Müller, S., Hain, T., Pashalidis, P., Lingnau, A., Domann, E., Chakraborty, T., & Wehland, J. (1998) Purification of the *inlB* gene product of *Listeria monocytogenes* and demonstration of its biological activity. *Infect Immun* **66**: 3128-3133.
- Myers, E.R., Dallmier, A.W., & Martin, S.E. (1993) Sodium chloride, potassium chloride, and virulence in *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol* **59**: 2082-2086.
- Nadon, C.A., Bowen, B.M., Wiedmann, M., & Boor, K.J. (2002) Sigma B contributes to PrfA-mediated virulence in *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun* **70**: 3948-3952.
- Nair, S., Milohanic, E., & Berche, P. (2000) ClpC ATPase is required for cell adhesion and invasion of *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun* **68**: 7061-7068.

- Niu, W., Zhou, Y., Dong, Q., Ebricht, Y.W., & Ebricht, R.H. (1994) Characterization of the activating region of *Escherichia coli* catabolite gene activator protein (CAP). I. Saturation and alanine-scanning mutagenesis. *J Mol Biol* **243**: 595-602.
- Niu, W., Kim, Y., Tau, G., Heyduk, T., & Ebricht, R.H. (1996) Transcription activation at class II CAP-dependent promoters: two interactions between CAP and RNA polymerase. *Cell* **87**: 1123-1134.
- Peel, M., Donachie, W., & Shaw, A. (1988) Temperature-dependent expression of flagella of *Listeria monocytogenes* studied by electron microscopy, SDS-PAGE and western blotting. *J Gen Microbiol* **134**: 2171-2178.
- Peters, J.H., & Baumgarten, H. (1992) *Monoclonal Antibodies*. Heidelberg: Springer Verlag.
- Portnoy, D.A., Jacks, P.S., & Hinrichs, D.J. (1988) Role of hemolysin for the intracellular growth of *Listeria monocytogenes*. *J Exp Med* **167**: 1459-1471.
- Portnoy, D.A., Chakraborty, T., Goebel, W., & Cossart, P. (1992) Molecular determinants of *Listeria monocytogenes* pathogenesis. *Infect Immun* **60**: 1263-1267.
- Premaratne, R.J., Lin, W.J., & Johnson, E.A. (1991) Development of an improved chemically defined minimal medium for *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol* **57**: 3046-3048.
- 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.
- Rauch, M., Luo, Q., Müller-Altrock, S., & Goebel, W. (2005) SigB-dependent in vitro transcription of *prfA* and some newly identified genes of *Listeria monocytogenes* whose expression is affected by PrfA in vivo. *J Bacteriol* **187**: 800-804.
- Redline, R.W., & Lu, C.Y. (1988) Specific defects in the anti-listerial immune response in discrete regions of the murine uterus and placenta account for susceptibility to infection. *J Immunol* **140**: 3947-3955.
- Reese, M.G. (2001) Application of a time-delay neural network to promoter annotation in the *Drosophila melanogaster* genome. *Comput Chem* **26**: 51-56.
- 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.
- Rhodijs, V.A., & Busby, S.J. (2000a) Transcription activation by the *Escherichia coli* cyclic AMP receptor protein: determinants within activating region 3. *J Mol Biol* **299**: 295-310.
- Rhodijs, V.A., & Busby, S.J. (2000b) Interactions between activating region 3 of the *Escherichia coli* cyclic AMP receptor protein and region 4 of the RNA polymerase sigma(70) subunit: application of suppression genetics. *J Mol Biol* **299**: 311-324.
- Ripio, M.T., Domínguez-Bernal, G., Suárez, M., Brehm, K., Berche, P., & Vázquez-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.
- Ripio, M.T., Brehm, K., Lara, M., Suárez, M., & Vázquez-Boland, J.A. (1997a) Glucose-1-phosphate utilization by *Listeria monocytogenes* is PrfA dependent and coordinately expressed with virulence factors. *J Bacteriol* **179**: 7174-7180.
- Ripio, M.T., Domínguez-Bernal, G., Lara, M., Suárez, M., & Vázquez-Boland, J.A. (1997b) A Gly145Ser substitution in the transcriptional activator PrfA causes constitutive overexpression of virulence factors in *Listeria monocytogenes*. *J Bacteriol* **179**: 1533-1540.
- Ripio, M.T., Vázquez-Boland, J.A., Vega, Y., Nair, S., & Berche, P. (1998) Evidence for expressional crosstalk between the central virulence regulator PrfA and the stress response mediator ClpC in *Listeria monocytogenes*. *FEMS Microbiol Lett* **158**: 45-50.
- Rocourt, J., & Seeliger, H.P. (1985) [Distribution of species of the genus *Listeria*]. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg [A]* **259**: 317-330.
- Rocourt, J., Hof, H., Schrettenbrunner, A., Malinverni, R., & Bille, J. (1986) [Acute purulent *Listeria seeligeri* meningitis in an immunocompetent adult]. *Schweiz Med Wochenschr* **116**: 248-251.
- Rocourt, J. (1996) [Taxonomy of the *Listeria* genus and typing of *L. monocytogenes*]. *Pathol Biol (Paris)* **44**: 749-756.
- Rouquette, C., & Berche, P. (1996) The pathogenesis of infection by *Listeria monocytogenes*. *Microbiologia* **12**: 245-258.
- Sabet, C., Lecuit, M., Cabanes, D., Cossart, P., & Bierne, H. (2005) LPXTG protein InlJ, a newly identified internalin involved in *Listeria monocytogenes* virulence. *Infect Immun* **73**: 6912-6922.
- Sawyer, R.T., Drevets, D.A., Campbell, P.A., & Potter, T.A. (1996) Internalin A can mediate phagocytosis of *Listeria monocytogenes* by mouse macrophage cell lines. *J Leukoc Biol* **60**: 603-610.
- Schlech, W.F., 3rd, Luo, Q., Faulkner, G., & Galsworthy, S. (1994) Interaction of *Listeria* species with human cell monolayers. *Clin Invest Med* **17**: 9-17.
- Schlech, W.F., 3rd (2000) Foodborne listeriosis. *Clin Infect Dis* **31**: 770-775.

- Schmid, M.W., Ng, E.Y., Lampidis, R., Emmerth, M., Walcher, M., Kreft, J., Goebel, W., Wagner, M., & Schleifer, K.H. (2005) Evolutionary history of the genus *Listeria* and its virulence genes. *Syst Appl Microbiol* **28**: 1-18.
- Schubert, W.D., Gobel, G., Diepholz, M., Darji, A., Kloer, D., Hain, T., Chakraborty, T., Wehland, J., Domann, E., & Heinz, D.W. (2001) Internalins from the human pathogen *Listeria monocytogenes* combine three distinct folds into a contiguous internalin domain. *J Mol Biol* **312**: 783-794.
- Schubert, W.D., Urbanke, C., Ziehm, T., Beier, V., Machner, M.P., Domann, E., Wehland, J., Chakraborty, T., & Heinz, D.W. (2002) Structure of internalin, a major invasion protein of *Listeria monocytogenes*, in complex with its human receptor E-cadherin. *Cell* **111**: 825-836.
- Schuchat, A., Swaminathan, B., & Broome, C.V. (1991) Epidemiology of human listeriosis. *Clin Microbiol Rev* **4**: 169-183.
- Schwab, U., Bowen, B., Nadon, C., Wiedmann, M., & Boor, K.J. (2005) The *Listeria monocytogenes* prfAP2 promoter is regulated by sigma B in a growth phase dependent manner. *FEMS Microbiol Lett* **245**: 329-336.
- Seeliger, H.P., & Jones, D., (eds) (1986) *Genus Listeria Pirie 1940 in Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Baltimore: The Williams & Wilkins Co.
- 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.
- Sheehan, B., Klarsfeld, A., Ebright, R., & Cossart, P. (1996) A single substitution in the putative helix-turn-helix motif of the pleiotropic activator PrfA attenuates *Listeria monocytogenes* virulence. *Mol Microbiol* **20**: 785-797.
- Shen, Y., Naujokas, M., Park, M., & Ireton, K. (2000) InIB-dependent internalization of *Listeria* is mediated by the Met receptor tyrosine kinase. *Cell* **103**: 501-510.
- Shetron-Rama, L.M., Mueller, K., Bravo, J.M., Bouwer, H.G., Way, S.S., & Freitag, N.E. (2003) Isolation of *Listeria monocytogenes* mutants with high-level *in vitro* expression of host cytosol-induced gene products. *Mol Microbiol* **48**: 1537-1551.
- Simpson, K.L., Wilson, A.W., Burton, E., Nakayama, T.O., & Chichester, C.O. (1963) Modified French Press for the Disruption of Microorganisms. *J Bacteriol* **86**: 1126-1127.
- Slaghuis, J., Götz, M., Engelbrecht, F., & Goebel, W. (2004) Inefficient replication of *Listeria innocua* in the cytosol of mammalian cells. *J Infect Dis* **189**: 393-401.
- Smith, G.A., Marquis, H., Jones, S., Johnston, N.C., Portnoy, D.A., & Goldfine, H. (1995) The two distinct phospholipases C of *Listeria monocytogenes* have overlapping roles in escape from a vacuole and cell-to-cell spread. *Infect Immun* **63**: 4231-4237.
- Sokolovic, Z., & Goebel, W. (1989) Synthesis of listeriolysin in *Listeria monocytogenes* under heat shock conditions. *Infect Immun* **57**: 295-298.
- Sokolovic, Z., Fuchs, A., & Goebel, W. (1990) Synthesis of species-specific stress proteins by virulent strains of *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun* **58**: 3582-3587.
- Sokolovic, Z., Riedel, J., Wünscher, M., & Goebel, W. (1993) Surface-associated, PrfA-regulated proteins of *Listeria monocytogenes* synthesized under stress conditions. *Mol Microbiol* **8**: 219-227.
- 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.
- Spiro, S., & Guest, J.R. (1990) FNR and its role in oxygen-regulated gene expression in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Rev* **6**: 399-428.
- Stritzker, J., Schoen, C., & Goebel, W. (2005) Enhanced synthesis of internalin A in *aro* mutants of *Listeria monocytogenes* indicates posttranscriptional control of the *inlAB* mRNA. *J Bacteriol* **187**: 2836-2845.
- Stryer, L. (1988) *Biochemistry*. New York: Freeman.
- Suárez, M., González-Zorn, B., Vega, Y., Chico-Calero, I., & Vázquez-Boland, J.A. (2001) A role for ActA in epithelial cell invasion by *Listeria monocytogenes*. *Cell Microbiol* **3**: 853-864.
- Takahashi, M., Blazy, B., Baudras, A., & Hillen, W. (1989) Ligand-modulated binding of a gene regulatory protein to DNA. Quantitative analysis of cyclic-AMP induced binding of CRP from *Escherichia coli* to non-specific and specific DNA targets. *J Mol Biol* **207**: 783-796.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., & Gibson, T.J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* **22**: 4673-4680.
- 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.
- Tong, W.M., Ellinger, A., Sheinin, Y., & Cross, H.S. (1998) Epidermal growth factor receptor expression in primary cultured human colorectal carcinoma cells. *Br J Cancer* **77**: 1792-1798.
- Tsai, Y.H., Orsi, R.H., Nightingale, K.K., & Wiedmann, M. (2006) *Listeria monocytogenes* internalins are highly diverse and evolved by recombination and positive selection. *Infect Genet Evol*.

- Vázquez-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.
- Vázquez-Boland, J.A., Domínguez-Bernal, G., González-Zorn, B., Kreft, J., & Goebel, W. (2001a) Pathogenicity islands and virulence evolution in *Listeria*. *Microbes Infect* **3**: 571-584.
- Vázquez-Boland, J.A., Kuhn, M., Berche, P., Chakraborty, T., Domínguez-Bernal, G., Goebel, W., González-Zorn, B., Wehland, J., & Kreft, J. (2001b) *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clin Microbiol Rev* **14**: 584-640.
- Vega, Y., Dickneite, C., Ripio, M.T., Böckmann, R., González-Zorn, B., Novella, S., Domínguez-Bernal, G., Goebel, W., & Vázquez-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.
- Vega, Y., Rauch, M., Banfield, M.J., Ermolaeva, S., Scortti, M., Goebel, W., & Vázquez-Boland, J.A. (2004) New *Listeria monocytogenes* *prfA** mutants, transcriptional properties of PrfA* proteins and structure-function of the virulence regulator PrfA. *Mol Microbiol* **52**: 1553-1565.
- Velge, P., Bottreau, E., Kaeffer, B., Yurdusev, N., Pardon, P., & Van Langendonck, N. (1994) Protein tyrosine kinase inhibitors block the entries of *Listeria monocytogenes* and *Listeria ivanovii* into epithelial cells. *Microb Pathog* **17**: 37-50.
- Vessey, C.J., Wilding, J., Folarin, N., Hirano, S., Takeichi, M., Soutter, P., Stamp, G.W., & Pignatelli, M. (1995) Altered expression and function of E-cadherin in cervical intraepithelial neoplasia and invasive squamous cell carcinoma. *J Pathol* **176**: 151-159.
- 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.
- Weber, I.T., & Steitz, T.A. (1987) Structure of a complex of catabolite gene activator protein and cyclic AMP refined at 2.5 Å resolution. *J Mol Biol* **198**: 311-326.
- Weis, J., & Seeliger, H.P. (1975) Incidence of *Listeria monocytogenes* in nature. *Appl Microbiol* **30**: 29-32.
- Winkler, C., Wittbrodt, J., Lammers, R., Ullrich, A., & Schartl, M. (1994) Ligand-dependent tumor induction in medakafish embryos by a Xmrk receptor tyrosine kinase transgene. *Oncogene* **9**: 1517-1525.
- Wong, K.K., & Freitag, N.E. (2004) A novel mutation within the central *Listeria monocytogenes* regulator PrfA that results in constitutive expression of virulence gene products. *J Bacteriol* **186**: 6265-6276.
- Wu, F.Y., Nath, K., & Wu, C.W. (1974) Conformational transitions of cyclic adenosine monophosphate receptor protein of *Escherichia coli*. A fluorescent probe study. *Biochemistry* **13**: 2567-2572.
- Zhang, X., & Schleif, R. (1996) Obligatory activator-polymerase addition order at promoters. *Nucleic Acids Res* **24**: 2575-2577.
- Zhou, Y., Zhang, X., & Ebright, R.H. (1993) Identification of the activating region of catabolite gene activator protein (CAP): isolation and characterization of mutants of CAP specifically defective in transcription activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 6081-6085.

G Anhang

G.1 Zusatzmaterial

G.1.1 Promotorsequenzen in pUC18

Im Folgenden sind die in den Vektor pUC18 klonierten Promotorsequenzen aufgelistet, welche für die "run off" *in vitro* Transkriptionen verwendet wurden. Die Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen. Protein kodierende Sequenzen sind in Großbuchstaben wiedergegeben. Spezielle Elemente PrfA-abhängiger Promotoren (PrfA-Box, -10-Box) sind schwarz und die von SigB-abhängigen Promotoren grau hinterlegt.

Promotor	Sequenz
<i>P_{inL}</i>	gaattctatatttactagttcttctcagaaaaatagttttatggtgtttagagatatattgttagctggttctttgggagtgacatgct tttaacaaaaatctcacaccattatgtgttattttgaacataaagggtagaggataacataagttaatctcttttttgaaaaat agtatttatatttaaatgggctttgaaaggggatgatataagaagtgaaaaagagagttttggcggtaagagtcggggcttg aatcgtcaataatagaccattttaaagggtggaatgacacgtgatacaacataaaatgatttgcattgattgaattcctattaag cttcgatagtgaaatcacataaaaaatattatataataggaaaaatgtgctggaacgaacgagatgaaggatcactaaacggctccgta gacagattagctactaaataccataggaacaattcgtggggagcataatttaataaaatgaacgacatgattttcggatgacaggag aggatcc
<i>P_{i-inL}</i>	gaattccattatttgtataaatatgtgtttattttagtgttaaagggttagaggtaacataagttacaattcttttttgaagtttatta tatttatatttaaatgaacattgagaggggggatgtggcattcgatgataattaagaaggcgtctttgaggatatattacggggttt tgattgaaaaaaatcaaaaaatcacaagagcgggtataattttatgcatagaattcgaaatggttattgactaattaacg agcattgggttaattcctatttagaagatataatagataatgctcaacataggcaacgaggatttatcgttatgactccgtaaaataa gtaactactgaattaatagaacaatattacggtaaacaccatagtatgtcagtcacaacgagcaaaacggttccgacagaagatattgag ctgctatattaggatcc
<i>P_{inL}</i>	ggtaacctacttcttatacttatttgagaaaaatgcaataaatagaaaaaagccttgtcaaacgaggcttttttatgcaaaaaat acgacgaatgaagccatgtgagacaatttggaaatagcagacaacaaggaaggtagaacatgtttgaaaaatctactgattttcgatt attatataacgcttggttaatttaaacatctcttatttttgcataacataaaggtatacaaaaggacataaaaaaggttaacagcgtttgtt aaataggaagtatagaaaaatcctcttttgggttctaaatatttttaaggagtggaagatTTGAAAAAAATAATTGGTTACAA ACTGCAG
<i>P_{i-inL}</i>	gaattcatggttaggcttaggcacctatatacgcgtgtaaacaatttgcctcgttaattggcgggggcttttttatgcaaaaaat ggcaagtggagccagtgaggcaacttggattagcaaacagcaagaaagagagaacatgtttgaaaaatctactgattttcgaaaaat tttaacgcttggttaataaagatcgcctgttttgcataacataaaggtatacaaaaggacataaaaaaggttaacagagtttgta aatataatgtatctgaaaaatctcttttgggttctaaatatttttaaggagtggaagataTTGAAAAAAATAATTGGTTACAAA ATCTAGA
<i>P_{i-inE}</i>	gaattcctatacacatttataatgtttatctaaaaagcggatcgttaacatttggttaattggtgagaatttatatttcaagtatgat gtgtatataagatgaggaaaaatggatgtgaaagaatttgaatgaagagaaaatttcagaaaaggtcccgatgaaaatttctcttttc taatttttttaaggagtgagatcaGTGAGAAAAAGTAATTGGATCC
<i>P_{i-inF}</i>	gaattcgagtaaaaaaatgaaagcaccgcatatttgggtattgtttttataattttaattttccatatttctccatcattttta atgaaataaagtcatttatttattttagttagtgggttttttttagagttcaataacattttgaaaagattatttacc tttcgagttggaagtagtcaaaatcaggtgaaatcaattaaatgaaagaaattgtattagataggatgaggttagcataacgagt tttaggttatttctccgcaaaacaagcgaaaaaaaataacttttggttatatacataattcctttcttttacagaatataaattg aaatgtgtaaaagatttggatatttagttagggtgacaaaatagtcattcgaaaatgtttttgggttctaaatattatgtaag ggagtgtaaatcgTTGAGGAAAAATGACTGGTTGAAAAATGTTTAATAACAATTTTAGGATCC
<i>P_{i-inI}</i>	gaattcccaccagctttataatgaacaaacttaagcataaaatgttagatataacttgatagcacacgtaggtattctatgctctcgc ttaatagcggggcttttttatcccaattaaaaacgaactattttttactattaaaaaaatcactaatcgcagcgaaaaataaca tttggttagtaagcgtctcttttatttgcataaaatcagagtatcaaaagagacatgaaaaggttaagctgaccaagtttctttgggt atttctaaatatttctaaaggagtgaaagcgaGTGAGAAAAATAATTGGTTACAAAATGTGGTAGTAGCAACGTTAGTATTAGTGT GGTTTGTGTATTAATACAGGATCC
<i>P_{i-inK}</i>	gaattctagataataaataaaaataagatttcagcaaaatataacttttggttatataaatagctgcatttttttagaataaaataca aattttagagcatgttaaagagttatggaagtggttaaaatcaaaaactattcatatgataattcctttggatgtttctaaatattg aaagaggagtgatatttcaTTGAGGAAAAAAGTTGGTTAAAGGATCC
<i>m-P_{pIcA_hly}</i>	AAGCTTTTCCGCCTAATGGGAAAGTAAAAAGTATAAAATAAAACAGAGTAATAAACTAATGTGCGTTGCAAAATAATTCTTATACAA aatggcccccctctttgattagatattcctattcttaagtgactttttatggtgaggcaataacatttggttaacgacgataaaagggac agcaggacagaataaagctataaagcaagcatataatattgcttttcatctttagaagcgaatttcgccaatattataattatcaaa agagaggggtggcaaacggtatttggcattattagggttaaaaaatgtagaaggagagtgaaaccATGAAAAAATAGAGCTC

Promotor	Sequenz
<i>i-PplcA_hly</i>	CTGCAGTTTCCGGCTGATGGAAAAGTAATAATGTAACAAACTAAACATAATAATACTACTAAAACCTGGCGTGAACGAAGCTTATAC ATtattatttcctcctttgatttgataagcct atctta taaaataatttcacatcgaatct ttaacatttgtaa agacgttaaagtt tactagatt tacaat aaaaccataaaacaaggatataaatattgcgtttcctaaatcttggaaagcgaatctcgtcaatattatattggaa ggagaggggtggaacatactacttggcattattaggttaaaaaatgtagaaggagagtgaaaccATGAAAAAAGAATTC
<i>s-PplcA_hly</i>	AAGCTTCCCGTGCATAGGAAAAATAATGGAGTAAACAGCTAGACATAATAGACAAGAAGAAGCTTGGCGTGAACGAAGCTTATACAT aattttcctccttcaatattgtatagtcct atctta gtcaacattaacatatttaagca ttaacatttgtaa tgacatcaaaagtt attaaagac tacaat aatgttgtaaacaggagctataaatattgcgtttcctaaatcttggaaagcgaatctcgtcaatattatattttga aatggggaggtggaagaaccagtttagtggagaatgaaaaagtgaaggggagagacaatgATGAAAAATATTGGTCTAGA
<i>m-PactA</i>	gaattctaaaaaagtgtgctgaagcttgggaagcagttggggtaactga taacaaatgttag gaaaaattaattctccaagtga ta ttct taaaaataattcatgaatatttttcttatattagctaattaagaagataactaactgctaataccaatttttaacggaacaaatt agtgaaaatgaaggccgaattttccttgttctaaaaaggttgattagcgtatctaga
<i>i-PactA</i>	gaattcggcggttagataagggatgtcctccaagtcaaa taacaaatgttaa gaaaagcggtttctccaatgc tattct tgaagca attcatgaattgttttctaaattagctaataaggagggttttaacaagagtcaaaaactctaaacagcctgaattgtatactgttctt acgcaggtattagagaatggcgaggaggagtaaaaaGGGATCC
<i>s-PactA</i>	tctagaaaaattgccgaagcatggctcgggtgtagtattttcttaaatctaaatacaaatgttcatg ataacaaatgttaa gaaaaat cacataatgaagtgt tattct gtaataaattcatgaatttggttaaaaaatgtaataaattatctaatatggaattcctagggaggtta tattttataaaacgcagtggttaataaataaataaagcttagaatgggactaagcgaagtcagtagattttaggatcc

G.1.2 ClustalW Alignments

Weißer Zeichen auf schwarzem Grund stehen für vollständige **Identität**, weiße Zeichen auf grauem Grund für einen möglichen **Konsensus**, schwarze Zeichen auf grauem Grund stehen für Aminosäuren mit **Ähnlichkeit** (jeweils bewertet nach der angewendeten Matrix) zu einem möglichen Konsensus und schwarze Zeichen auf weißem Grund stehen für keinerlei Ähnlichkeiten. Lücken ("Gaps") in der Sequenz werden durch "-" angezeigt.

Wenn es nicht anders angegeben ist, so gelten für die hier gezeigten ClustalW Alignments folgende Parameter (Thompson *et al.*, 1994):

```
gap opening penalty (protein/DNA)          10 / 15
(pairwise) gap extension penalty (protein/DNA) 0,1 / 6,66
(multiple) gap extension penalty (protein/DNA) 0,05 / 6,66
gap separation penalty range                8
%identity for delay                         40
hydrophilic residues                       GPSNQEKR
score matrix (protein/DNA)                 BLOSUM 62 / clustalvdamt
```

```

1                                     80
InlE (1) MKRNRKTAIRILVTLAVVLAITFVVGMS-KEVOAVLEHPTPLNEIFDTPVLTINVKLLGKADVTDEVTQTDLLSVTH
InlG (1) MKQRKTSVLHVLVVTAILGISLWVNASHCMKAQAESIAQAPARINEIFDTPALADEVKTLELCKTSVTDVETQTDLNQITK
InlH (1) MKKRWNSVFKLVLMVTAIILGLSLVVTTSQCVVRAESITOPTALNVIFDTPALANAIKTAACKSNVTDVETQADLLGITT

81                                     160
InlE (79) LSAKSAGITTTIEGHOYLLNLSLELELIDNQVTDLNPLTNLTKITBELRISGNPLKDVSAALAGLKNLKTMDLIYTDITDVTPL
InlG (81) LPAADDKGNLSIEGHOYLLNLSNMLGVSSNQITNTIPLANLTLNLDSELYLG-----DN-----DN-----
InlH (81) LSAFGTGVTTIEGHOYLLNLSLIGLELKDNOITDITPLKNTLTKITBELRISGNPLKNVSAALAGLQSIKTLDTLTSQITDVTPL

161                                     240
InlE (159) AGLSNLQVILNLDINQITDITPLAGLSNLQFLSFCSTQVSDLTPLANLSKLTTLNLMNSKVSQVSPITGLSNLTVYMLEEN
InlG (131) -----KISDVTPLSGLTQITFVQLSINQIKDVTPLANLTKLNYLDLRENQISDASPLVNMMDLTLVHLE--
InlH (161) AGLSNLQVLYLDINQITNLSPLAGLTLNQLSLICNAQVSDLTPLANLSKLTTLKDDNKISDISPLASLPLNLSIEVHLKNN

241                                     320
InlE (239) QISDVSPLAKLPNLSIVTLTNOITITNOPVRYQNKPIVNVVVTGLSCGLIAPDITISDNGTYISPNLTWDLNSFINSVSYTF
InlG (195) -----K-----QITTAAPVYQITNLVAPDILKNAYGEVVPETTISNNGTFASPNLTWNLDSFTSEVSYDF
InlH (241) QISDVSPLANTSILFIVTLTNOITITNOPVRYQNNLVVNVVVKGPSGAPITAPATISDNGTYASPNLTWNLTSFINVSYTF

321                                     400
InlE (319) NQSVTFKN-TTAPFSGVTIQTPLTEV---YAVVFDVDGEGTSAVGVNELINEPTAPAKEGYIFDQWYDAKTDGNKWDFFGI
InlG (255) NQKITLGDNGKVTFACTVVOPIVEAPVNIITTFDVDGTTITENVVDTLITTEPAETKEGYTFSGWYDABTCGNEWDFAV
InlH (321) NQSVTFKN-TTVFSGVTIQTPLTEA---YTAVFDVDGKQTSVTVGANELIKEPTAPTKEGYTFSGWYDAKTDGKTWDFAT

401                                     480
InlE (395) DKMPASDITLYAKFTEN-----EEDNASSPINVEPNDNNSDNAEPNASSNNVQENGTN
InlG (335) DKMPATNMTLYAOFITINSYTATFDVDGETITNQKVDYQALLQEPITAPTKDGYTFVGVWYDAKTDGTEWDFATSKMPTSDITL
InlH (397) DKMPAEDITLYAOFITINSYTATFDIDGKLTITQKVITYQSLLLEEVVAPTKDGYTFVGVWYDAKTDGTEWDFATGKMPAGNITL

481                                     556
InlE (449) EGIINLNS-----GEDKVNLIKLPITGDKLNVLPFVGAFLIGLGLVLFKRRKQTK
InlG (415) YARFTKNPSSDNSQTAPGKDDKIDKDKLTIKANDSADATSKLPKISDSSMIPITILGTLFIGGALLIIRKKTNTNI
InlH (477) YAEFTKNDNPNPDDPTTNTPTGNGDGTG---NPSNSGNTTLPITAGDENTMLPFIGVFLIGTATLIRKTIKVK

InlE vs. InlG: 46,3% Ähnlichkeit, 36,3% Identität
InlE vs. InlH: 64,1% Ähnlichkeit, 56,8% Identität
InlG vs. InlH: 56,5% Ähnlichkeit, 47,8% Identität
```

Abbildung 45. ClustalW Analyse der Aminosäuresequenzen von InlE, InlG und InlH von *L. monocytogenes* EGDe. Die drei Proteine zeigen zusammen 83,5% Ähnlichkeit (bei Verwendung der Matrix BLOSUM 62) und 29,5% Identität. Paarweise Ähnlichkeiten und Identitäten sind unter dem Alignment angegeben.

```

1                               80
InlB-322 MKKRNPRRKYCLISGLATIFSLWIIIGNGAKVQAEITITVPTPIKQIFSDDAFAETIKDNLKPKKSVTDAVTQNELNSIDQ
InlC      --MKKRNWLQNAVITAMLVLIVGLCTINMGSGIKVQAEISTQRPPTPINQVFPDPGLANAVKQNLCKQSVTDLVSQKELSGVQN

81                               160
InlB-322 IIANNSDTRKSVQGTQYLPNVTKLFTINGNKLTDIKPLANLKNLGLWFLDENKVKDLSLKKDLKPKLKSLSLEHNGISDINGL
InlC      FNGDINSNIQSLAGMQFFTNLKEHLHSHN-----QISDLSPLKDLTKLEELSVNRNRLKNLNG-

161                               240
InlB-322 VHLPQLESIMLGNNKITDITVLSRITKLDLTSLEDNQISDITVPLAGLTKLQNLVLSKNHISDLRAIAGLKNLDVLELIFSQ
InlC      IPSACLRSLELDNNELRDTSLIHLEKNEILSIRNNKLSIVMLGFLSKLEVLDLHGNEITNTGGITRLKKNWIDLTIGQ

241                               322
InlB-322 ECLNKPINHQSNLVVPTNTVKNKTDGSLVTPEIISDDGDYKPNVKHLEPEFTNEVSEIFYQPVTTGKAKARLHGRVTOPLKEV
InlC      KCVNEPVKYOPELYITNTVKDPDGRWISPYIISNGCSYVDGCVLWELPVVYDEVSXKFESEYINVGETEALHFGTIVTOPIKN-

```

Abbildung 46. ClustalW Analyse der Aminosäuresequenzen von InlC und den N-terminalen 322 Aminosäuren von InlB von *L. monocytogenes* EGDe. Die beiden Sequenzen zeigen zueinander 50,9% Ähnlichkeit (bei Verwendung der Matrix BLOSUM 62) und 37,3% Identität.

```

1                               80
InlA      (1) MRKKRIVVWLKISILVAILLVFGSIVWINTSNGTNAQAATITQDTPINQIFFTDTPALAEKMKTVLGRITNVITDTSVQTDLDQVIT
i-InlA    (1) MRKEQIVVWLRISILLAILLVGVCGLYVAITSNGTNVEAATISNPTPINQIFFTDTPALAEVVKTDLGRATVSDTIVTQTDLDGITS

81                               160
InlA      (81) IQADRLEGIKSIDGVEYLNNTQINFSNNQLTDITPLKLNLTKLVDILMNNNQIADITPLANLNTLGLTLFNNOITDIDPL
i-InlA    (81) IEADRKGIKSIDGVEYLNNTQIDFSYNOITDITPLANLTKLTSLVMMNNQIADITPLQNLTSLETLTLFYNKITDVAPL

161                               240
InlA      (161) KNLTNINRLELSSNITSDISALSGLTSLIQQLSFGNOVTDLKPPLANLTLLERLDISSNKVSDISVLAKLTNLESIIATNNO
i-InlA    (161) ANLTNINLAIITDNEISDVTPIGNLITNLEGLSICNKVTDIKPLANLTKLERLNLSRNKITDISPVAKLILNLOSLSLDNNQ

241                               320
InlA      (241) ISDITPLGILTNLDELISLNGNQLKDIGTFLASLTNLTDIDLANNOISNLAPISLTKLTLTKLGANQISNISPLAGLTAIT
i-InlA    (241) FSDITPLGILTNLTELSLYSNHISDIGTFLASLTNLKKNLMDNOISNLAPISNLTNLTDLNLSSTNOISDLKPISNLNTLT

321                               400
InlA      (321) NIELENNOLEDISPISNLKNTLYLTLYFNNSIDISPVSSLTKLQRLFFYNKVSVDVSLANLTNINWLSAGHNQISDLTTP
i-InlA    (321) VIQVPTNOLEDISPISLIPNLEFFLTLYTNOISDLSPLLENLTKLKQLFFYDNKVSVDVSPILANLTSLOELSGAGNNOISDLTTP

401                               480
InlA      (401) LANLTRLITQLGLNDQAWINA PVNYKANVSIPTVKNVTGALINPATISDGGSYTEPDITWNLPYSYTNVEVSYTFQSPVTIG
i-InlA    (401) LAKLTRLITQLGLDKQKVHSQPVKYQSNLVVPAVKNVTGALINPATISDNGTYTNPDITWNLPYSYTNVEVSYTFNQSVTIG

481                               560
InlA      (481) KGTITPFSGTVTOPLKALFNVKHVDGKETTKEVEAGNLLTEPAKPVKEGHTFVGVFDAQTGGTKWNESTDKMPTNDINLY
i-InlA    (481) RGTATPFSGTVTOPLKALFNVKHVNQNETATEVESGNLLTEPKVPIKTCYTFVGVFDAQTGGTKWDFMINKMPTNDLDLY

561                               640
InlA      (561) AOFSLINSYATFDNDGVITTSQTVDYQGLLOEPTAPTKEGYTFKGWYDAKTGGDKWDFATSKMPAKNITLYAQVANSYTA
i-InlA    (561) AOFSLINDYATLNEGKISTQTVKYQGLLOEPTPTPTKEGYTFKGWYDAKTGGDKWDFATSKMPAKDITLYAQVANSYTV

641                               720
InlA      (641) IIFDVDGKSTTQAVDYQGLLKEPKAPTQAGYTFKQWYDEKTDGKQWDFATDKMPANDITLYAQFTKNPVAPPITGGNTPTPT
i-InlA    (641) IIFDVDGKQTKQKADYQSLVKEPKVPTQAGYTFKQWYDAEKGNKQWDFASDKMPANDITLYAQFTKDPVITPPNQ-----

721                               800
InlA      (721) TNNGGNTTPPSANIPGSDTSNTSTGNS-ASTTSTMNA YDPYNSK----E-ASLPTTGSDSNALYLLGLLAVGTAMALTK
i-InlA    (714) PNNGGSGSTPSGTLPGNNTSNTQMGNSQSATGDNMSEYDPYNA YNYQGGTCLPTTGSDSNALYLLGLLAVGTAFATTK

801
InlA      (795) KARASK
i-InlA    (794) KVRTK-

```

Abbildung 47. ClustalW Analyse der Aminosäuresequenzen von InlA aus *L. monocytogenes* EGDe und i-InlA (IPF 930.1) aus *L. ivanovii* ATCC 19119. Die beiden Sequenzen zeigen zueinander 76,7% Ähnlichkeit (bei Verwendung der Matrix BLOSUM 62) und 68,0% Identität.

```

1                               80
mono (1) CAAATAGGCCCCCTCCTTTGATTAGTATATTCCTATCTTA-AAAGTGACTTTTATGTTGAGGCCATTAAACATTTGTTAACGA
ivan (1) CAAATATTAATTTCCCTCCTTTGATTGTATAAGCCTATCTTA-TAAATAAATTCACATTCGAATCTTTAAACATTTGTTAAAGA
seel (1) CAAATATTTCCCTCCTTCAATAATGTATAGTCTTATTTTAGTCAACATTAACATATTTAAGCATTAAACATTTGTTAATGA

81                               160
mono (80) CGATAAAGGGACAGCAGGACTAGCAATAAAGCTATAAAGCAAGCATATAATATTGCGTTTC--ATCTTTAAGAGCGAATTT
ivan (80) CGTTAAAGCTTT-CTAGATTACAATAAAACCAATAAACAAAGGATATAATATTGCGTTTCATAATCTTTGGAAGCGAATCT
seel (81) CAAATAAAGCTTATTAAGACTACAATAATCTTTGTAAACAAGGAGCTATAATATTGCGTTTC-AAGCTAATGAATCGAATTT

161                               240
mono (158) CGCCAATATTATAATTAACAAAAGAGAGGGGTGGCAAAACGGTATTTGGCATTATTAGGTTAAAAAATGTAAGAAGGAGAGT
ivan (159) CGTCAATATTATAATTGG---AAGAGAGGGGTGGCAACATACTACTTGGCATTATTAGGTTAAAAAATGTAAGAAGGAGAGT
seel (160) CGCCAATATTATAATTTTCAAAATGGGAGGGTGAAGAACAGTTTACTGGAAGAATG-----AAAAGTGAAGGGGAGC

241                               mono vs. ivan: 75,5% Identität
mono (238) GAAACCCATG
ivan (236) GAAACCCATG
seel (235) GAAACATGATG                               ivan vs. seel: 62,9% Identität

```

Abbildung 48. ClustalW Analyse der Basensequenzen von *plcA* und *hly* Promotoren von *L. monocytogenes* (mono), *L. ivanovii* (ivan) und *L. seeligeri* (seel). Die drei Sequenzen zeigen zueinander 92,8% Ähnlichkeit (bei Verwendung der Matrix clustalvdmnt) und 52,0% Identität. Paarweise Identitäten sind unter dem Alignment angegeben.

```

1                               80
mono (1) AACACGCAACCGAAGAGATTTATAAGGTGAAGATCTTTCTAAAAAAGTTGCTGAAGCTTGGGAAGCAGTTGGGTTTACTGA
ivan (1) AACAGCCCGCGACAGACTTATACAGCCGAAGACTGGCTAAAAAAGTAGGAGAAGCATGGGAACAGTTGGCCTTAGATAA
seel (1) --CAATCTCGGAAGAGACTATATGGTGAAGAACTTGCAGAGAAAATTGCAGAACATGCCTCCGCTGTAGGTATTTCTTAA

81                               160
mono (81) -----TTAACAAATGTTAGAGAAAAATTAATTTCTCCAAGTGAATATTCTTAAATAATTCATGA
ivan (81) GGGATGTCTCTCAG--TCAAAATAACAAATGTTAAAGAAAAAGCGGTTTCTCCCAATGCTATTCTTGAAGCAATTCATGA
seel (79) ATCTAAATAACAATATGTCATGATAACAAATGTTAAAGAAAAATCACAATAATTAAGTGTATTCTGTAAATAATTCATGA

161                               240
mono (139) ATATTTT-----TCTTATATTAGCTAATTAAGAACAATACTAATCTAATCCAAATTTTAAACGGA--ACAATTAAG
ivan (159) AT-TGTTT-----TCTTAAATTAGCTAATAGGAGC-----TTTTAAACAAGA--GTCAAAAAC
seel (159) ATTTGTTAAAAAATGTAATAAATTAATCTAATATCGAATTCCTAGGGAGCTTATATTTTATAAAACCGCATGGTTAATAAA

241                               321
mono (210) TGA-AAAAGAAGCC-GAATTTTCCCT-TGTTCTAAAAAGGTTG-TATTAGCGT---ATCACGAGGAGG-GAGTATAAGTG
ivan (209) TCT-AAAAC--AGCCT-GAATTGTATACGTTCCTACGCAG--G-TATTAGAGA---ATGGCAGGAGGAGCTAAAAAAGTG
seel (239) TATTAAATTAAGCTTAGAATGCGACTAAGCGAAAGTCAAGTATGATTTTATAGGCGCCTGATTTCTATTAAC-TAAAATAAGTG

mono vs. ivan: 61,1% Identität
mono vs. seel: 55,0% Identität
ivan vs. seel: 49,7% Identität

```

Abbildung 49. ClustalW Analyse der *actA* Promotorsequenzen von *L. monocytogenes* (mono), *L. ivanovii* (ivan) und *L. seeligeri* (seel). Die drei Sequenzen zeigen zueinander 76,7% Ähnlichkeit (bei Verwendung der Matrix swgapdnmt) und 43,3% Identität. Paarweise Identitäten sind unter dem Alignment angegeben.

G.2 Akronyme

G.2.1 Gebräuchliche Abkürzungen

°C	Grad Celsius
(d)ATP	(Desoxy)Adenosintriphosphat
(d)CTP	(Desoxy)Cytosintriphosphat
(d)GTP	(Desoxy)Guanosintriphosphat
(d)NTP	(Desoxy)Nukleosidtriphosphat
(d)TTP	(Desoxy)Thymidintriphosphat

(d)UTP	(Desoxy)Uridintriphosphat
A	Adenin
Amp	Ampicillin
AS	Aminosäurerest
BHI	brain heart infusion
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
C	Cytidin
cDNA	komplementäre DNA
Ci	Curie
cpm	(gezählte Zerfalls-)Ereignisse pro Minute (counts per minute)
C-Terminus	Carboxyterminus
Da	Dalton
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (deoxyribonucleic acid)
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtOH	Ethanol
G	Guanin
g	Gramm oder Erdbeschleunigung (etwa 9,81 m/s ²)
h	Stunden
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
kb	Kilobasen
l	Liter
LB	Luria-Bertani
LRR	leucinreicher Repeat
M	molar
min	Minute(n)
mRNA	Messenger-RNA
MW	Molekulargewicht (molecular weight)
n	Nukleotide (bei Längenangaben von <i>einzelsträngiger</i> DNA oder RNA)
N	beliebiges Nukleotid (A, C, G, T oder U)
N-Terminus	Aminoterninus
OD _λ	Optische Dichte bei Wellenlänge λ; gleichbedeutend mit Extinktion
ODml	Produkt der optischen Dichte (OD ₆₀₀) einer Bakterienkultur mit deren Volumen und damit ein Maß für die Menge der Bakterien
ORF	offenes Leseraster (open reading frame)
PBS	phosphatgepufferte Saline (phosphate buffered saline)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
p.d.	<i>per definitionem</i>
pI	isoelektrischer Punkt
rcf	relative Zentrifugalkraft (entspricht ×g) (relative centrifugal force) $\mathbf{rcf} = \mathbf{rpm}^2 \times 1,118 \times 10^{-5} \times r \times \mathbf{cm}^{-1}$
RBS	Ribosomenbindungsstelle (ribosomal binding site)
RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
rpm	Umdrehungen pro Minute (rotations per minute) $\mathbf{rpm} = [(\mathbf{rcf} \times 10^5 \mathbf{cm}) / (r \times 1,118)]^{1/2}$
RT	Raumtemperatur (ca. 20 bis 25 °C)
X _{xx} ^R	AntibiotikumResistenz
s	Sekunden
spp.	Spezies (Plural)

T	Thymin
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin
u	Einheit (unit)
U	Uracil
v/v	Volumenanteil
w/v	Gewichtsanteil im Volumen (1% entspricht 10 Gramm pro Liter)
WT	Wildtyp

G.2.2 Dezimale Größenangaben

Bezeichnung	Symbol	Faktor	
Femto-	f	10^{-15}	Billiardstel
Pico-	p	10^{-12}	Billionstel
Nano-	n	10^{-9}	Milliardstel
Mikro-	μ	10^{-6}	Millionstel
Milli-	m	10^{-3}	Tausendstel
Zenti-	c	10^{-2}	Hundertstel
Dezi-	d	10^{-1}	Zehntel
Hekto-	h	10^2	Hundert
Kilo-	k	10^3	Tausend
Mega-	M	10^6	Million
Giga-	G	10^9	Milliarde
Tera-	T	10^{12}	Billion
Peta-	P	10^{15}	Billiarde

G.3 Lebenslauf

1975.02.21	geboren in Dettelbach (Landkreis Kitzingen) Staatsangehörigkeit: deutsch
1994	Erwerb der Allgemeinen Hochschulreife mit Note 1,9 (gut)
1995.03 – 1996.03	Zivildienst beim "Mobilen Sozialen Hilfsdienst der Arbeiterwohlfahrt" in Marktbreit
1996. – 2001.06	Biologie -Studium an der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg Diplomarbeit am Lehrstuhl für Mikrobiologie (im Theodor-Boveri-Institut) bei Prof. Dr. Albert Haas Titel der Diplomarbeit: Interaktion von <i>Rhodococcus equi</i> mit J774E Mausemakrophagen und Charakterisierung immunglobulin-bindender Aktivitäten bei Rhodokokken.
2001.06	Akademischer Grad: Diplom-Biologe (univ.)
2001.10 – 2004.09	Promotion an der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg im Lehrstuhl für Mikrobiologie (im Theodor-Boveri-Institut) bei Prof. Dr. Werner Goebel Titel der Dissertation: Vergleichende Untersuchung der Internaline und PrfA-abhängigen Transkription in <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>L. ivanovii</i> und <i>L. seeligeri</i>

- 2004.11 – 2005.10 **PostDoc**-Stipendium vom und Teilnahme am European Graduate College 587/2 "Gene Regulation in and by Microbial Pathogens"
- 2004.11 – 2006.08 Wissenschaftliche Arbeiten (Untersuchung listerieller PrfA-abhängiger Promotoren und PrfA Proteine) im Lehrstuhl für Mikrobiologie bei Prof. Dr. Werner Goebel

G.4 Publikationen

- Mauder, N., Lührmann, A., Sydor, T., Fernandez-Mora, E., Schulze-Lührmann, J., Takai, S., & Haas, A. (2004) Necrotic death of *Rhodococcus equi*-infected macrophages is regulated by virulence-associated plasmids. *Infect Immun* 72: 853-862.
- Mauder, N., Ecke R., Mertins, S., Löffler, D.I.M., Seidel, G., Sprehe, M., Hillen, W., Goebel, W., & Müller-Altrock, S. (2006) Species-specific differences in the activity of PrfA, the key regulator of listerial virulence genes. *J Bacteriol* 188: 7941-7956.

G.5 Posterpräsentationen

- N. Mauder, B. Bergmann, R. Lampidis und W. Goebel (2003). Structure and Function of Small Internalins.
Begutachtung des SFB 479: Erregervariabilität & Wirtsreaktion Teilprojekt B1 (24. Juni).
- N. Mauder und W. Goebel (2005). Comparative studies of PrfA-dependent transcription in *Listeria monocytogenes* and *L. ivanovii*.
Begutachtung des European Graduate College 587/2 "Gene Regulation in and by Microbial Pathogens" (März)
- N. Mauder und W. Goebel (2005). Comparative studies of PrfA-dependent transcription in *Listeria monocytogenes*, *L. ivanovii* and *L. seeligeri*.
Gemeinsames Treffen der "EuroPathoGenomics Graduate Academy" NoE "EuroPathoGenomics" und des European Graduate College 587 Würzburg - Umeå