

---

**BAYERISCHE JULIUS-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT WÜRZBURG**  
**FAKULTÄT FÜR BIOLOGIE**  
**LEHRSTUHL FÜR MIKROBIOLOGIE**

---

**Einfluss der Phosphoenolpyruvat-  
Phosphotransferasesysteme auf die Aktivität des  
Virulenzgenregulators PrfA von *Listeria monocytogenes***



**DISSERTATION**

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

vorgelegt von  
**Regina Stoll**  
aus Hoyerswerda

Würzburg, September 2008

## Dankeschön

Zuerst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Werner Goebel für die Betreuung dieser Arbeit, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und der vielen konstruktiven Kritik aber auch Aufmunterung während der Entstehung dieser Arbeit bedanken. Mein Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. Roland Benz für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Bedanken möchte ich mich ganz besonders bei meinem Ehemann Sascha Stoll für die liebevolle Unterstützung, unsere vielen konstruktiven wissenschaftlichen Freizeitgespräche und das Verständnis für meine Arbeit. Zudem für die Aufmunterung in Momenten der Forscher- und Schreibfrustration und das sehr kritische Korrekturlesen dieser Arbeit.

Weiter möchte ich mich bei den Mitarbeitern des Lehrstuhls bedanken, 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 Norman Mauder (für die ertragreiche Zusammenarbeit), Karin Schmitt, Frederike Fritsch und Kristina Keidel (für die vielen wissenschaftlichen und vor allem Frauengespräche und auch das schnelle Korrekturlesen), Jenni Schär und Steffi Müller (für die erholsamen Balkongespräche), Dr. Stefanie Müller-Altrock und Sonja Mertins erwähnen. Biju Joseph danke ich für die Hilfe bei der Erstellung der PTS-Microarrays.

Nicht zuletzt möchte ich meinen Eltern für ihre uneingeschränkte Unterstützung danken, ohne die mein Studium in Würzburg und diese Dissertation nicht möglich gewesen wären.

# Inhaltsverzeichnis

A	Zusammenfassung/Summary .....	9
A.1	Zusammenfassung .....	9
A.2	Summary.....	11
B	Einleitung.....	15
B.1	Die Gattung <i>Listeria</i> .....	15
B.1.1	Listeriose .....	16
B.1.2	Infektionsverlauf .....	17
B.1.2.1	Adhäsion und Invasion .....	18
B.1.2.2	Überleben im und Entkommen aus dem Phagosom .....	20
B.1.2.3	Vermehrung und Verbreitung im Zytoplasma .....	22
B.1.2.4	Zell-zu-Zell-Ausbreitung .....	24
B.1.3	Genetische Organisation der Virulenzfaktoren von <i>L. monocytogenes</i> .....	25
B.2	Der zentrale Virulenzgenregulator PrfA.....	26
B.2.1	Crp.....	26
B.2.2	PrfA.....	27
B.2.2.1	<i>prfA</i> - Mutationen.....	28
B.2.3	PrfA-abhängige Promotoren .....	28
B.2.4	Regulation der PrfA-Aktivität.....	29
B.3	Metabolismus .....	31
B.3.1	Das Phosphoenolpyruvat-Phosphotransferase-System (PEP-PTS).....	31
B.3.2	Zusammenhang zwischen den PTS und der Kohlenstoff-Katabolitrepression (CCR).....	34
B.3.2.1	CCR in Gram-negativen Bakterien .....	35
B.3.2.2	CCR in Gram-positiven Bakterien.....	36
B.3.2.3	PTS regulierende Domänen (PRDs) .....	38
B.3.3	Listerielle Phosphotransferase-Systeme.....	40
B.4	Zielsetzung .....	44
C	Material und Methoden.....	45
C.1	Bakterienmedien und Antibiotika.....	45
C.1.1	Bakterienmedien .....	45
C.1.1.1	BHI-Medium (brain heart infusion).....	45
C.1.1.2	LB-Medium (Luria-Bertani) .....	45
C.1.1.3	Minimalmedium für Listerien.....	45
C.1.1.4	Einfriermedium für Bakterien.....	46
C.1.2	Antibiotika, Stammlösungen.....	46
C.2	Verwendete Bakterienstämme .....	46
C.3	Verwendete Plasmide .....	47
C.4	Verwendete Zelllinie .....	48
C.5	Oligonukleotide .....	48
C.5.1	für EMSA .....	48

C.5.2	für Klonierung und Überprüfung pERL3-Stämme.....	49
C.5.3	für Klonierung in pLSV101 .....	49
C.5.4	für Überprüfung und Sequenzierung der Deletion .....	50
C.5.5	für Klonierung und Sequenzierung in pQE30 und pQE60.....	51
C.5.6	für Real-Time-PCR .....	51
C.6	Verwendete Proteine.....	52
C.7	Allgemeine Puffer und Reagenzien .....	53
C.7.1.1	PBS (phosphate buffered saline).....	53
C.7.1.2	TBE (Tris Borsäure EDTA).....	53
C.8	Klonierungsmethoden.....	53
C.8.1	PCR-Mix (100 µl Ansatz) .....	53
C.8.2	Gelladepuffer (für DNA Agarosegele), 6×.....	53
C.8.3	Anwendung von Ethidiumbromid .....	53
C.8.4	Isolierung chromosomaler DNA (aus Listerien) .....	54
C.8.4.1	Material .....	54
C.8.4.2	Durchführung .....	54
C.8.5	Herstellung kompetenter Bakterien.....	54
C.8.5.1	chemisch kompetente <i>Escherichia coli</i> .....	54
C.8.5.2	elektrokompetente Listerien.....	55
C.8.6	Restriktionsverdau.....	55
C.8.7	Ligation .....	55
C.8.8	Transformation .....	55
C.8.8.1	Transformation in chemisch kompetente <i>E. coli</i> .....	55
C.8.8.2	Elektroporation in elektrokompetente Listerien.....	56
C.8.9	DNA-Reinigung mit Phenol/Chloroform .....	56
C.8.10	DNA-Präzipitation .....	56
C.8.11	DNA/RNA-Messung.....	56
C.8.12	Mutagenese durch homologe Rekombination.....	56
C.8.12.1	Durchführung .....	57
C.9	DNA Sequenzierung.....	58
C.9.1	Automatische Sequenzierung .....	58
C.9.2	Sequenzierung bei SeqLab .....	59
C.10	Arbeiten mit Bakterien .....	59
C.10.1	Untersuchung des Wachstumsverhaltens von <i>Listeria monocytogenes</i> .....	59
C.10.2	Anzucht von Listerien in XAD4-haltigem Medium .....	59
C.10.3	Medien-Shift Experimente .....	59
C.10.4	Messung <sup>14</sup> C-Glucoseaufnahme in <i>L. monocytogenes</i> .....	59
C.11	Präparation von listeriellen Proteinen.....	60
C.11.1	Zytosolische Proteine .....	60
C.11.2	Überstandsproteine.....	60
C.12	Photometrischer Hämolyseassay .....	60

C.12.1.1	Vorbereitung der Erythrozytensuspension.....	60
C.12.1.2	Durchführung des Assays .....	61
C.13	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	61
C.14	Gelfärbung.....	62
C.14.1	Coomassie Färbung.....	62
C.14.1.1	Färben in Coomassie Färbelösung .....	62
C.14.2	Silbernitratfärbung von Polyacrylamidgelen .....	62
C.15	Western Blot.....	63
C.15.1	Blotting .....	63
C.15.1.1	Material.....	63
C.15.1.2	Durchführung.....	63
C.15.2	Dekoration und ECL .....	64
C.15.2.1	Material.....	64
C.15.2.2	Durchführung.....	64
C.15.3	Stripping.....	64
C.15.3.1	Material.....	64
C.15.3.2	Durchführung.....	64
C.16	Zellkultur .....	65
C.16.1	Zellkulturmedien, und -puffer.....	65
C.16.1.1	Medium für J774A.1 .....	65
C.16.2	Kultivierung der Zellen.....	65
C.16.2.1	Einfrieren und Auftauen .....	65
C.16.2.2	Subkultivierung von Monolayerkulturen/eukaryotischen Zellen.....	65
C.16.3	Herstellung von Infektionsaliquots .....	65
C.16.4	Infektion mit <i>Listeria monocytogenes</i> .....	65
C.16.4.1	Aussäen der Zellen.....	66
C.16.4.2	Infektion der eukaryotischen Zellen .....	66
C.17	RNA Methoden .....	66
C.17.1	DEPC-Behandlung.....	66
C.17.2	RNA-Isolierung aus in BHI gewachsenen Listerien .....	66
C.17.3	RNA-Isolierung aus in Minimalmedium gewachsenen Listerien .....	67
C.17.4	DNase-Behandlung mit DNA- <i>free</i> <sup>TM</sup> Kit von Ambion.....	67
C.17.5	Reverse Transkription von RNA für die Real-time RT-PCR.....	67
C.17.5.1	Reverse Transkription mit der SuperScript <sup>TM</sup> II (Invitrogen).....	67
C.17.6	Quantitative Real-Time-PCR (RT-PCR) .....	68
C.18	Microarray-Assay .....	69
C.18.1	Herstellung der Sonden.....	69
C.18.2	Hybridisierung .....	70
C.18.2.1	Waschen und Blocken des Microarray-Slides .....	70
C.18.2.2	Waschen des Microarray-Slides.....	70
C.18.3	Scannen und Auswertung.....	71

C.19	Proteinreinigung mittels His-Tag und Ni-NTA-Agarose .....	71
C.19.1	Liste der isolierten His <sub>6</sub> -markierten Proteine .....	71
C.19.2	Klonierung .....	71
C.19.3	Aufreinigung .....	71
C.19.3.1	Material .....	71
C.19.3.2	Durchführung .....	72
C.19.4	ÄKTAprime .....	72
C.19.5	Photometrische Proteinkonzentrationsbestimmung .....	73
C.19.5.1	Größen .....	73
C.19.5.2	Formeln .....	73
C.19.5.3	Abschätzung des Extinktionskoeffizienten von Proteinen in wässriger Lösung.....	73
C.19.5.4	Internettool zur Berechnung vieler Proteinparameter .....	73
C.20	Protein-Protein-Bindungsstudien .....	73
C.20.1	Immunpräzipitation .....	73
C.21	Protein-DNA-Bindungsstudien .....	73
C.21.1	Herstellung der DNA-Sonde .....	73
C.21.2	Radioaktive Markierung der DNA-Sonde.....	74
C.21.3	Gelretardationsexperimente (EMSA).....	74
C.21.3.1	5 x HEPES-Bindepuffer (HBP) .....	74
C.21.3.2	Mastermix für EMSA .....	74
C.21.3.3	RNA-Polymerase Mix .....	74
C.21.3.4	Natives Polyacrylamidgel für EMSA .....	75
C.21.3.5	Durchführung .....	75
C.22	"run off" in vitro Transkription .....	75
C.22.1	6% Polyacrylamid-/ 8M Harnstoffgel .....	76
C.22.2	Reagenzien .....	76
C.22.2.1	Nukleotide, Nukleotid-Mix .....	76
C.22.2.2	Weitere Lösungen .....	76
C.22.2.3	2 xMaster-Mix für <i>in vitro</i> Transkription .....	76
C.22.2.4	Stopp-Puffer für <i>in vitro</i> Transkription.....	76
C.22.3	<i>in vitro</i> Transkriptionsansatz.....	76
C.22.3.1	Vormix .....	77
C.22.3.2	Durchführung .....	77
C.23	Optische Quantifizierung von Produktmengen .....	77
C.23.1	Digitale Bildvermessung mit ImageMaster™ Total Lab .....	77
C.23.2	Storage Phosphor Screen .....	78
D	Ergebnisse .....	79
D.1	Bindungsstudien an listeriellen Promotoren.....	79
D.1.1	Herstellung der DNA-Sonden für EMSA .....	80
D.1.2	Bindungsaffinität der verschiedenen PrfA-Proteine an den <i>hly</i> -Promotor von <i>L. monocytogenes</i> .....	81
D.1.3	Auswirkung der verwendeten RNAP-Konzentration .....	84

D.1.4	Die Auswirkung der N-terminalen His <sub>6</sub> -Markierung von PrfA auf die Bindungsaffinität an PrfA-abhängige Promotoren .....	84
D.1.5	Bindung von m-PrfA, m-PrfA*, i-PrfA und s-PrfA an die <i>hly</i> - und <i>actA</i> - Promotoren von <i>L. monocytogenes</i> , <i>L. ivanovii</i> and <i>L. seeligeri</i> .....	85
D.1.6	Untersuchung der Bindungseigenschaften des Hybrids sm-PrfA .....	87
D.2	PrfA-Aktivität von <i>Listeria monocytogenes</i> in verschiedenen Kulturmedien.....	88
D.2.1	Wachstum von <i>L. monocytogenes</i> EGD, EGD $\Delta$ <i>prfApPrfA</i> und EGD $\Delta$ <i>prfApPrfA*</i> in verschiedenen Kulturmedien.....	88
D.2.2	PrfA-Aktivität von <i>L. monocytogenes</i> EGD, EGD $\Delta$ <i>prfApPrfA</i> und EGD $\Delta$ <i>prfApPrfA*</i> in BHI Medium .....	91
D.2.3	PrfA-Aktivität von <i>L. monocytogenes</i> EGD, EGD $\Delta$ <i>prfApPrfA</i> und EGD $\Delta$ <i>prfApPrfA*</i> in LB Medium .....	92
D.2.4	Auswirkung des Amberlite XAD4 auf <i>L. monocytogenes</i> EGD, EGD $\Delta$ <i>prfApPrfA</i> und EGD $\Delta$ <i>prfApPrfA*</i> in LB.....	93
D.2.5	PrfA-Aktivität von <i>L. monocytogenes</i> EGD, EGD $\Delta$ <i>prfApPrfA</i> und EGD $\Delta$ <i>prfApPrfA*</i> in MM .....	94
D.2.6	Auswirkung des Amberlite XAD4 auf <i>L. monocytogenes</i> in MM.....	95
D.2.7	Expression PTS-abhängiger Gene in <i>L. monocytogenes</i> EGD nach Wachstum in verschiedenen Kulturmedien.....	96
D.2.8	Expression PTS-abhängiger Gene in <i>L. monocytogenes</i> EGD $\Delta$ <i>prfApPrfA</i> und EGD $\Delta$ <i>prfApPrfA*</i> .....	97
D.2.9	Die PrfA-Aktivität in <i>L. monocytogenes</i> EGD ist signifikant höher als in <i>L. monocytogenes</i> EGD-e .....	99
D.3	Listerielle Phosphotransferasesysteme .....	101
D.3.1	PTS-Aktivität in EGD-e nach Wachstum in verschiedenen Kohlenstoffquellen.....	102
D.3.1.1	Hämolytische Aktivität von EGD-e.....	102
D.3.1.2	Expression der Beta-Glucosid-spezifischen PTS in EGD-e .....	102
D.3.1.3	Expression der Mannose-spezifischen PTS in EGD-e.....	103
D.3.1.4	Expression einiger Cellobiose-spezifischer PTS in EGD-e .....	104
D.3.2	Beta-Glucosid spezifische Phosphotransferasesysteme .....	105
D.3.2.1	Herstellung von <i>L. monocytogenes</i> Deletionsmutanten .....	106
D.3.2.2	Wachstum und PrfA-Aktivität der PTS <sup>Glc</sup> -Deletionsmutanten in verschiedenen Kulturmedien.....	106
D.3.2.3	<sup>14</sup> C-Glucose-Aufnahme der PTS <sup>Glc</sup> -Deletionsmutanten .....	108
D.3.3	Mannose-spezifische Phosphotransferasesysteme .....	109
D.3.3.1	Wachstum und PrfA-Aktivität der PTS <sup>Man</sup> -Deletionsmutanten in verschiedenen Kulturmedien.....	109
D.3.3.2	Bestimmung der optimalen Glucosekonzentration im Medium .....	112
D.3.3.3	Verhalten der PTS <sup>Man</sup> -Deletionsmutanten in MM mit 10 mM Zucker .....	112
D.3.3.4	<sup>14</sup> C -Glucoseaufnahme der PTS <sup>Man</sup> -Deletionsmutanten.....	114
D.3.3.5	Expressionsmuster der auffälligen PTS <sup>Man</sup> -Deletionsmutanten.....	114
D.3.3.6	Verhalten der PTS <sup>Man</sup> -Deletionsmutanten mit d0027 .....	116
D.3.3.7	Verhalten der Deletionsmutanten ManPTS d0027 d2683-5 und ManPTS d0027 d2683-119	119
D.3.3.8	Verhalten der PTS <sup>Man</sup> -Deletionsmutanten <i>in vivo</i> .....	121

D.3.4	Cellobiose-spezifische Phosphotransferasesysteme .....	122
D.3.4.1	Wachstum und PrfA-Aktivität der PTS <sup>Lac</sup> -Deletionsmutanten in MM.....	123
D.3.4.2	<i>In vivo</i> Untersuchung von d2683-5.....	123
D.3.4.3	Expressionsmuster der PTS <sup>Lac</sup> -Deletionsmutanten .....	124
D.3.4.4	Verhalten der Deletionsmutante d2683-5 d0027 .....	125
D.4	Interaktion verschiedener EII Proteine mit PrfA .....	126
D.4.1	Immunpräzipitation .....	127
D.4.2	EMSA.....	128
D.4.3	<i>In vitro</i> Transkription .....	128
D.4.4	Phosphorylierungsstatus der aufgereinigten EII-Proteine .....	129
D.4.5	Lmo0096 Überexpression in <i>L. monocytogenes</i> .....	131
E	Diskussion.....	133
E.1	Spezies-spezifische Unterschiede der PrfA-DNA-Bindung .....	133
E.1.1	Bindungsaffinität der verschiedenen PrfA-Proteine.....	134
E.1.2	Bildung des geschlossenen Transkriptionskomplexes .....	135
E.1.3	Auswirkung der N-terminalen His <sub>6</sub> -Markierung.....	136
E.1.4	Untersuchung der Bindungseigenschaften des Hybrids sm-PrfA .....	136
E.2	PrfA-Aktivität von <i>Listeria monocytogenes</i> in verschiedenen Kulturmedien.....	138
E.2.1	Verhalten von <i>L. monocytogenes</i> EGD, EGD $\Delta$ <i>prfApPrfA</i> und EGD $\Delta$ <i>prfApPrfA</i> * in verschiedenen Kulturmedien.....	139
E.2.2	Expressionsdaten von <i>L. monocytogenes</i> EGD, EGD $\Delta$ <i>prfApPrfA</i> und EGD $\Delta$ <i>prfApPrfA</i> * in verschiedenen Kulturmedien.....	140
E.2.3	Verhalten von <i>L. monocytogenes</i> EGD, EGD $\Delta$ <i>prfApPrfA</i> und EGD $\Delta$ <i>prfApPrfA</i> * nach Zugabe von XAD-4 ins Medium.....	143
E.3	Listerielle Phosphotransferasesysteme .....	145
E.3.1	Betrachtung verschiedener PTS-Deletionsmutanten .....	147
E.3.1.1	Beta-Glucosid spezifische Phosphotransferasesysteme .....	147
E.3.1.2	Mannose-spezifische Phosphotransferasesysteme .....	149
E.3.1.3	Cellobiose-spezifische Phosphotransferasesysteme.....	151
E.3.1.4	Auswirkung der PRD-enhaltenden Transkriptionsaktivatoren .....	151
E.4	Interaktion verschiedener EII Proteine mit PrfA .....	154
E.5	Modell der Regulation der PrfA-Aktivität.....	155
F	Anhang.....	158
F.1	Tabellen.....	158
F.2	Abkürzungen .....	181
G	Literatur.....	183
H	Lebenslauf.....	199

-



# A Zusammenfassung/Summary

## A.1 Zusammenfassung

Das Gram positive Bakterium *Listeria monocytogenes*, das einzige Human- und Tierpathogen innerhalb der Gattung *Listeria*, gehört zu den fakultativ intrazellulären Bakterien. Die für den Infektionszyklus notwendigen Virulenzgene liegen größtenteils im Virulenzgencluster LIPI-1 und werden vom positiven Regulator PrfA kontrolliert (Goebel *et al.*, 2006; Kreft and Vázquez-Boland, 2001; Kreft *et al.*, 2002). Eine *prfA*-Deletionsmutante ist komplett avirulent, da sie keine Virulenzgene mehr exprimieren kann (Leimeister-Wächter *et al.*, 1990).

PrfA gehört zur Crp/Fnr Familie von Transkriptionsaktivatoren und bindet als Dimer im Promotorbereich PrfA-abhängiger Gene an eine 14 bp lange palindromische Konsensussequenz, die PrfA-Box (Sheehan *et al.*, 1995). Zum PrfA-abhängigen Promotor gehört zusätzlich eine 21-22 bp von der PrfA-Box entfernte SigA-abhängige -10-Box (Luo *et al.*, 2004; Luo *et al.*, 2005). Mehrere Aminosäuresubstitutionen in *prfA*, unter anderem eine Gly145Ser Substitution, führen zu einem konstitutiv aktiven PrfA\* (Ripio *et al.*, 1997; Shetron-Rama *et al.*, 2003; Yan *et al.*, 2008).

In dieser Arbeit wurden zunächst die PrfA Proteine von *L. monocytogenes* (m-PrfA und m-PrfA\*), der tierpathogenen Art *L. ivanovii* (i-PrfA) und der apathogenen Art *L. seeligeri* (s-PrfA) mittels Gelretardationsexperimenten auf ihre Bindungseigenschaften an die PrfA-abhängigen *hly*- und *actA*-Promotoren aller drei Spezies untersucht, sowie ihre Fähigkeit ternäre Komplexe mit der RNA-Polymerase (RNAP) auszubilden. Die Ergebnisse an m-*Phly* zeigen, dass i-PrfA mehr dem konstitutiv aktiven m-PrfA\* ähnelt als dem wildtypischen m-PrfA, wohingegen s-PrfA eine drastisch reduzierte Bindekapazität an die PrfA-abhängigen *Phly*- und *PactA*-Promotoren aufweist. Die geringe Bindungseigenschaft von s-PrfA scheint seine Ursache in Aminosäureaustauschen im C-terminalen Bereich (verglichen mit m-PrfA und i-PrfA) von s-PrfA zu haben. Ein Austausch der C-terminalen Region von *s-prfA* gegen die von *m-prfA* führt zu einer leichten Erhöhung der Bindung des gebildeten chimären PrfA-Proteins. Im Gegensatz zu den verschiedenen biochemischen Eigenschaften von m-PrfA(\*), i-PrfA und s-PrfA, unterscheiden sich die PrfA-abhängigen *hly*- (m-*Phly*, i-*Phly* und s-*Phly*) und *actA*-Promotoren (m-*PactA*, i-*PactA* und s-*PactA*) nicht signifikant in ihrer Bindungsaffinität zu den verschiedenen PrfA-Proteinen.

*In vivo* wird das *prfA*-Gen transkriptionell und posttranskriptionell reguliert (Hamon *et al.*, 2006) und zusätzlich wird das PrfA-Protein durch verschiedene Umweltbedingungen moduliert. In dem reichen Kulturmedium brain-heart-infusion (BHI) und in definiertem Minimalmedium (MM) mit zugegebenen PTS-Kohlenhydraten ist die PrfA-Aktivität niedrig (Gilbreth *et al.*, 2004; Milenbachs *et al.*, 1997). In Gegenwart der Nicht-PTS-Kohlenstoffquelle Glycerin (Joseph *et al.*, 2008; Mertins *et al.*, 2007) und in Säugetierzellen (Renzoni *et al.*, 1999), in denen vor allem Nicht-PTS-Kohlenstoffquellen verbraucht werden (Eylert *et al.*, 2008; Joseph *et al.*, 2006), ist die PrfA-Aktivität wesentlich höher.

Die konstitutiv aktiven PrfA\*-Proteine weisen strukturelle Ähnlichkeiten mit den konstitutiv aktiven Mutanten des Regulators Crp aus *E. coli* auf (Lampidis *et al.*, 1994; Ripio *et al.*,

1997; Shetron-Rama *et al.*, 2003). Dies führt zu der Annahme, dass wildtypisches PrfA in ähnlicher Weise von niedermolekularen Komponenten reguliert werden könnte wie Crp, welches bekanntlich von cAMP aktiviert wird (Eiting *et al.*, 2005; Kreft and Vázquez-Boland, 2001). Bisher blieb die Suche nach einer solchen Komponente jedoch erfolglos.

In weiteren Untersuchungen wurde nun die PrfA-Aktivität im *L. monocytogenes* Stamm EGD sowie dessen isogener Deletionsmutante (EGD $\Delta$ prfA) mit dem prfA- bzw. prfA\*-Gen unter Kontrolle des prfA-Promotors auf dem High-Copy Plasmid pERL3 (Stämme EGD $\Delta$ prfApPrfA und EGD $\Delta$ prfApPrfA\*) nach Wachstum in BHI, LB (Luria-Bertani Medium) und definiertem MM untersucht. Die Medien waren versetzt mit 50 mM der PTS-Kohlenstoffquellen Glucose, Mannose oder Cellobiose oder mit der Nicht-PTS-Kohlenstoffquelle Glycerin.

Mit dem Wildtyp EGD konnte in BHI und LB mit allen genannten Kohlenstoffquellen nur eine geringe PrfA-Aktivität beobachtet werden. In MM dagegen war die PrfA-Aktivität in Anwesenheit von Glycerin stark erhöht und mit Cellobiose als einziger Kohlenstoffquelle stark reprimiert. Mit dem PrfA\*-überexprimierenden Stamm EGD $\Delta$ prfApPrfA\* wurden unter allen Bedingungen hohe PrfA-Aktivität gefunden. EGD $\Delta$ prfApPrfA zeigte dagegen trotz gleicher PrfA-Menge wie EGD $\Delta$ prfApPrfA\* nur in BHI eine hohe PrfA-Aktivität. Die Zugabe des Amberlites XAD4 in LB erhöht die reduzierte PrfA-Aktivität in EGD $\Delta$ prfApPrfA und in MM verstärkt XAD4-Zugabe die PrfA-Aktivität des Wildtyps.

Eine ptsH-Mutante ist in LB und MM unabhängig von der Zugabe einer der vier Kohlenstoffquellen nicht in der Lage zu wachsen (Stoll *et al.*, 2008), was darauf hin deutet, dass die Aufnahme der verwendeten Kohlenstoffquelle und auch der Glycerinstoffwechsel von einem intakten PTS-Weg abhängig sind. In BHI stehen dagegen offensichtlich noch PTS-unabhängige Kohlenstoffquellen zur Verfügung, da die ptsH-Mutante in BHI noch wachsen kann. Dies unterstützt auch die Beobachtung, dass die Generationszeiten von *L. monocytogenes* in LB und vor allem MM im Vergleich zu BHI wesentlich länger sind.

Expressionsdaten der PTS-Gene wurden von allen drei Stämmen unter verschiedenen Wachstumsbedingungen erstellt. Die Daten deuten darauf hin, dass die PrfA-Aktivität mit der Expressionsstärke und dem Phosphorylierungsstatus bestimmter PTS-Permeasen zusammenhängt. PTS-Permeasen bestehen immer aus mindestens drei Domänen, der Membran überspannenden Zucker transportierenden Domäne EIIC (und EIID im Falle von Mannose spezifischen PTS) und den zwei im Zytosol löslichen Komponenten EIIA und EIIB. EIIA wird direkt von HPr-His-P phosphoryliert, welches sein Phosphat von dem von PEP phosphorylierten EI empfängt. Das PTS spielt neben der Zuckeraufnahme eine Rolle in vielen regulatorischen Vorgängen in der Bakterienzelle, unter anderem in der Pathogenese (Barabote and Saier, 2005; Deutscher *et al.*, 2006; Postma *et al.*, 1993). Listerien codieren für alle sieben bekannten PTS-Familien, 86 Gene codieren für 29 komplette und einige unvollständige PTS.

Trotz der großen Anzahl an PTS-Genen besitzt *L. monocytogenes* kein vollständiges PtsG, welches homolog zu *E. coli* oder *B. subtilis* ist, sondern nur ein EIIA<sup>Glc</sup>. Um die an der Glucoseaufnahme involvierten PTS-Permeasen zu identifizieren und einen möglichen Zusammenhang zwischen diesen PTS-Permeasen und der PrfA-Aktivität zu untersuchen, wurden in dieser Arbeit systematisch PTS-Permeasen deletiert, welche für putative Beta-Glucosid-PTS (PTS<sup>Glc</sup>), Mannose-PTS (PTS<sup>Man</sup>) und Cellobiose-PTS (PTS<sup>Lac</sup>) codieren.

Diese Deletionsmutanten wurden bezüglich ihres Wachstumes in Gegenwart der entsprechenden PTS-Zucker und die PrfA-Aktivität untersucht.

Deletionen von in *L. monocytogenes* EGD-e nur schwach exprimierten PTS<sup>Glc</sup> haben keinen Einfluss auf das Wachstum in MM mit 10 mM Glucose oder Cellobiose.

Von den vier exprimierten PTS<sup>Man</sup> sind zumindest zwei eindeutig in der Lage, Glucose zu transportieren, und die Deletion dieser PTS-Permeasen, codiert von lmo0096-0098 und lmo0781-0784, erhöht sehr deutlich die Expression des im Wildtyp wenig exprimierten Gens für die PTS-Permease PTS<sup>Glc</sup>(lmo0027). Für den Cellobiose-Transport scheint von den sechs vollständigen PTS<sup>Lac</sup>-Permeasen vor allem PTS<sup>Lac</sup>(lmo2683-2685) und nach Deletion dieses Operons, ebenfalls die PTS<sup>Glc</sup>(lmo0027)-Permease wichtig zu sein. Obwohl die multiple Deletion dieser für die Glucose/Mannose- bzw. Cellobiose-Aufnahme in *L. monocytogenes* wichtigen PTS-Permeasen das Wachstum in definiertem MM drastisch reduziert, haben diese Deletionen offensichtlich keine Auswirkung auf das intrazelluläre Wachstum, da die Infektionsrate so effizient ist wie die des Wildtyps. Auf PrfA hat die schrittweise Deletion der Glucose/Mannose-spezifischen PTS-Permeasen nach Wachstum in MM mit Glucose als einziger Kohlenstoffquelle eine aktivierende Wirkung, jedoch keine Auswirkung nach Wachstum in Cellobiose-haltigem MM. Umgekehrt verhält es sich mit den PTS<sup>Lac</sup>-Deletionsmutanten.

*In vitro* Transkriptionsstudien mit (teilweise phosphoryliert) aufgereinigten Lmo0096 (EIIAB<sup>Man</sup>) und Lmo1017 (EIIA<sup>Glc</sup>) -Proteinen deuten auf eine direkte Interaktion zwischen PrfA und bestimmten EII-Proteinen hin. Dies konnte für Lmo0096 auch in Immunpräzipitationsassays gezeigt werden. Eine Überexpression von Lmo0096 führte zudem zu einer sehr deutlichen Reduktion der PrfA-Aktivität nach Wachstum in MM mit Glucose.

Anhand der gewonnenen Daten konnte ein Modell für die Modulation der PrfA-Aktivität erstellt werden, nach dem im Zytosol lösliche Komponenten der Phosphoenolpyruvat-Phosphotransferasesysteme einen direkten Einfluss auf die PrfA-Aktivität haben. Die Daten sind im Einklang mit der Annahme, dass unphosphorylierte EIIA/B-Komponenten (im Überfluss vorhanden während des aktiven Zuckertransportes) an PrfA binden und es inaktivieren. Phosphorylierte PTS-Komponenten (z.B. während des Glycerin-Transportes oder des intrazellulären Wachstums vorhanden) könnten demnach PrfA aktivieren, entweder durch direkte Bindung an PrfA oder indem sie die Inhibition der PrfA-Aktivität durch phosphorylierte EIIA/B aufheben.

## A.2 Summary

The Gram positive bacterium *Listeria monocytogenes* is the only human pathogen in the genus *Listeria* and belongs to the facultative intracellular pathogens. Most of the genes necessary for the infectious cycle are located within the virulence gene cluster LIPI-1 and are under the control of the positive regulating factor PrfA (Goebel *et al.*, 2006; Kreft and Vázquez-Boland, 2001; Kreft *et al.*, 2002). A *prfA* deletion mutant is completely avirulent, not being able to express any of the virulence associated genes (Leimeister-Wächter *et al.*, 1990).

PrfA belongs to the Crp/Fnr family of transcription activators and binds as a dimer to a 14 bp palindromic consensus sequence called PrfA box (Sheehan *et al.*, 1995). In addition, a PrfA dependent promoter possesses a SigA dependent -10 box, which is located 21-22 bp downstream of the PrfA box (Luo *et al.*, 2004; Luo *et al.*, 2005). Several amino acid substitutions in the *prfA* gene, amongst others a Gly145Ser substitution, result in a constitutively active PrfA\* (Ripio *et al.*, 1997; Shetron-Rama *et al.*, 2003; Yan *et al.*, 2008).

In this study, PrfA binding properties of the proteins of *L. monocytogenes* (m-PrfA and m-PrfA\*), the animal pathogen *L. ivanovii* (i-PrfA) and the apathogenic species *L. seeligeri* (s-PrfA) to the PrfA dependent *hly* and *actA* promoters of all three species and the ability to form ternary complexes with the RNA polymerase (RNAP) were analyzed by electromobility shift assays. With m-*Phly*, i-PrfA resembles more the constitutively active m-PrfA\* than the wild type m-PrfA, while s-PrfA exhibits a dramatically lower binding capacity to the PrfA dependent promoters *Phly* and *PactA*. The low binding affinity of s-PrfA seems to be caused by amino acid exchanges in its C-terminal domain (compared to m-PrfA and i-PrfA). Exchange of the C-terminal domain from *s-prfA* by that of *m-prfA* leads to a slightly higher binding capacity of the chimeric PrfA protein. In contrast to the significant differences in the biochemical properties of m-PrfA, i-PrfA and s-PrfA, the PrfA-dependent promoters of *hly* (m-*Phly*, i-*Phly* and s-*Phly*) and *actA* (m-*PactA*, i-*PactA* and s-*PactA*) of the three *Listeria* species did not significantly differ in their binding affinity to the various PrfA proteins.

*In vivo*, the *prfA* gene is regulated on transcriptional and post-transcriptional levels (Hamon *et al.*, 2006) and the PrfA protein is additionally modulated by different environmental conditions. In the rich culture medium brain-heart-infusion (BHI) and in chemically defined minimal medium (MM) with added PTS carbohydrates the PrfA activity is low (Gilbreth *et al.*, 2004; Milenbachs *et al.*, 1997). In the presence of the non-PTS carbon source glycerol (Joseph *et al.*, 2008; Mertins *et al.*, 2007) and in mammalian cells (Renzoni *et al.*, 1999), where primarily non-PTS carbon sources are consumed, PrfA activity is significantly higher (Eylert *et al.*, 2008; Joseph *et al.*, 2006).

The constitutively active PrfA\* proteins (Ripio *et al.*, 1997) exhibit structural similarities to constitutively active mutants of the transcriptional regulator Crp of *E. coli* (Lampidis *et al.*, 1994; Ripio *et al.*, 1997; Shetron-Rama *et al.*, 2003) led to the assumption that wild type PrfA could be modulated by low molecular components in a similar way as Crp, which, as is well-known, is activated by cAMP (Eiting *et al.*, 2005; Kreft and Vázquez-Boland, 2001). Yet, until now the search for such a component was not successful.

In further studies the PrfA activity was assessed in *L. monocytogenes* strain EGD and its isogenic deletion mutant (EGD $\Delta$ *prfA*) with the *prfA* or *prfA*\* gene under the control of the *prfA* promoter located on the high copy plasmid pERL3 (strains EGD $\Delta$ *prfA*pPrfA and EGD $\Delta$ *prfA*pPrfA\*) after growth in BHI, LB (Luria-Bertani broth) and defined minimal medium. Media were supplemented with 50 mM of the PTS carbon sources glucose, mannose or cellobiose or with the non-PTS carbon source glycerol.

In the wild type EGD grown in BHI and LB a low PrfA activity was observed with all of the above carbon sources. In MM PrfA activity was strongly increased in the presence of glycerol and strongly decreased with cellobiose as sole carbon source. In the PrfA\* overexpressing strain EGD $\Delta$ *prfA*pPrfA\* high PrfA activity was detected under all conditions.

EGD $\Delta$ *prfApPrfA* exhibited a high activity only in BHI, though PrfA amounts were equally high as in EGD $\Delta$ *prfApPrfA*\*. Addition of the amberlite XAD4 to LB increases the reduced PrfA activity in EGD $\Delta$ *prfApPrfA* and the activity of the wildtype in MM.

A *ptsH* mutant is unable to grow in LB and MM irrespective of the supplementation with the four carbon sources (Stoll *et al.*, 2008), indicating that the uptake of the carbon source used as well as the glycerol metabolism are dependent on an intact PTS pathway. In contrast, BHI obviously possesses PTS independent carbon sources, as the *ptsH* mutant is still able to grow in BHI. This is also confirmed by the fact that *L. monocytogenes* generation times are significantly longer in LB and even more in MM as compared to BHI.

Expression of the PTS genes was assessed in all three strains upon different growth conditions. The data suggest that PrfA activity is correlated with the expression level and the phosphorylation state of specific PTS permeases. PTS permeases always consist of at least three domains, the membrane crossing sugar transporting domain EIIC (and EIID in mannose specific PTS) and the two cytosolic components EIIA and EIIB. EIIA is directly phosphorylated by HPr-His-P which receives its phosphate group from EI which is phosphorylated by PEP. Aside from sugar transport PT Systems are involved in a variety of regulatory processes in the bacterial cell, e.g. in pathogenesis (Barabote and Saier, 2005; Deutscher *et al.*, 2006; Postma *et al.*, 1993). *Listeria* code for all of the seven known PTS families with 86 genes coding for 29 complete and several incomplete PTS.

Despite the large number of PTS genes *L. monocytogenes* does not possess a complete PtsG homologue to *E. coli* or *B. subtilis* but only an orphan EIIA<sup>Glc</sup>. To identify the PTS permeases involved in glucose uptake and to investigate a possible role in PrfA regulation, mutants with deletions of beta glucoside PTS (PTS<sup>Glc</sup>), mannose PTS (PTS<sup>Man</sup>) and cellobiose PTS (PTS<sup>Lac</sup>) permeases have been analyzed systematically in this study. These deletion mutants were analyzed in respect to their growth upon the respective PTS sugars and to their PrfA activity.

Deletion of the five PTS<sup>Glc</sup> permeases only weakly expressed in *L. monocytogenes* EGD-e had no impact on growth in MM with 10 mM glucose or cellobiose.

At least two out of the four expressed PTS<sup>Man</sup> permeases are able to transport glucose and the deletion of these PTS (encoded by lmo0096-0098 and lmo0781-0784) causes a significant increase in expression of the PTS<sup>Glc</sup>(lmo0027) permease, which is expressed at a low level in the wildtype. For transport of cellobiose, only PTS<sup>Lac</sup>(lmo2683-2685) out of the six complete PTS<sup>Lac</sup> permeases and, after deletion of this operon, PTS<sup>Glc</sup>(lmo0027) seem to be of importance. Although multiple deletions of the PTS important for glucose/mannose and cellobiose uptake have severe consequences on growth in defined MM, obviously intracellular life is not affected, as infection rates resemble those of the wild type. PrfA is activated by the stepwise deletion of the glucose/mannose specific PTS upon growth in MM supplemented with glucose, but no effect is seen upon growth in cellobiose supplemented MM. The behavior of the PTS<sup>Lac</sup> deletion mutants is conversely.

*In vitro* transcription studies with (partially phosphorylated) purified Lmo0096 (EIIB<sup>Man</sup>) and Lmo1017 (EIIA<sup>Glc</sup>) proteins suggest a direct interaction between PrfA and specific EII proteins. This could be confirmed for Lmo0096 in immuno precipitation assays. An overexpression of lmo0096 lead to a significant reduction of PrfA activity upon growth in MM supplemented with glucose.

The data from this study allow the proposal of a model of PrfA activity modulation, in which the cytosolic components of the PEP-PTS exert a direct influence on PrfA activity. The data are in good agreement with the assumption, that unphosphorylated EIIA/B components (present in excess during active sugar transport) bind PrfA and inactivate it. Phosphorylated PTS components (e.g. while glycerin uptake or during intracellular growth) could activate PrfA either by binding to PrfA or by suspending the inhibition of PrfA activity by phosphorylated EIIA/B components.

## B Einleitung

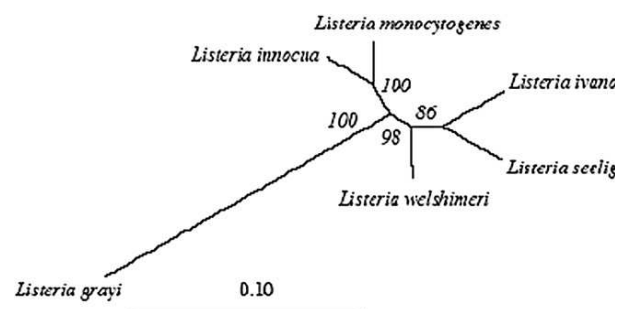
### B.1 Die Gattung *Listeria*

Listerien bilden eine Gruppe Gram-positiver, stäbchenförmiger, nicht sporulierender Bakterien, die in der Lage sind, fakultativ anaerob zu wachsen. Die kurzen Stäbchen (0,4 x 1-2 µm) sind in der Natur ubiquitär verbreitet und finden sich in Wasser, Abwasser, Bodenproben und Pflanzenmaterial, sowie in zahlreichen Lebensmitteln und im Gastrointestinaltrakt des Menschen, verschiedener Säuger und Vögel. Als natürliches Habitat wird verrottendes Pflanzenmaterial angesehen, in dem *Listeria* spp. saprophytisch leben kann (Farber and Peterkin, 1991; Glaser *et al.*, 2001; Vazquez-Boland *et al.*, 2001).

Zur Zeit umfasst die Gattung *Listeria* sechs beschriebene Arten: *Listeria monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, *L. innocua*, *L. welshimeri* und *L. grayi*. Von den sechs bekannten Arten sind nur *L. monocytogenes* und *L. ivanovii* pathogen und können eine als Listeriose bekannte Infektionskrankheit verursachen. Die restlichen vier Arten sind harmlose Umweltkeime. Trotzdem sind die Genome der *Listeria*-Spezies hoch konserviert und die verschiedenen Arten eng miteinander verwandt (Abbildung 1) (Buchrieser, 2007; Hain *et al.*, 2006; Schmid *et al.*, 2005).

Die Gattung *Listeria* ist nach tmRNA Analysen eng verwandt mit den Gattungen *Bacillus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus* und *Staphylococcus* (Sallen *et al.*, 1996; Schönhuber *et al.*, 2001). Sie lässt sich durch ihre biochemischen und hämolytischen Eigenschaften klassifizieren, so sind Listerien Oxidase-

negativ, Katalase- und Methylrot-positiv (Schuchat *et al.*, 1991). Listerien werden in die Gruppe der Gram-positiven Bakterien mit geringem GC-Gehalt (36-42%) eingeordnet.



**Abbildung 1** Phylogramm der Gattung *Listeria* errechnet aus dem 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).

Listerien sind bemerkenswert tolerant gegenüber extremen Umweltbedingungen. Sie können bei -0,4°C bis +50°C wachsen (Junttila *et al.*, 1988; Walker *et al.*, 1994). Zwischen 10 und 25 °C sind Listerien peritrich begeißelt und motil (Peel *et al.*, 1988). Zudem vermehren sich Listerien noch bei Salzkonzentrationen von 10% NaCl und pH-Werten im Bereich von pH 5,5-9,6. Die Bakterien können selbst NaCl-Konzentrationen bis zu 20% und längere Perioden des Trocknens und Gefrierens mit anschließendem Auftauen überleben (Gray *et al.*, 2006; Seeliger, 1988). Optimale Wachstumsbedingen für Listerien sind jedoch 30 bis 37 °C und ein neutraler bis leicht alkalischer pH (Collins *et al.*, 1991; Junttila *et al.*, 1988; Lou and Yousef, 1997). Aufgrund dieser Eigenschaften haben Listerien die Fähigkeit, konventionelle Methoden der Nahrungsmittelkonservierung zu überleben, und stellen eine nicht zu unterschätzende Gefahr als potentiell pathogene Nahrungsmittelkeime dar (Farber and Peterkin, 1991; Gandhi and Chikindas, 2007; Kathariou, 2002; Schuchat *et al.*, 1991).

### B.1.1 Listeriose

Murray *et al.* entdeckten 1926 nach einer Epidemie unter Kaninchen und Meerschweinchen in Cambridge erstmals Listerien in Labortieren, bezeichneten diese zunächst als *Bacterium monocytogenes* und eine Erkrankung wurde lange Zeit als Zoonose beschrieben (Murray *et al.*, 1926). Der erste Ausbruch von Listeriose beim Menschen wurde 1929 festgestellt, jedoch erst Gray prägte 1949 den Begriff Listeriose (Schlech *et al.*, 1983; Seeliger, 1988).

Die humane Listeriose ist eine seltene Erkrankung mit sporadischem Auftreten bei gesunden Menschen, welche den Erreger lange unerkannt im Gastrointestinaltrakt tragen können (Cossart, 2007). Zu den Risikogruppen zählen schwangere Frauen und ihre Föten, Neugeborene, ältere Menschen und immungeschwächte Personen, wie z.B. immunsupprimierte Transplantationspatienten und AIDS-Kranke (Hof, 2004). Der Gesundheitszustand der infizierten Person entscheidet dabei über den Verlauf und Ausgang der Listeriose. Aber auch gesunde Menschen können sich mit Listerien infizieren, wenn die aufgenommene Keimzahl groß genug ist, was meist mit der Aufnahme kontaminierter Lebensmittel einhergeht (Dalton *et al.*, 1997). Wenn frühzeitig diagnostiziert, kann eine Listerien-Infektion durch Verabreichung von Antibiotika erfolgreich bekämpft werden (Galinier *et al.*, 1997; Hof, 2004; Sheehan *et al.*, 1994). Dennoch ist Listeriose von einer hohen Mortalitätsrate gekennzeichnet, denn jeder dritte Listeriose-Patient stirbt, da die Antibiotikagabe durch die unklare Symptomatik und die schwierige Diagnose oft verzögert wird. Praktisch einsetzbare Impfstoffe für den Menschen sind bisher noch nicht verfügbar.

Die Listeriose ist unter den bekannten bakteriellen Infektionskrankheiten eine der tödlichsten (Gellin and Broome, 1989; Gray *et al.*, 2006; Schuchat *et al.*, 1991; Vazquez-Boland *et al.*, 2001) und hat sich auch deshalb als wichtiges Modellsystem für die Vermehrung und Pathogenese intrazellulärer Bakterien allgemein etabliert (Cossart, 2007; Hamon *et al.*, 2006; Portnoy *et al.*, 1992), sowie in virulenzattenuierter Form als Träger von Lebendimpfstoffen (Schoen *et al.*, 2008).

Unter der Listeriose ist kein einheitliches Krankheitsbild zu verstehen, sondern vielmehr ist es ein Oberbegriff für eine Reihe von Erkrankungen, die beim Menschen bzw. beim Tier durch eine listerielle Infektion ausgelöst werden können. Dazu zählen influenzaähnliche Symptome, Gastroenteritis, Sepsis und , da die Bakterien die Blut-Hirn-Schranke überwinden können, Erkrankungen des zentralen Nervensystems, wie Meningitis und Meningoenzephalitis (Dalton *et al.*, 1997; Gray *et al.*, 2006; Schuchat *et al.*, 1991). Außerdem sind Listerien in der Lage, die Plazentabarriere zu durchdringen, was zu Fehl- und Totgeburten sowie Krankheitsübertragung auf das Neugeborene (neonatale Listeriose) führen kann (Gellin and Broome, 1989; Lorber, 1997), wobei die Mortalitätsrate zwischen 25 und 50% liegt.

Als Hauptinfektionsquelle für den Menschen gelten kontaminierte Lebensmittel wie Milchprodukte (v.a. Käse), Geflügel, Fleisch, Fisch, aber auch Obst und Gemüse, sowie industriell hergestellte, gekühlte Fertigprodukte, die ohne vorheriges Kochen oder Erhitzen verzehrt werden. *L. monocytogenes* ist ebenfalls im Kot von gesunden Erwachsenen (und Tieren) nachweisbar, weshalb der Gastrointestinaltrakt ein weiteres Reservoir für den pathogenen Keim darstellt (Farber and Peterkin, 1991; Gellin and Broome, 1989; Schuchat *et al.*, 1991; Vazquez-Boland *et al.*, 2001).



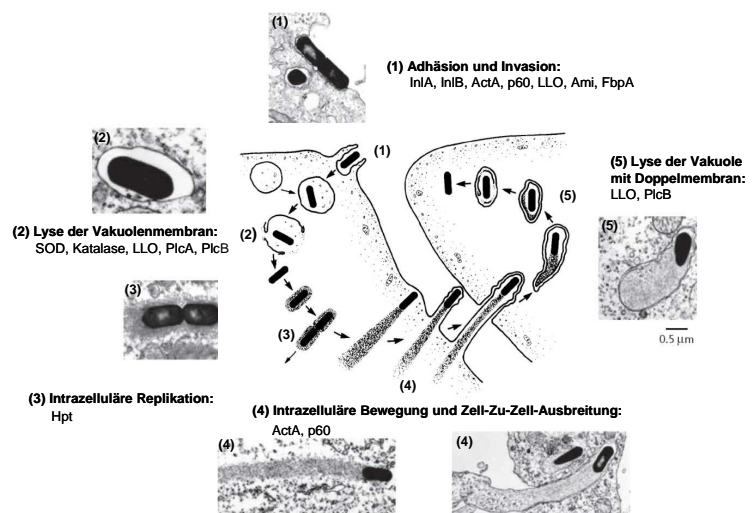
## B.1.2 Infektionsverlauf

Zahlreiche Virulenzfaktoren von *L. monocytogenes* wurden schon identifiziert und auf molekular- und zellbiologischer Ebene untersucht, aber trotz des großen Wissens ist die Virulenz von *L. monocytogenes* noch immer nicht komplett verstanden. Es fehlt die Erkenntnis über die genauen Bedingungen, welche die Virulenz auslösen.

Innerhalb der Spezies *L. monocytogenes* existieren Unterschiede in der Virulenz, denn es gibt Daten, die darauf hin deuten, dass nicht alle Stämme gleich gut Listeriose auslösen können. Von den 13 Serovaren sind die Isolate 1/2a, 1/2b, 1/2c und 4b für 98% der humanen Listeriose Fälle verantwortlich (Buchrieser, 2007). Für diese stammsspezifischen Unterschiede in der Virulenz scheinen aber nicht die Hauptvirulenzgene von *L. monocytogenes* die Ursache zu sein, auch wenn die Virulenzgene zum Großteil in den nicht pathogenen Arten *L. innocua* und *L. welshimeri* nicht mehr vorkommen (Schmid *et al.*, 2005).

Neben dem Vorkommen als ubiquitärer Umweltkeim ist *L. monocytogenes* wie viele andere (fakultativ intrazelluläre) Krankheitserreger (z.B. *Mycobacterium*, *Salmonella*, *Shigella*, *Legionella* und *Yersinia*) in der Lage in eukaryotische Wirtszellen einzudringen, dort zu überleben, sich zu vermehren und über die Zellgrenzen hinweg auszubreiten (Cossart and Mengaud, 1989; Goebel *et al.*, 1988; Kreft, 1992).

Der Infektionszyklus von *L. monocytogenes* ist im Mausmodell genau untersucht und beschrieben worden (Dussurget *et al.*, 2004). Die Listerien infizieren zunächst das Darmepithel und dringen dann durch die Enterozyten und so genannte M-Zellen in das darunter liegende lymphoide Gewebe vor (Jensen *et al.*, 1998; Karunasagar *et al.*, 1997). Dort werden die Bakterien von professionellen Phagozyten wie Makrophagen phagozytiert oder induzieren ihre eigene Phagozytose in



**Abbildung 2** Infektionszyklus von *L. monocytogenes* und die daran beteiligten Virulenzfaktoren; (modifiziert nach (Cossart and Lecuit, 1998; Tilney and Portnoy, 1989).

einer Reihe nicht-professionell phagozytischer Zellen wie Epithelzellen (Mengaud *et al.*, 1996; Milohanic *et al.*, 2004; Portnoy *et al.*, 1988), Fibroblasten (Kuhn *et al.*, 1988; Sun *et al.*, 1990), Hepatozyten (Dramsı *et al.*, 1995; Gregory *et al.*, 1996; Wood *et al.*, 1993), Endothelzellen (Drevets *et al.*, 1995; Engelbrecht *et al.*, 1998; Parida *et al.*, 1998) und verschiedenen Typen von Nervenzellen (Dramsı *et al.*, 1998). 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. Wenn sie die Blut-Hirnschranke überwinden, so kommt es zu einer Entzündung der Gehirnhaut (Meningitis) und/oder des Gehirns (Enzephalitis, zusammen: Meningoenzephalitis). Bei Schwangeren können die Listerien zudem nach Überwindung der Plazentaschranke den Fötus infizieren

(Abram *et al.*, 2003; Redline and Lu, 1988). Verschiedene eukaryotische Zellrezeptoren wie die Komplementrezeptoren (Lecuit *et al.*, 1997), das Glykoprotein E-Cadherin (Mengaud *et al.*, 1996), der Met-Rezeptor für den Hepatozytenwachstumsfaktor (Shen *et al.*, 2000) und Bestandteile der extrazellulären Matrix dienen *Listeria* spp. zur Wirtszellerkennung.

### B.1.2.1 Adhäsion und Invasion

Internalin A und B wurden als erste listerielle Faktoren entdeckt, die im Zusammenhang mit der Invasion in die Zelle stehen. Ebenfalls beteiligt an der Anheftung an und Invasion in die Wirtszelle sind die Virulenzfaktoren FbpA, Ami, ActA und p60.

Die Internaline zählen zur Multigenfamilie der LRR-Proteine (LRR = Leucin reiche Repeats) und lassen sich in zwei Gruppen einteilen: die kleinen, sekretierten Internaline und die großen, oberflächenassoziierten Internaline (Bierne *et al.*, 2007; Dramsi *et al.*, 1993; Dussurget *et al.*, 2002). Die großen Internaline besitzen einen charakteristischen Aufbau: Sie enthalten ein N-terminales Signalpeptid, zwei Repeat-Regionen (A und B), von denen die Repeat-Region A LRRs enthält. Die Leucin-reichen Repeats sind vermutlich an Protein-Protein-Interaktionen beteiligt. Am C-terminalen Ende befindet sich bei allen großen Internalinen, außer InlB, ein LPXTG-Motiv, was kovalent mit dem bakteriellen Peptidoglykan verknüpft ist und so der Verankerung dient (Lecuit *et al.*, 1997).

**Internalin A** (InlA) ist ein 88 kD schweres Oberflächenprotein, wird vom *inlA*-Gen codiert und besitzt den für große Internaline typischen Aufbau (Eiting *et al.*, 2005). E-Cadherin wurde als spezifischer eukaryotischer Rezeptor für das Protein InlA identifiziert. Dieses  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Adhäsionsmolekül wird vor allem in epithelialen Geweben, wie Haut, Leber und im Intestinaltrakt exprimiert. Die LRR-Region von InlA interagiert wahrscheinlich mit der ersten extrazellulären Domäne von E-Cadherin, was zur Adhäsion von *L. monocytogenes* an die Wirtszelle führt (Lecuit *et al.*, 1999). Die Invasion wird durch die zytoplasmatische Domäne des E-Cadherins vermittelt und führt vermutlich zum Rearrangement des Aktinzytoskeletts über  $\alpha$ - und  $\beta$ -Catenine (Mengaud *et al.*, 1996). InlA-negative Mutanten sind nicht mehr in der Lage, in Caco-2-Enterozyten zu penetrieren. Umgekehrt erzielt man durch das Einbringen des *inlA*-Gens in die nicht-invasive, apathogene Art *L. innocua* die Fähigkeit der Invasion in Caco-2-Zellen (Milohanic *et al.*, 2004).

Bei **Internalin B** (InlB) handelt es sich um ein 65 kD schweres Protein mit großen strukturellen Homologien zu InlA (Dramsi *et al.*, 1995). Am C-Terminus finden sich an Stelle des LPXTG-Motivs mehrere hintereinander angeordnete Repeats, die als Zelloberflächenanker (Csa = Cell surface anchor) fungieren. Diese Domäne vermittelt die Anheftung von InlB an die bakterielle Oberfläche über die Teichon- oder Lipoteichonsäuren der bakteriellen Zellwand (Lecuit *et al.*, 1997). Für die Invasion ist wie bei InlA die LRR-Region ausreichend. Die Bindung von InlB an seinen Rezeptor, die Met-Rezeptor-Tyrosin-Kinase, auf der Wirtszelloberfläche führt zur Aktivierung der Phosphatidylinositol (PI) 3-Kinase (Ireton *et al.*, 1999; Shen *et al.*, 2000). Diese Kinase ist an der Kontrolle des Aktinzytoskeletts beteiligt und bewirkt dadurch eine effiziente Aufnahme in epitheliale Zellen. InlB-negative Mutanten zeichnen sich durch eine verringerte Virulenz aus und können nicht mehr in Hepatozyten und in einige Epithelzelllinien eindringen (Lingnau *et al.*, 1995).

Weitere Vertreter der großen, oberflächengebundenen Internaline von *L. monocytogenes* sind die Internaline C2, D, E, F, G und H. Die Gene dieser Internaline sind in drei weiteren Loci organisiert und werden PrfA-unabhängig exprimiert. All diese Internaline weisen die typischen Merkmale der großen oberflächengebundenen Internaline auf und sind bis auf

abweichende Anzahl an Repeats ähnlich wie Internalin A aufgebaut. Die Funktion dieser sechs Internaline ist bisher noch unklar. Es konnte aber gezeigt werden, dass die Invasion in Säugerzelllinien durch eine Deletion des *inlGHE* Genclusters beeinflusst wird (Bergmann *et al.*, 2002). Das ganz neu identifizierte Internalin J wird *in vivo* nur unter spezifischen Bedingungen exprimiert und wirkt als Adhesin (Sabet *et al.*, 2008).

**Internalin C** (InlC oder IrpA) ist der Prototyp der kleinen, sekretierten Internaline von *L. monocytogenes*. Es besitzt ein Molekulargewicht von 30 kD und wird im Gegensatz zu den großen Internalinen ausschließlich im Kulturüberstand gefunden. Im Allgemeinen besitzen die kleinen Internaline am N-Terminus ein Signalpeptid und eine Region aus Leucin-reichen Repeats, die von zwei hoch konservierten Bereichen flankiert wird. Zudem fehlt ihnen die C-terminale Membranankersequenz. Es wird vermutet, dass InlC in einer späteren Phase der Infektion eine Rolle spielt, da bei entsprechenden Deletionsmutanten zwar eine reduzierte Virulenz, jedoch normale Invasivität beobachtet wurde (Engelbrecht *et al.*, 1996; Lingnau *et al.*, 1996). Die Expression von *inlC* ist PrfA-abhängig und es wird, wie die meisten PrfA-abhängigen Gene im Zytoplasma der Wirtszelle, vor allem in der späten Phase der Infektion, der Zell-zu-Zell-Ausbreitung, exprimiert. Die Untersuchung einer *inlC*-Deletionsmutante zeigte jedoch keinen Defekt in der interzellulären Verbreitung von *L. monocytogenes* (Engelbrecht *et al.*, 1996). Durch *in vitro* Transkriptionsassays konnte nachgewiesen werden, dass *inlC* auch einen PrfA-unabhängigen Promotor besitzt (Luo *et al.*, 2004).

Das extrazelluläre, 60 kD schwere Protein **p60**, ist ein weiterer bakterieller Faktor, der an der Invasion von nicht-professionell phagozytischen Zellen beteiligt ist. Es wird vom *iap*-Gen (*invasion-associated protein*) codiert und PrfA-unabhängig exprimiert (Herler *et al.*, 2001; Wuenscher *et al.*, 1991). Das p60-Protein ist ein basisches Protein mit einer hohen positiven Ladung. Man findet p60 zum Teil oberflächengebunden, der Hauptteil wird jedoch in das Medium sekretiert (Kuhn and Goebel, 1989; Ruhland *et al.*, 1993). p60 konnte in allen *Listeria*-Arten nachgewiesen werden und besteht aus einer variablen mittleren Region und hoch konservierten C- und N-terminalen Bereichen (Herler *et al.*, 2001; Wuenscher *et al.*, 1991). Die variable Region ist charakteristisch für jede *Listeria*-Art. Das p60-Protein scheint eine Rolle bei der Invasion in bestimmte Zelltypen zu spielen, da spontan auftretende Rauh-Mutanten von *L. monocytogenes* eine verringerte Adhärenz an und Invasivität in verschiedene Zelltypen, sowie eine verminderte Virulenz zeigen. Diese R-Mutanten sind durch eine raue Kolonieoberfläche und gleichzeitig eine stark verminderte p60-Produktion gekennzeichnet (Galinier *et al.*, 1997; Kuhn and Goebel, 1989). Zudem scheint p60 wichtig für die intrazelluläre Bewegung und Zell-zu-Zell-Ausbreitung. Eine  $\Delta iap$ -Mutante war im Mausmodell stark attenuiert, da kein Aktinschweif mehr ausgebildet werden konnte (Stritzker *et al.*, 2004).

**ActA** ist ein listeriellies Oberflächenprotein, das verantwortlich ist für die Aktin-vermittelte bakterielle Bewegung und die Ausbreitung von Zelle zu Zelle (siehe B.1.2.3) (Brundage *et al.*, 1993; Chakraborty *et al.*, 1992b). Es konnte zudem gezeigt werden, dass ActA ein bakterieller Ligand ist, der die Erkennung des HSPG-Rezeptors auf verschiedenen Wirtszellen vermittelt. Heparansulfat-Proteoglykane (HSPG) sind Bestandteile von extrazellulärer Matrix und Plasmamembranen mit ubiquitärer Verbreitung in eukaryotischen Zellen. Sie befinden sich sowohl auf professionellen als auch auf nicht-professionellen Phagozyten. Das Oberflächenprotein ActA besitzt in seinem N-terminalen Bereich ein Heparansulfat (HS)-Bindungsmotiv und mehrere Cluster positiv geladener Aminosäuren, die

als HS-Bindedomänen fungieren könnten. Untersuchungen an *actA*-Mutanten haben gezeigt, dass diese in ihrer Adhärenz und Invasivität aufgrund der veränderten HS-Erkennung beeinträchtigt, wenn auch nicht vollständig defekt waren (Alvarez-Dominguez *et al.*, 1997). Weitere Analysen offenbarten, dass die Deletion des *actA*-Gens in einem hyperinvasiven *L. monocytogenes*-Stamm zu einem starken Rückgang der Invasionsrate in Epithelzellen führte. Zudem konnte die normalerweise nicht-invasive *Listeria*-Art *L. innocua* durch heterologe Expression des *actA*-Gens in Epithelzellen eindringen (Suarez *et al.*, 2001).

Das Fibronectin-bindende Protein A (**FbpA**) besteht aus 570 Aminosäuren, wird von *fbpA* (*Imo1829*) codiert und PrfA-unabhängig transkribiert. FbpA wird trotz fehlenden typischen Signalpeptids auf der listeriellen Oberfläche exprimiert. Ein zweiter SecA-Transporter, der auch Proteine ohne Signalpeptid befördert, könnte bei der Sekretion beteiligt sein (Lenz *et al.*, 2003). Das Protein bindet an der Oberfläche der Wirtszelle an unbewegliches Fibronectin und vermittelt so die Adhärenz an Hep-2 Zellen. Zudem interagiert FbpA mit LLO und InlB. Es scheint diese Proteine als eine Art Chaperon vor Denaturierung zu schützen und/oder verstärkt den Sekretionsprozess dieser spezifischen Virulenzproteine. Eine Interaktion mit weiteren Virulenzfaktoren wurde bisher noch nicht gezeigt (Dramsi *et al.*, 2004).

Als weiteres listerielles Oberflächenprotein, das die Adhärenz an Wirtszellen vermittelt, gilt das Autolysin Amidase (**Ami**). Dieses 917 Aminosäuren große Protein besitzt eine dem Autolysin Atl von *Staphylococcus aureus* ähnliche aminoterminal Domäne und eine Zellwand verankerte carboxyterminale Domäne aus bis zu acht GW Modulen (Dussurget *et al.*, 2004). Als Besonderheit ist Ami serovarspezifisch und *ami* Deletionsmutanten sind virulenzattenuiert. (Milohanic *et al.*, 2000; Milohanic *et al.*, 2001; Milohanic *et al.*, 2004). Ein ebenfalls in jüngster Zeit entdeckter Virulenzfaktor für die Invasion in nicht phagozytierende Zellen ist das vom *aut*-Gen codierte 572 Aminosäuren große **Auto**, welches in *L. innocua* nicht vorkommt. Es besteht aus seiner Signalsequenz, einer N-terminalen Autolysin Domäne und einer C-terminalen Zellwandverankerungsdomäne aus vier GW Modulen. Das Oberflächenprotein Auto besitzt autolytische Aktivität und wird PrfA unabhängig codiert. Eine *aut* Deletionsmutante zeigt nur noch geringe Invasivität (Cabanes *et al.*, 2004).

In den nicht pathogenen *Listeria* Arten findet man das PrfA regulierte Gen *vip* nicht. **Vip** ist ein Oberflächenprotein mit LPXTG Motiv, wird von Sortase A an die listerielle Zellwand verankert und ist erforderlich für die Invasion in einige Zelllinien. Das auf dem Endoplasmatischen Retikulum (ER) befindliche Chaperon Gp96 ist der zelluläre Rezeptor für Vip. Diese Interaktion zwischen Vip und Gp96 scheint wichtig für die Invasion von *L. monocytogenes* in bestimmte Zellen (Cabanes *et al.*, 2005).

Bevor pathogene Listerien in Darmzellen eindringen können sind sie oft Gallensalzen ausgesetzt, welche antimikrobielle Eigenschaften besitzen. Im Gegensatz zu den nicht pathogenen Arten codiert *L. monocytogenes* **BSH** (bile salt hydrolase), eine PrfA abhängige Gallensalzhydrolase. BSH wird unter sauerstoffarmen Bedingungen aktiver und eine *bsh* Deletion führt zu geringerer Resistenz gegen Gallensalze in Meerschweinchen (Dussurget *et al.*, 2002).

### **B.1.2.2 Überleben im und Entkommen aus dem Phagosom**

Nach Eindringen in die eukaryotische Wirtszelle sind virulente Listerien im Phagosom den antibakteriellen Mechanismen des Wirts ausgesetzt, überleben aber zu einem gewissen

Prozentsatz auf Grund aktiver bakterieller Abwehrmechanismen und können schließlich in das Zytoplasma der Wirtszelle entkommen. Für das Entkommen aus dem Phagosom werden mehrere Proteine benötigt.

Schon kurze Zeit nach Aufnahme von *L. monocytogenes* ins Phagosom kommt es zu dessen Ansäuerung und es werden große Mengen reaktiver Sauerstoffmetabolite (wie  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{O}_2^-$ ,  $\text{OH}^\bullet$  und  $\text{HOCl}$ ) gebildet, die innerhalb weniger Minuten zur Abtötung avirulenter Bakterien führen. Listerien verfügen jedoch über die Enzyme Superoxid-Dismutase (**SOD**) und **Katalase**, mit deren Hilfe sie die toxischen Sauerstoffverbindungen in unschädliche Endprodukte umwandeln können (Brehm *et al.*, 1992). Da diese Enzyme an der bakteriellen Verteidigung gegen die Abwehrmechanismen der eukaryotischen Wirtszelle beteiligt sind, können sie als mögliche Virulenzfaktoren von *Listeria* angesehen werden (Goebel *et al.*, 1988). In Versuchen konnte gezeigt werden, dass sowohl Katalase- als auch SOD-negative Mutanten in ihrer Virulenz nicht beeinträchtigt waren. Nur eine Doppelmutante zeigte eine deutlich verringerte Virulenz (Brehm *et al.*, 1992).

Für das Überleben in der phagozytischen Vakuole benötigt *Listeria* eine an die im Phagosom vorliegenden Stressbedingungen angepasste Antwort, durchgeführt von konservierten Proteinen, die unter diesen widrigen Umständen produziert werden. Es konnte eine Gruppe von Virulenz-assoziierten Stressproteinen identifiziert werden (**Clp-Familie**), die am Überleben im Phagosom und dem Entkommen ins Zytoplasma beteiligt sind. Zu diesen zählen ClpB, ClpC (ATPase), ClpE und ClpP (Protease), die vom negativen Regulator CtsR kontrolliert werden. Für ClpC und ClpE konnte gezeigt werden, dass ein Hitzeschock (Wachstum bei  $42^\circ\text{C}$ ) zu einer verstärkten Produktion dieser Stressproteine führte (Chastanet *et al.*, 2004; Nair *et al.*, 1999; Nair *et al.*, 2000; Rouquette *et al.*, 1996; Rouquette *et al.*, 1998; Wawrzynow *et al.*, 1996).

Ein entscheidender Faktor für das Entkommen aus dem Phagosom ist **das Listeriolysin O (LLO)**, ein extrazelluläres, Cholesterol-abhängiges, porenbildendes Protein. Es gehört zur Familie der SH-aktivierbaren Zytolysine mit optimaler Wirkung im sauren Bereich (pH 5,5). Zudem ist LLO nur in einem engen pH-Bereich zwischen pH 4,5 und 6,5 aktiv, was eine *Listeria*-spezifische Anpassung an das saure Milieu im Phagosom darstellt (Andrews and Portnoy, 1994; Geoffroy *et al.*, 1987; Kayal and Charbit, 2006). Daneben verhindert dies, dass *L. monocytogenes* andere Bestandteile im Zytoplasma der Wirtszelle beschädigt und damit sein intrazelluläres Überleben gefährdet (Beauregard *et al.*, 1997). Das Listeriolysin LLO besitzt ein Molekulargewicht von 58,6 kD und wird vom PrfA-regulierten Gen *hly* codiert (Domann and Chakraborty, 1989; Leimeister-Wächter *et al.*, 1990; Mengaud *et al.*, 1987; Mengaud *et al.*, 1988). Das Listeriolysin-Gen *hly* war die erste Virulenzdeterminante, die in *Listeria* spp. identifiziert (Kathariou *et al.*, 1987) und sequenziert wurde und führte zur Entdeckung des chromosomalen Virulenzgenclusters. LLO ist ein essentieller Virulenzfaktor und spielt vermutlich eine Schlüsselrolle beim Entkommen von *Listeria* aus dem Phagosom infizierter Zellen (Cossart and Mengaud, 1989; Milohanic *et al.*, 2004). Nach der Aufnahme in die eukaryotische Wirtszelle wird innerhalb der ersten 30 Minuten die phagosomale Membran durch das Listeriolysin zerstört. Hierbei benutzt LLO, wie alle SH-aktivierbaren Zytolysine, Cholesterin als primären Rezeptor auf der eukaryotischen Membran. Nach Rezeptorbindung kommt es durch Zusammenlagerung von bis zu 70 LLO-Monomeren zur Bildung eines Transmembran-Komplexes mit einer hydrophilen Pore. Eine genügend große Zahl solcher Poren führt zu einem Zusammenbruch der Membran und damit zur Freisetzung der Listerien ins Zytoplasma (Kreft, 1992; Kühn *et al.*, 1988). Bei der Ausbreitung von Zelle

zu Zelle spielt LLO eine vergleichbare Rolle und ist für das effiziente Entkommen aus der sekundären Vakuole mit Doppelmembran verantwortlich (Gedde *et al.*, 2000).

Weitere Untersuchungen zeigen, dass Listeriolysin O vermutlich ein multifunktionaler Virulenzfaktor ist, der neben der Zerstörung der phagosomalen Membran viele verschiedene Aufgaben in der Interaktion zwischen Wirt und infizierendem Bakterium besitzt. So kann LLO eine Reihe von Wirtszellantworten auslösen, wie die Induktion der Zellproliferation, Apoptose oder Zytokinexpression und die damit verbundene Immunantwort, sowie die Beeinflussung des Zellstoffwechsels und der Signaltransduktion der Wirtszelle (Demuth *et al.*, 1994; Guzman *et al.*, 1996; Kuhn and Goebel, 1994; Nishibori *et al.*, 1996; Vazquez-Boland *et al.*, 2001; Weiglein *et al.*, 1997).

Die Phosphatidylinositol-spezifische Phospholipase C (**PI-PLC**) ist ein 33 kD schweres, sekretiertes Protein, das eine hohe Substratspezifität für Phosphatidylinositol (PI) besitzt. Es wird vom Gen *plcA* codiert, ist PrfA-reguliert (Camilli *et al.*, 1991; Leimeister-Wächter *et al.*, 1991; Mengaud *et al.*, 1991) und ist am Entkommen von *L. monocytogenes* aus dem Phagosom beteiligt. Untersuchungen an nicht-hämolytischen (*hly*<sup>-</sup>) Mutanten zeigten, dass diese in geringem Maße noch aus dem Phagosom entkommen (Portnoy *et al.*, 1988). Dies legte den Schluss nahe, dass neben LLO weitere Faktoren (z.B. PI-PLC) an der Lyse des Phagosoms beteiligt sind. Zudem konnte gezeigt werden, dass PI-PLC ein pH-Optimum zwischen 5,5 und 6,5 besitzt, was vermuten lässt, dass diese Phospholipase ähnlich wie Listeriolysin O im angesäuerten Phagosom aktiv ist (Goldfine and Wadsworth, 2002).

Der Vergleich von *plcA*- und *plcB*-Einzel- und Doppelmutanten zeigte schließlich, dass das Fehlen von PlcA nur zu einer geringen Virulenzminderung und einem leichten Rückgang beim Entkommen aus dem Phagosom führte. Die Zell-zu-Zell-Ausbreitung wurde aber nicht beeinflusst. Das Fehlen von PlcB wirkte sich dagegen in einer stärkeren Minderung der Virulenz und einer mangelhaften interzellulären Verbreitung aus, wohingegen das Entkommen aus dem primären Phagosom nicht beeinflusst wurde. Die Doppelmutante schließlich zeichnete sich durch eine stark verminderte Virulenz aus und war zudem stark beeinträchtigt beim Entkommen aus dem primären Phagosom und der Zell-zu-Zell-Ausbreitung (Marquis *et al.*, 1995; Smith *et al.*, 1995a; Vazquez-Boland *et al.*, 2001).

Somit könnte PI-PLC durch Hydrolyse membranständiger Proteine den Zugang zur phagosomalen Membran und damit die Lyse des Phagosoms durch LLO erleichtern (Sheehan *et al.*, 1994).

### **B.1.2.3 Vermehrung und Verbreitung im Zytoplasma**

Nach dem Verlassen des Phagosoms kommt es im Zytoplasma der Wirtszelle zu einer Vermehrung der Bakterien. Zudem wird das Wirtszellaktin rekrutiert und zu einem Aktinschweif geformt. Mit Hilfe dieses Aktinschweifs können sich die Bakterien intrazellulär fortbewegen und benachbarte Zellen infizieren.

Das *hpt*-Gen kodiert für den Hexosephosphat-Transporter, der signifikante Homologien zum Glucose-6-Phosphatase-Enzym-Komplex bei Säugern aufweist (Goetz *et al.*, 2001). In Säugern dient der Enzym-Komplex dem Transport von Glucose-6-Phosphat vom Zytosol in das Endoplasmatische Reticulum, wo es zur Umwandlung in Glucose kommt. Es konnte gezeigt werden, dass die zwei pathogenen Listerien-Arten *L. monocytogenes* und *L. ivanovii* in der Lage sind, Glucose-1-Phosphat zu verwerten, während die nicht-pathogenen Arten dazu nicht fähig sind. Die Glucose-1-Phosphat-Verwertung ist strikt PrfA-abhängig, wird zusammen mit den anderen Virulenzfaktoren PrfA-abhängig reguliert und steigert das

bakterielle Wachstum, ohne die Virulenzgenexpression zu reprimieren. Hepatozyten, die einen der höchsten Prozentsätze (8%-10%) an Glycogen und dessen Abbauprodukt Glucose-1-Phosphat besitzen, spielen daher eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der Listerien (Ripio *et al.*, 1997). Ein Verlust der Hpt-Produktion resultiert in einer verringerten Replikationsrate im eukaryotischen Zytosol (Goetz *et al.*, 2001).

Das Gen *actA* codiert das 67 kD schwere Protein **ActA**, das überwiegend oberflächengebunden vorliegt, aber auch im Kulturüberstand nachgewiesen werden kann. ActA ist an der Invasion eukaryotischer Wirtszellen beteiligt (siehe B.1.2.1), vor allem aber ist es als einziges listerielle Protein entscheidend für die Fortbewegungsfähigkeit der Listerien im Zytoplasma der Wirtszelle (Lambrechts *et al.*, 2008). ActA besitzt ein typisches N-terminales Signalpeptid, einen Mittelteil bestehend aus Prolin-reichen Repeats und eine hydrophobe C-terminale Region, die als Membrananker fungiert. Mindestens zwei dieser Bereiche sind essentiell für die Wirkung von ActA: Im N-terminalen Bereich findet sich eine Region, die notwendig für die Nukleation von Aktinfilamenten und die damit verbundene listerielle Fortbewegung ist. Im Mittelteil des Proteins liegt eine Prolin-reiche Repeat-Region, die direkt an VASP (vasodilator-stimulated protein) und das VASP-Homolog Mena bindet (Chakraborty *et al.*, 1992b; Dramsi *et al.*, 1993; Mandin *et al.*, 2005; Niebuhr *et al.*, 1997; Pistor *et al.*, 1994; Pistor *et al.*, 1995). Neueste Untersuchungen ergaben, dass die 5'UTR (untranslated region) von *actA* erforderlich ist für die maximale Synthese an ActA. Ist ein Schwellenwert an ActA erreicht, wird die Aktinpolymerisation unterstützt (Wong and Freitag, 2004).

ActA ist mit seiner C-terminalen Region in der bakteriellen Zellwand verankert und ragt ins Zytoplasma der Wirtszelle, wo es zu Wechselwirkungen mit Bestandteilen des Zytoskeletts kommen kann (Dramsi *et al.*, 1993; Niebuhr *et al.*, 1993). Zusätzlich zur Prolin-reichen Repeat-Region besitzt ActA Konsensussequenzen zur Phosphorylierung durch die Caseinkinase II. Es konnte auch gezeigt werden, dass ActA im Zytoplasma eukaryotischer Zellen phosphoryliert wird, genaueres ist jedoch noch nicht darüber bekannt (Brundage *et al.*, 1993). Der Mechanismus, mit dem ActA die Aktinpolymerisation induziert, konnte mittlerweile teilweise aufgeklärt werden. Sobald die Listerien aus dem Phagosom entkommen sind, werden sie von einem Saum aus zellulären Aktinfilamenten umgeben, die nach zwei Stunden zu einem kometenartigen Aktinschweif ("comet tail") reorganisiert werden (Tilney and Portnoy, 1989). Das Oberflächenprotein ActA ist hierbei der einzige listerielle Faktor, der für die Rekrutierung von Aktinfilamenten der Wirtszelle benötigt wird (Pistor *et al.*, 1994). Untersuchungen an *actA*-Mutanten haben gezeigt, dass diese nicht mehr zur Anhäufung von Wirtzellaktin auf der Bakterienoberfläche befähigt sind (Dramsi *et al.*, 1993). Weitere Versuche zeigten, dass ActA essentiell für die Aktin-vermittelte Fortbewegung der Bakterien ist (Vazquez-Boland *et al.*, 2001). ActA befindet sich vor allem an einem Zellpol. Hier findet eine kontinuierliche Einlagerung von Aktinmonomeren statt und der sich bildende Aktinschweif drückt das Bakterium mit bis zu 1,5  $\mu\text{m/s}$  in Richtung des ActA-freien Zellpols vorwärts (Dabiri *et al.*, 1990; Dramsi *et al.*, 1993; Mounier *et al.*, 1990; Sanger *et al.*, 1992; Smith *et al.*, 1995b; Theriot *et al.*, 1992). Bisher ist noch nicht vollständig geklärt, ob ActA die Aktinpolymerisation durch direkte Interaktion mit dem Wirtzellaktin bewirkt oder indirekt über einen zellulären Nukleator, denn Bindung von ActA an globuläres (G-) Aktin konnte nur in einigen Untersuchungen nachgewiesen werden. Seither wurde eine Reihe Aktin-bindender Wirtzellproteine identifiziert, die mit dem Listerien-induzierten Aktinschweif assoziiert sind. Hierzu zählen unter anderem Fimbrin, Tropomyosin, Filamin

und Arp2/3. Experimente zeigten, dass der N-Terminus von ActA mit dem Arp2/3-Komplex interagiert, was zu einer deutlichen Verstärkung der Aktinnukleation führt. Dieser Komplex ist der bis jetzt einzig bekannte essentielle Faktor der Wirtszelle, der für die Aktin-vermittelte Fortbewegung der Listerien benötigt wird (Loisel *et al.*, 1999; Vazquez-Boland *et al.*, 2001; Welch *et al.*, 1998; Zalevsky *et al.*, 2001). Zudem ermöglicht ActA Listerien die Überquerung der fetalen Plazentamembran (Le Monnier *et al.*, 2007).

#### **B.1.2.4 Zell-zu-Zell-Ausbreitung**

Durch Aktinpolymerisation und Ausbildung eines Aktinschweifs können sich Listerien im Zytoplasma der Wirtszelle fortbewegen und von Zelle zu Zelle ausbreiten. Gelangen sie an die Peripherie der Wirtszelle, werden sie über pseudopodienartige Ausstülpungen von der Nachbarzelle endozytiert und gelangen so in eine neue Wirtszelle. Hier sind die Bakterien jedoch noch von einer Doppelmembran umgeben. Nach Lyse dieser zwei Membranen entkommen die Listerien wieder in das Zytoplasma und können einen neuen Vermehrungs- und Verbreitungszyklus beginnen.

Die **Lecithinase** ist eine weitere Phospholipase C von *L. monocytogenes*. Das *plcB*-Gen codiert ein 33 kD schweres Proenzym (inaktive Form). Die PC-PLC von *L. monocytogenes* besitzt ein breites Wirkungsspektrum und hydrolysiert nicht nur Phosphatidylcholin (Lecithin), sondern auch Phosphatidylserin (PS), Phosphatidyl-ethanolamin (PE) und in geringem Maße Sphingomyelin. Phosphatidylinositol (PI) wird allerdings nicht oder nur sehr schwach hydrolysiert. Die Lecithinase ist Zink-abhängig und über einen weiten pH-Bereich (pH 5,5 - 8,0) aktiv (Geoffroy *et al.*, 1991; Goldfine and Wadsworth, 2002; Vazquez-Boland *et al.*, 1992). Das Enzym wird als inaktives Proenzym (33 kD) sekretiert, um Schäden an bakteriellen Membranen zu vermeiden. Durch die listerielle Metalloprotease wird die Lecithinase dann in die aktive Form (29 kD) überführt (Geoffroy *et al.*, 1991; Poyart *et al.*, 1993). Untersuchungen an Insertionsmutanten im *plcB*-Gen zeigten, dass diese Mutanten in ihrer Virulenz verringert waren und sich nicht mehr in benachbarte Zellen ausbreiten konnten. Es konnte nach einer Infektion eine Anhäufung von Bakterien in Vesikeln mit Doppelmembran beobachtet werden. Beim eventuellen Entkommen aus dem primären Phagosom waren sie allerdings nicht vom Wildtyp zu unterscheiden (Smith *et al.*, 1995a). Die Lecithinase scheint also hauptsächlich für eine effiziente Lyse des sekundären Phagosoms wichtig zu sein und ist mit verantwortlich, dass sich Listerien über die Zellgrenzen hinaus effektiv ausbreiten und vermehren können.

Produkt des *mpl*-Gens ist die Zink-abhängige **Metalloprotease** von *L. monocytogenes*, ein 57,4 kD schweres Enzym mit einer N-terminalen Signalsequenz und großer Homologie zu sekretierten Metalloproteasen anderer Bakterien. Im Kulturüberstand findet man ein 60 kD großes *mpl*-Produkt, das wahrscheinlich eine inaktive Proform der Protease darstellt (Mengaud *et al.*, 1991). Mutanten mit Transposoninsertion im *mpl*-Gen waren durch eine reduzierte Virulenz und eine geringere Lecithinaseproduktion gekennzeichnet. Im Kulturüberstand dieser Bakterien fand man nur noch die 33 kD-Proform des Lecithinasepolypeptids. Diese Beobachtung legte die Vermutung nahe, dass die Metalloprotease für die Reifung der PC-PLC benötigt wird und diese erst nach proteolytischer Spaltung der inaktiven 33 kD-Form in das aktive 29 kD-Enzym überführt. Diese Annahme konnte durch Komplementationsstudien bestätigt werden (Poyart *et al.*, 1993; Raveneau *et al.*, 1992). So ist die Zn-abhängige Metalloprotease zumindest durch ihre Wirkung auf die Lecithinase an der Virulenz von *L. monocytogenes* beteiligt.

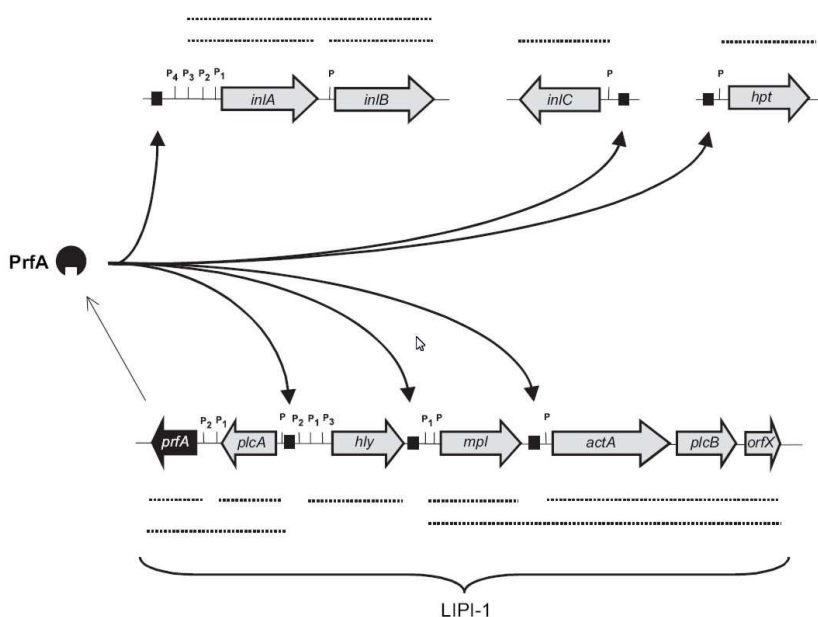


### B.1.3 Genetische Organisation der Virulenzfaktoren von *L. monocytogenes*

Für die erfolgreiche Invasion, das Überleben innerhalb der eukaryotischen Wirtszelle und die Ausbreitung im infizierten Organismus benötigt *L. monocytogenes* die zuvor beschriebenen Virulenzfaktoren, welche größtenteils in einem Virulenzgencluster angeordnet sind (Portnoy *et al.*, 1992). Die koordinierte Expression der meisten dieser Virulenz-assoziierten Gene wird durch den positiven Regulationsfaktor A (PrfA) kontrolliert, der selbst Bestandteil des Clusters ist (Chakraborty *et al.*, 1992a). Da dieses Virulenzgencluster Merkmale einer Pathogenitätsinsel aufweist wird es als *Listeria* Pathogenitätsinsel 1 (LIPI-1) bezeichnet (Kreft *et al.*, 2002). Die meisten Virulenzgene von *L. monocytogenes* befinden sich in dieser 9,6 kb großen, chromosomalen Region. LIPI-1 besteht neben dem Gen *hly* aus dem *plcA-prfA*-Operon und dem 5,7 kb großen Lecithinase-Operon, das die Gene *mpl*, *actA* und *plcB* sowie zwei weitere offene Leseraster (ORFX und Z) unbekannter Funktion enthält (Mengaud *et al.*, 1991; Vazquez-Boland *et al.*, 1992). Das Virulenzgencluster ist zwischen den beiden Genen *prs* und *ldh* (kodieren für Phosphoribosyl-Pyrophosphat-Synthetase bzw. Laktatdehydrogenase) lokalisiert und in den pathogenen Arten *L. monocytogenes*, *L. ivanovii* und dem apathogenen *L. seeligeri* zu finden (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). 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).

Neben den im Virulenzgencluster befindlichen Genen werden noch weitere listerielle Virulenzgene durch PrfA reguliert. Hierzu zählen unter anderem die Internalingene *inlA*, *inlB* und *inlC*, die jedoch in anderen Bereichen des Chromosoms liegen. Sowie die Gene für den Hexosephosphat-Transporter *hpt* (Goetz *et al.*, 2001) und die Gallensalz-Hydrolase *bsh* (Dussurget *et al.*, 2002).

Die PrfA-kontrollierten Gene sind wie in Abbildung 3 gezeigt transkriptionell organisiert (Chakraborty *et al.*, 1992a; Mengaud *et al.*, 1991; Scortti *et al.*, 2007): Die Transkription von



**Abbildung 3:** Transkriptionelle Organisation der PrfA-abhängigen Virulenzgene in *L. monocytogenes*.

Die dicken Pfeile stellen die Virulenzgene dar. Über den jeweiligen Genen sind die zugehörigen Transkripte als dünne Striche gezeigt; ■ beschreibt die transkriptionelle Induktion durch PrfA und P alle bekannten Promotoren (Scortti *et al.*, 2007).

*plcA* erfolgt entweder monocistronisch oder zusammen mit *prfA* bicistronisch. *prfA* selbst kann zudem monocistronisch von den zwei upstream liegenden Promotoren *prfAp<sub>1</sub>* und *prfAp<sub>2</sub>* transkribiert werden, wobei die Transkription von *prfAp<sub>2</sub>* sigB abhängig gestartet wird (Nadon *et al.*, 2002). Das Gen *hly* wird von zwei PrfA-abhängigen Promotoren in monocistronische mRNA überführt. Es existiert aber auch ein PrfA-unabhängiger Promotor, der zur Produktion geringer Mengen an *hly*-Transkript führt (Domann *et al.*, 1993). Die Gene des Lecithinase-Operons (*mpl*, *actA*, *plcB*, ORFX und Z) werden gemeinsam und in gleicher Richtung wie *hly* transkribiert. Neben der polycistronischen mRNA unter Kontrolle des *mpl*-Promotors findet man jedoch auch ein monocistronisches *mpl*-Transkript und eine bicistronische mRNA für *actA* und *plcB* (Bohne *et al.*, 1994; Freitag *et al.*, 1992). Die Gene für die großen Internaline A und B sind in einem Operon organisiert, das außerhalb des Virulenzgenclusters liegt. Ihre Transkription erfolgt in Form von monocistronischer *inlA*- und bicistronischer *inlA/B*-mRNA über mehrere Promotoren, die nur zum Teil PrfA-abhängig sind. Zudem wird die Transkription durch die Wachstumstemperatur und -phase, sowie das Wachstumsmedium (BHI bzw. MEM) reguliert (Dramsı *et al.*, 1993; Engelbrecht *et al.*, 1996; Lingnau *et al.*, 1995). Das Gen für das kleine Internalin *inlC* wird als monocistronische mRNA von einem PrfA-abhängigen Promotor und möglicherweise auch PrfA-unabhängig transkribiert (Engelbrecht *et al.*, 1996).

## B.2 Der zentrale Virulenzgenregulator PrfA

Als Antwort auf eine sich verändernde Umwelt, ist differentielle Genregulation für einen Organismus wichtig, um seine Ressourcen effektiv einsetzen zu können. Für *L. monocytogenes* ist der positive Regulationsfaktor A (PrfA) als zentraler Regulator der Virulenzgene in der Pathogenese von entscheidender Bedeutung (Gray *et al.*, 2006), denn eine PrfA-negative Mutante zeigt keine Expression der LIPI-1 Gene und ist avirulent (Chakraborty *et al.*, 1992b). VirR ist ebenfalls ein Regulationsfaktors in *L. monocytogenes*, jedoch bei weitem nicht so bedeutend wie PrfA, der zentrale Regulationsfaktor der Virulenzgene (Kreft and Vázquez-Boland, 2001; Leimeister-Wächter *et al.*, 1990; Mandin *et al.*, 2005).

Sowohl in Struktur als auch Funktion zeigt PrfA große Ähnlichkeiten mit Proteinen der Crp/Fnr-Familie (Lampidis *et al.*, 1994) und ist damit eines von wenigen bekannten Mitgliedern dieser Familie in Gram-positiven Bakterien. Diese Proteinfamilie von DNA bindenden Transkriptionsregulatoren hat ihren Namen vom cAMP-Rezeptor-Protein (Crp) 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 and Guest, 1990). Die meisten Vertreter dieser Proteinfamilie sind positiv regulierende Faktoren. Charakteristisch sind eine N-terminale Nukleotid-Bindungsdomäne und ein C-terminales HTH-Motiv, das für die Bindung an die Ziel-DNA verantwortlich ist. Mit Hilfe der Crp-Fnr Regulatoren können Bakterien auf eine große Auswahl von Signalen und Umweltreizen reagieren (Körner *et al.*, 2003).

### B.2.1 Crp

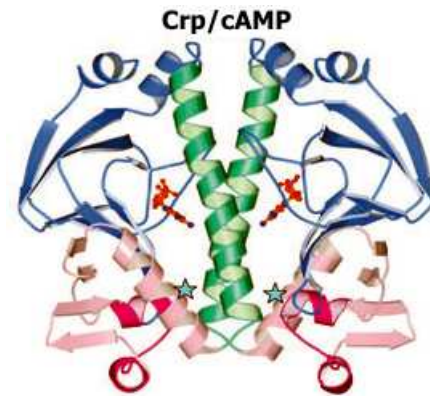
Crp stellt den Prototyp aller Transkriptionsfaktoren der Crp/Fnr-Familie dar und dient daher als Vergleichsprotein zu PrfA. In *E. coli* und anderen Gram-negativen Bakterien ist Crp der Hauptregulator in der Kohlenstoff-Katabolitrepression (CCR). Crp aktiviert die Translation an Promotoren von über 100 verschiedenen Operons und ermöglicht es den Bakterien so bei

Glucosemangel alternative Kohlenstoffquellen zu nutzen, wie z.B. Lactose oder Galactose. Crp liegt als 47 kDa schweres Homodimer aus jeweils 209 Aminosäureresten vor (Hogema *et al.*, 1998) und bindet nach Anstieg des intrazellulären cAMP-Spiegels im N-terminalen Bereich zwei Moleküle cAMP. Der N-terminale Bereich von Crp formt eine Reihe von  $\beta$ -Faltblättern aus, die durch konservierte Glycinreste voneinander getrennt sind, sowie eine alpha-helikale Region. Das DNA-Bindungsmotiv von Crp liegt im C-terminalen Bereich, der ein Helix-turn-Helix-Motiv ausbildet und hat eine hohe Spezifität für seine DNA-Zielsequenz, ein 22 bp langes Palindrom (Kreft and Vazquez-Boland, 2001). Die N- und C-terminale Domäne sind über eine als Gelenk fungierende Region (AS 134 bis 138) verbunden (Beckerling *et al.*, 2002; Harman, 2001). Die Bindung von cAMP an Crp führt im N-terminalen Teil des Proteins zu einer Konformationsänderung, die in den C-terminalen Teil weitergeleitet wird, und dort die DNA-Spezifität abhängig von der Konzentration an cAMP in drei Phasen durch Verschiebung der  $\alpha$ -Helix F verändert. Für eine effiziente Transkriptionsaktivierung ist zudem der Kontakt mit der RNA-Polymerase nötig, der durch die Aktivierungsregionen AR1-3 vermittelt wird (Schnupf *et al.*, 2007). Crp kann unter bestimmten Umständen auch als negativer Regulator fungieren, indem es die Bindung der RNA-Polymerase blockiert (Kolb *et al.*, 1993).

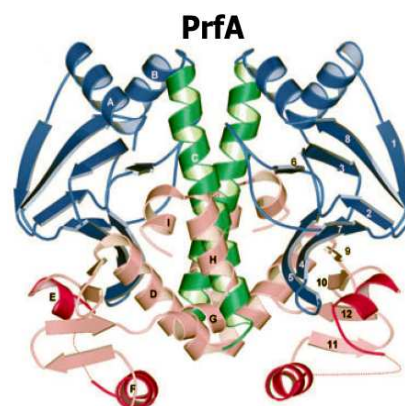
Crp-abhängige Promotoren können in drei Klassen eingeteilt werden. Bei Promotoren der Klasse I (z.B. P1 des *lac*-Gens in *E. coli*) liegt die Bindungsstelle für Crp upstream der RNA-Polymerase-Bindungsstelle. Bei Klasse II Promotoren (wie z.B. P1 von *gal*) überlappt die Bindestelle für Crp mit der -35 Region, wodurch Crp in engen Kontakt mit der RNA-Polymerase kommt. Klasse III Promotoren (z.B. der von *malK*) benötigen neben Crp zusätzliche Aktivatoren und die Bindungsstelle von Crp ist recht variabel (Busby and Ebright, 1999).

### B.2.2 PrfA

Der Transkriptionsaktivator PrfA hat ein Molekulargewicht von 27 kD (237 Aminosäuren) und zeigt sowohl strukturelle, als auch funktionelle Ähnlichkeiten mit Crp, obwohl ein Aminosäure-sequenzvergleich nur 20% Übereinstimmung zeigt (Lampidis *et al.*, 1994). Ein Vergleich der DNA-Sequenz zeigt zu 35% eine gleiche Basenfolge (Kreft and Vazquez-Boland, 2001). PrfA besitzt wie Crp im N-terminalen Bereich kurze  $\beta$ -Faltblattstrukturen mit Glycinresten, wobei einige der AS, die für die Bindung von cAMP an Crp benötigt werden in PrfA nicht konserviert sind. Auch



**Abbildung 4** Struktur von Crp und Position von cAMP (PDB-ID: 1G6N) cAMP-Molekül als Ball&Stick Modell (modifiziert nach Eiting *et al.*, 2005).



**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).

in PrfA ist das C-terminale HTH-Motiv für die Bindung an die DNA wichtig (Sheehan *et al.*, 1996), wobei dieses eine zusätzliche Aminosäure im Turn aufweist (Lampidis *et al.*, 1994). Ebenso erkennt PrfA als Homodimer eine palindromische Sequenz, die so genannte PrfA-Box. Diese 14 bp lange Sequenz mit der Konsensussequenz TTAACA NN TGTTAA (N ist normalerweise A oder T) überschneidet sich mit der -35 Region. Für die Bindung von PrfA an diese Sequenz sind *in vitro* keine zusätzlichen Faktoren nötig (Dickneite *et al.*, 1998; Mengaud *et al.*, 1989). Zwei der drei Aktivierungsregionen, die bei Crp die Bindung an die RNA-Polymerase vermitteln, sind in PrfA ebenfalls konserviert (AS 58-62 und AS 156-164) (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 Leucin-Zipper Region am C-Terminus. Die genaue Funktion der Struktur ist noch nicht geklärt, doch Mutationen im Bereich des Leucin-Zippers und des HTH-Motivs führen dazu, dass PrfA nicht mehr in der Lage ist an die DNA zu binden. Mutationen im  $\beta$ -Faltblatt-Bereich verhindern eine stabile Bindung an die RNA-Polymerase (Herler *et al.*, 2001).

### B.2.2.1 *prfA*- Mutationen

Es sind verschiedene Punktmutationen in *prfA* beschrieben worden, die meist für konstitutiv aktive PrfA\* Proteine codieren. Diese reagieren oft nicht mehr auf bestimmte Umweltreize (Shetron-Rama *et al.*, 2003; Vega *et al.*, 2004a; Wong and Freitag, 2004).

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. Nach den Mutationen R188I und A218PLN\* (das Stopcodon führt zum Verlust der C-terminalen 17 AS) zeigt PrfA keine DNA-Bindung mehr (Herler *et al.*, 2001). Analog der Mutation A144T in der D-Helix von Crp, 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 and Adhya, 1985; Ripio *et al.*, 1997). In Gelretardationsexperimenten wurde belegt, dass diese G145S PrfA\*-Form wesentlich effizienter an die DNA bindet als das normale PrfA (Vega *et al.*, 1998). Ebenfalls zu einer konstitutiven Überexpression von *prfA* führen Leu140Phe und Ile45Ser (Vega *et al.*, 2004b). Aufgrund der erhöhten *hpt* Expression können PrfA\*-Mutanten im Gegensatz zu PrfA-Stämmen Glucose-1-Phosphat sehr gut als Kohlenstoffquelle verwenden, welche vom Hexosephosphat-Transporter in die Zelle aufgenommen wird (Ripio *et al.*, 1997).

### B.2.3 PrfA-abhängige Promotoren

Durch *in vitro* Transkriptionsstudien konnten wichtige Eigenschaften eines PrfA-abhängigen Promotors definiert werden (Lalic-Mülthaler *et al.*, 2001; Luo *et al.*, 2004). PrfA-abhängige Promotoren besitzen in ihrem Promotorbereich eine PrfA-Box: eine konservierte, palindromische, 14 bp große Bindungsstelle für PrfA. Zusätzlich findet man eine SigA-abhängige -10 Box, die 22 (23) bp von der PrfA-Box entfernt ist. Zur Initiation der Transkription werden hohe Konzentrationen an ATP und GTP benötigt, der Transkriptionsstart ist G oder A. Aus *E. coli* aufgereinigtes PrfA aktiviert die Initiation der Transkription an PrfA-abhängigen Promotoren ohne zusätzliche Faktoren.

PrfA bindet vermutlich als Dimer an die palindromische PrfA-Box (5'-TTAACA NN TGTTAA-3'), die sich in der -35-Region des Promotors der PrfA-abhängigen Virulenzgene befindet (Freitag *et al.*, 1993). Die Sequenzen der PrfA-Boxen in den einzelnen

Promotorbereichen der Virulenzgene unterscheiden sich leicht (siehe Tabelle 1). Die PrfA-Boxen der Gene *hly* und *plcA* entsprechen der oben beschriebenen Konsensussequenz. Dagegen zeigen die PrfA-Boxen der Gene *actA*, *inlC*, *mpl* und *hpt* einen, bei *inlA* gibt es zwei Basenaustausche. Eine weitere, stark degenerierte PrfA-Box mit 3 Basenaustauschen befindet sich im Bereich des Promotors P2 von *prfA* (Lampidis *et al.*, 1994). Das Gen *plcB* besitzt keine PrfA-Box, wird aber mit *mpl/actA* cotranskribiert und ist somit PrfA-abhängig.

Gen	PrfA-Box	Basenaustausche	-10-Box
<i>prfA</i>	aTAACAATTGTTgt	3	TATTTT
<i>plcA</i>	TTAACAAATGTTAA	0	TAAGAT
<i>hly</i>	TTAACATTTGTTAA	0	TAGAAT
<i>mpl</i>	TTAACAAATGTaAA	1	TATAAT
<i>actA</i>	TTAACAAATGTTAg	1	GATAAT
<i>plcB</i>	cotranskribiert mit <i>mpl/actA</i>		-
<i>inlA</i>	aTAACATAaGTTAA	2	TATTAT
<i>inlC</i>	TTAACgCTTGTTAA	1	TAACAT
<i>hpt</i>	aTAACAAGTGTTAA	1	TATATT

**Tabelle 1** Promotorregion der PrfA-regulierten Virulenzgene in *L. monocytogenes* (Glaser *et al.*, 2001; Goetz *et al.*, 2001; Kreft and Vazquez-Boland, 2001) Abweichungen von der Konsensussequenz der PrfA-Box sind mit kleinen Buchstaben dargestellt.

Durch Bindung an diese Zielsequenz und direkte Interaktion mit der RNA-Polymerase aktiviert PrfA die Virulenzgenexpression. Dabei wird die Bindungsaffinität von PrfA durch die Konsensussequenz der PrfA-Box beeinflusst und ist umso größer, je genauer das Palindrom mit der oben angegebenen DNA-Sequenz übereinstimmt. So kann durch die unterschiedliche Bindungsaffinität von PrfA eine zeitliche Aktivierung von Virulenzgenen erfolgen. Gene mit hoher Affinität der Promotoren (z.B. *hly* und *plcA*) werden schon bei niedriger PrfA-Konzentration aktiviert, Promotoren mit geringerer Affinität (z.B. *mpl* und *actA*) benötigen jedoch eine größere Menge an PrfA (Bohne *et al.*, 1994; Sheehan *et al.*, 1995).

## B.2.4 Regulation der PrfA-Aktivität

Die Aktivität von PrfA und die Expression der PrfA-abhängigen (Virulenz)Gene, wird zum einen von der PrfA-Konzentration und zum anderen von der spezifischen Aktivität des PrfA-Proteins bestimmt.

Die Expression der Virulenzgene von *L. monocytogenes* ist beim Wachstum in der Natur (saprophytische Lebensweise) nicht essentiell und eine Transkription dieser Gene wird erst bei Infektion eines geeigneten Wirts nötig. Daher besitzt *L. monocytogenes* Mechanismen, um die Genexpression den gegebenen Umweltbedingungen anzupassen. Ein Modell, wie die Regulation über PrfA ablaufen könnte (Kreft and Vazquez-Boland, 2001) geht davon aus, dass PrfA in zwei Zuständen vorliegt (funktionell inaktiv und aktiv) und von dem einen in den anderen Zustand durch Bindung eines bisher unbekanntes Kofaktors überführt werden kann. Dieser Kofaktor scheint die aus der Umwelt erhaltenen Signale zu übermitteln und so die Regulation der Virulenzgene über PrfA zu beeinflussen (Ripio *et al.*, 1997; Vazquez-Boland *et al.*, 2001). Liegt kein Kofaktor vor, ist PrfA inaktiv und wird über die konstitutiven Promotoren P1 und P2 in der intergenischen Region zwischen *plcA* und *prfA* schwach

transkribiert, es ist also nur eine geringe Menge an PrfA-Protein vorhanden. Erhält *L. monocytogenes* nun ein Signal aus der Umwelt, steigt die Konzentration an intrazellulärem Kofaktor und führt zu einer Aktivierung von PrfA. PrfA kann nun mit erhöhter Affinität an die PrfA-Boxen binden und induziert die Transkription der PrfA-abhängigen Virulenzgene. Zudem wird mittels des nun vermehrt gebildeten bicistronischen *plcA-prfA*-Transkripts durch positive Autoregulation auch mehr PrfA-Protein produziert, das wiederum die Synthese der Virulenzgene verstärkt. Diese Transkriptionsaktivierung findet statt so lange der Kofaktor im bakteriellen Zytoplasma vorhanden ist, kann aber schnell inaktiviert werden, wenn die geeigneten Umweltsignale fehlen (Renzoni *et al.*, 1999). Passend zu den konservierten palindromischen Sequenzen werden als erstes *hly* und *plcA* translatiert, die PrfA-abhängigen Virulenzproteine, die bei der Infektion als erstes benötigt werden. 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 and 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.

Nach einem anderen Model besteht auch die Möglichkeit, dass unter nicht-induzierenden Bedingungen das wildtypische PrfA durch die Bindung eines hypothetischen Faktors in einer inaktiven Form gehalten wird. Diesen hypothetischen Faktor gilt es noch zu identifizieren (Kreft and Vazquez-Boland, 2001; Milenbachs-Lukowiak *et al.*, 2004). Auch *in vitro* Transkriptionsstudien deuten auf diese Annahme hin, denn das in der *in vitro* Transkription eingesetzte, aus *E. coli* isolierte rekombinante PrfA benötigt keine weiteren Faktoren, liegt also schon in der aktiven Form vor (Lalic-Mülthaler *et al.*, 2001; Luo *et al.*, 2004). Bei Versuchen mit Aktivkohle behandeltem BHI wurde ein von *L. monocytogenes* sekretierter Autorepressor entdeckt, der die Aktivität von PrfA inhibiert. Leider fehlen hierzu noch genauere Studien (Ermolaeva *et al.*, 2004).

Verschiedene Umweltfaktoren können die Transkription von *prfA* und den PrfA-abhängigen Virulenzgenen beeinflussen: Ein Temperatur-Shift von 30°C (Temperatur in der Natur) auf 37°C (Körpertemperatur eines Warmblüters) resultiert in einem Anstieg des bicistronischen *plcA/prfA*-Transkripts und führt somit zu Expression der Virulenzgene. Bei 20°C wird nur noch das monocistronische PrfA-Transkript gebildet (Chakraborty *et al.*, 1992b), jedoch kein PrfA translatiert (Renzoni *et al.*, 1997). Es konnte zudem gezeigt werden, dass die PrfA-Synthese auf mRNA-Ebene durch einen Thermosensor beeinflusst wird: Die nicht-transkribierte 5'-Region der mRNA, die vom Promotor P1 startet, kann eine Sekundärstruktur ausbilden, die die Translation des *prfA*-Transkripts stark beeinflusst. Bei Temperaturen unter 30°C findet keine Translation dieses Transkripts statt, wohingegen PrfA bei 37°C translatiert wird (Johansson *et al.*, 2002).

Die Menge und Aktivität von Listeriolysin ist ein wichtiger Marker für die Aktivität von PrfA. Eine Erniedrigung des pH-Wertes auf 5 bis 6 führt zu einer Verringerung der LLO-Produktion (Datta and Kothary, 1993). Hitze-, oxidativer, sowie osmotischer Stress bewirken jedoch das Gegenteil (Myers *et al.*, 1993; Sokolovic and Goebel, 1989; Sokolovic *et al.*, 1990). Auch ein Mangel an Eisen im Medium bewirkt eine verstärkte LLO-Synthese (Coward

and 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).

Ein entscheidendes Signal für die Virulenzgenexpression scheinen Kohlenstoffquellen wie Cellobiose oder Einfachzucker wie Glucose, Fructose und Mannose zu sein, in deren Gegenwart (in verstoffwechselbaren Konzentrationen) eine Repression der Virulenzgenexpression in *L. monocytogenes* hervorgerufen wird (Milenbachs *et al.*, 1997). Die Transkription von *plcA* und *hly* wird durch das Vorhandensein von Cellobiose im Medium reprimiert (Brehm *et al.*, 1999; Gilbreth *et al.*, 2004), wobei jedoch die Menge an PrfA konstant bleibt, was auf die Regulation der spezifischen Aktivität durch einen unbekanntem Faktor hindeutet (Renzoni *et al.*, 1997). Es konnte gezeigt werden, dass die Virulenzgenregulation durch Cellobiose in einer *gcr-csr*-Doppelmutante komplett außer Kraft gesetzt ist, in Einzelmutanten jedoch nur reduziert. Offenbar existieren also zwei unabhängige Wege für die Cellobiose-abhängige Repression der Virulenzgene. Man nimmt an, dass die *bvr*- und *csr*- Genprodukte zusammen direkt auf den Cellulose-spezifischen Mechanismus wirken und *gcr* einen allgemeinen regulatorischen Mechanismus bewirkt, jedoch beide Auswirkungen auf die In-/aktivierung von PrfA besitzen (Milenbachs-Lukowiak *et al.*, 2004).

Die Aktivität von PrfA wird also, bedingt durch unterschiedliche Umweltbedingungen, sowohl auf transkriptioneller Ebene als auch durch posttranskriptionelle Mechanismen kontrolliert. Von besonderer Bedeutung ist hierbei die Anwesenheit bestimmter Kohlenstoffquellen wie Glucose, Mannose oder Cellobiose. Zum besseren Verständnis dieses Zusammenhangs wird im nächsten Abschnitt der allgemeine bakterielle Kohlenstoff-Metabolismus näher betrachtet.

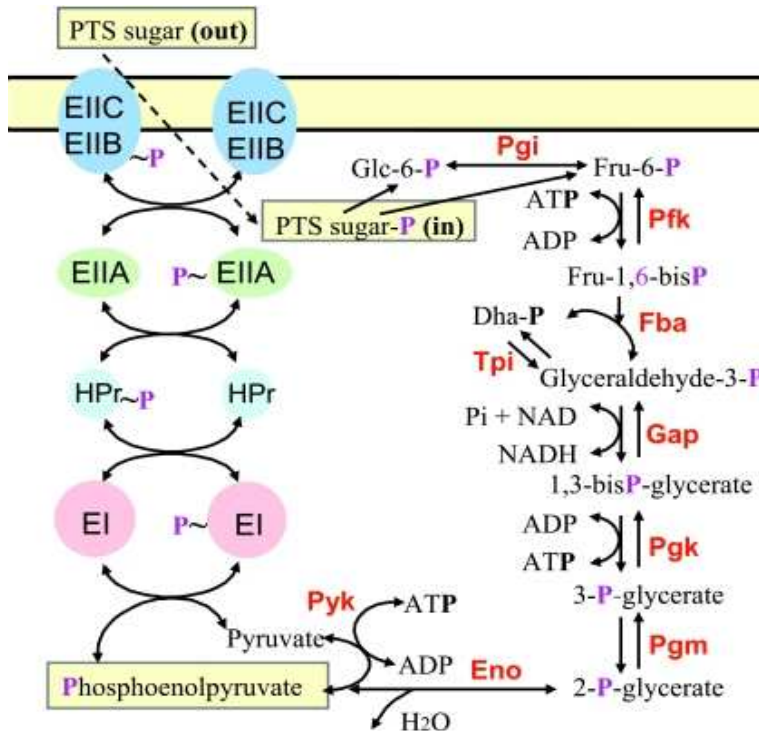
## **B.3 Metabolismus**

Bakterien sind in der Lage verschiedenste Kohlenstoffquellen Energiequelle und zur Generierung von Biomasse zu nutzen. Die Gene und Operons, welche für die in den Transport und Abbau dieser Kohlenstoffquellen involvierten Enzyme codieren werden in den meisten Fällen nur exprimiert, wenn zum einen das korrespondierende Kohlenhydrat im Medium präsent ist und zum anderen eine bevorzugtere Kohlenstoffquelle im Medium nicht vorhanden ist. Die regulatorischen Mechanismen werden als Kohlenstoff-Katabolit-Repression (CCR) bezeichnet (Stülke *et al.*, 1998).

### **B.3.1 Das Phosphoenolpyruvat-Phosphotransferase-System (PEP-PTS)**

Die CCR ist intensiv bei Gram-negativen und Gram-positiven Bakterien untersucht worden. In allen bisher untersuchten Bakterien ist das Phosphoenolpyruvat-Phosphotransferase-System (PTS), welches eine Vielzahl von Zuckern transportiert und dabei phosphoryliert, in die CCR involviert. Die substratspezifische Induktion kataboler Gene ist also anhängig von der Fähigkeit des spezifischen Regulators die Anwesenheit des Substrats zu überwachen. Die Zucker-spezifische PTS-Permease, deren Gene von PRD-enthaltenden Regulatoren kontrolliert werden, transferiert die Informationen der Substratverfügbarkeit auf den Regulator. Die PTS-Permeasen bestehen aus drei oder vier Domänen, von denen zwei (EIIA und EIIB) den Phosphattransfer von HPr-His-P über EIIC (und manchmal auch EIID) auf den Zucker übermitteln (Postma *et al.*, 1993).

Das Phosphotransferasesystem (PTS) wurde in *E. coli* als Mechanismus entdeckt, welcher Phosphoenolpyruvat (PEP) nutzt um Hexosen wie Glucose und Mannose in die bakterielle Zelle zu transportieren (Kundig *et al.*, 1964). Weitere Untersuchungen zeigten, dass die PTS eine Familie von Transportsystemen sind, welche die Aufnahme einer Vielzahl von Kohlenstoffquellen bewirken. Die Grundstruktur der PTS ist in allen bisher untersuchten Spezies gleich und besteht aus den zwei zytoplasmatischen Komponenten Enzym I (EI) und



**Abbildung 6:** Der Zusammenhang zwischen PEP-PTS<sup>Glc</sup> und der Glycolyse in *E. coli*

In der Glycolyse werden gewöhnlich zwei Moleküle PEP gebildet, von denen eines genutzt wird ein neues Zuckermolekül in die Zelle zu schleusen. PEP überträgt ~P auf EI, welches HPr phosphoryliert. HPr übergibt ~P an EIIA, welches EIIB phosphoryliert und EIIB überträgt ~P auf das von EIIIC eingeschleuste Glucosemolekül. G6P geht nun direkt in die Glycolyse über.

Pgi (Glucosephosphatisomerase), Pfk (Phosphofruktokinase), Fba (Fructose-1,6-Bisphosphat Aldolase), Tpi (Triosephosphat Isomerase), Gap (Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase), Pkg (Phosphoglyceratkinase), Pgm (Phosphoglyceratmutase), Eno (Enolase), Pyk (Pyruvatkinase) (Deutscher *et al.*, 2006).

HPr, sowie aus einem kohlenhydratspezifischen Enzym II (EII) Komplex. Jeder EII-Komplex besteht aus einer oder zwei integralen Membrandomänen (EIIIC und D) und zwei hydrophilen Domänen (EIIA und B), welche für den Transport von Kohlenhydraten durch die bakterielle Membran und deren Phosphorylierung zuständig sind.

Abbildung 6 zeigt schematisch die Phosphoenolpyruvat vermittelte Glucoseaufnahme über Phosphotransferasesysteme und die Weiterleitung von Glucose-6-Phosphat (G6P) in die Glycolyse.

Enzym I des PEP-PTS wird in *E. coli* vom Gen *ptsI* codiert, das in *L. monocytogenes* Lmo1003 entspricht. Nach einem kürzlich aufgestellten Modell (Marquez *et al.*, 2006) befindet sich am C-Terminus die PEP-Bindungsstelle und diese Region ist wichtig für die Dimerisierung. EI wird als Dimer von einem der zwei aus der Glycolyse stammenden Moleküle PEP phosphoryliert. Am N-Terminus des EI befindet sich die HPr-Bindungsstelle und auch der hoch konservierte Histidinrest, von dem aus die Phosphatgruppe auf HPr übertragen wird.

Das hitzestabile Protein HPr wird von *ptsH* codiert und ist besonders an der N-terminalen aktiven Histidin-Phosphorylierungsstelle His-15 hoch konserviert (Powers and Roseman, 1984). HPr wird an der N-1 Position des Imidazolrings von His-15 phosphoryliert. Die Interaktion von HPr mit EI und EIIA<sup>Glc</sup> erfordert keine großen Konformationsänderungen in den Domänen der PTS Bindungspartner (Wang *et al.*, 2000). In den meisten Gram-positiven Bakterien mit niedrigem G-C-Gehalt, und auch in einigen Gram-negativen, kann HPr auch ATP-abhängig am Ser-46 phosphoryliert werden. Dies ist wichtig für die regulatorische



Funktion von HPr und kein Teil des Phosphatgruppentransfers auf Kohlenhydrate, verlangsamt aber den Phosphattransfer vom EI auf HPr.

Der Glucose-spezifische EII Komplex (EII<sup>Glc</sup>) von *E. coli* besteht aus zwei getrennten Proteinen, dem zytoplasmatischen EIIA<sup>Glc</sup> (von *crr* codiert) und dem membrangebundenen Protein EIICB<sup>Glc</sup> (von *ptsG* codiert), wobei die hydrophile EIIB Komponente in Kontakt mit dem Zytoplasma steht. Das EIIA Protein empfängt an einem Histidin-Rest die Phosphatgruppe vom HPr und überträgt diese auf ein Cystein oder ein Histidin (Mannose-Familie) des EIIB. Vom EIIB wird die Phosphatgruppe auf den Zucker übertragen, welcher zuvor die EIIC Komponente (mit EIID bei Mannose) passiert hat und auf der zytoplasmatischen Seite der Membran erscheint. Als Glucose-6-Phosphat geht die Glucose direkt in die Glycolyse über (Postma *et al.*, 1993; Robillard and Broos, 1999; Siebold *et al.*, 2001).

HPr phosphoryliert auf diese Weise alle EIAs, für die Zuckerspezifität der PTS sind somit die EII-Proteine verantwortlich, welche aus verschiedenen oder einem Multidomänprotein bestehen. Die PTS werden auf Grund der Phylogenie der EIICs nach Barabote und Saier (2005) in sieben verschiedene Familien eingeteilt: (i) Glucose (inclusive der Glucoside), (ii) Fructose (mit Mannitol), (iii) Lactose (mit N,N-Diacetylchitobiose), (iv) Galactitol, (v) Glucitol, (vi) Mannose und (vii) L-Ascorbat. Diese wenigen Familien transportieren eine große Anzahl an verschiedenen Zuckern und sind evolutionär aus mindestens vier verschiedenen EIIC Vorläufern entstanden, wobei sich zumindest (iv) noch immer entwickelt.

Als das PTS 1964 entdeckt wurde, war die einzige bekannte Funktion die Zucker-Phosphorylierung. Heute weiß man, dass das System eine Rolle in vielen Aspekten der bakteriellen Physiologie spielt. Dazu gehören die Erkennung und der Transport von Zuckern, die Regulation des nicht-PTS-Zuckertransports und -metabolismus, die Regulation und Koordination des Stickstoff- und Kohlenstoffmetabolismus, der Genexpression, der Zellteilung und der Pathogenese (Barabote and Saier, 2005). Transporter aus anderen Familien (wie ABC-Transporter) weisen solche regulatorischen Funktionen nicht auf. Ein wichtiger Aspekt dieser regulatorischen Funktionen scheint die Fähigkeit zur Dimerisierung von EI und anderen Komponenten der PTS zu sein. Die Dimerisierung von EI führt zu einer Konformationsänderung und wird von PEP und Mg<sup>2+</sup> stimuliert sowie von Pyruvat gehemmt. Vier Moleküle EIIA<sup>Glc</sup> wiederum binden an ein Molekül EIIBC<sup>Glc</sup> und auch EIIB<sup>Man</sup> bildet Dimere aus (Deutscher *et al.*, 2006).

Ebenfalls ein wichtiger Aspekt für die regulatorischen Funktionen der PTS ist der Phosphorylierungszustand der EIAs und EIIBs. Während des aktiven Zuckertransportes sind diese Komponenten der PTS-Permeasen vorwiegend dephosphoryliert, wohingegen in Abwesenheit des Zuckers die exprimierten PTS-Komponenten phosphoryliert vorliegen. EIIA<sup>Glc</sup> aus *E. coli* und *B. subtilis* interagiert direkt mit vielen verschiedenen Proteinen, abhängig davon, ob es für den PTS-Phosphatgruppentransfer, die Kohlenstoff-Katabolitrepression oder regulatorische Funktionen im Einsatz ist. Obwohl diese Interaktionspartner nicht miteinander verwandt sind, erscheint die Struktur der Bindungsoberfläche von EIIA<sup>Glc</sup> immer gleich bleibend (Deutscher *et al.*, 2006).

NMR Studien und Röntgen-Kristallografien von EIIA und EIIB zeigten deutlich, dass die Phosphat-Bindungsdomänen der unterschiedlichen EII Familien sehr verschieden sind. Über die Struktur der Membrandomänen EIIC (und EIID) ist bisher nur wenig bekannt. EIIA<sup>Glc</sup> Proteine haben meist eine 1-Barrel oder 13-Sandwich Struktur, mit der aktiven Phosphorylierungsstelle am His-90 in *E. coli* und His-83 in *B. subtilis*, welche in einer flachen

hydrophoben Furche des dritten Stranges liegt. Eine zweite His-Phosphorylierungsstelle (His-68 in *B. subtilis* und His-75 in *E. coli*) ist mit dem N-3 Atom seiner aktiven Seite nur 0,32 bis 0,33 nm vom N-3 Atom der ersten His Phosphorylierungsstelle entfernt, was darauf hin deutet, dass die Phosphatgruppe auch mit diesem zweiten Histidin interagiert. Vergleicht man die phosphorylierte und unphosphorylierte Form von EIIGlc aus *E. coli*, so zeigen sich nur geringe strukturelle Veränderungen, im Gegensatz zu diesem Protein aus *S. aureus*, welches größere strukturelle Veränderungen nach der Phosphorylierung aufweist (Postma *et al.*, 1993). Das mit EIIC als Komplex arbeitende membranständige EIIBGlc von *E. coli* wird am Cys-421 phosphoryliert (Robillard and Broos, 1999).

Wie bereits angedeutet unterscheiden sich die EII-Mannose-PTS-Proteine in *E. coli* deutlich von denen für die Glucose-Aufnahme. EIIMan und EIIBMan bilden zusammen ein zytoplasmatisches Protein und EIICMan und EIIDMan bilden die integrale Transmembrandomäne, wobei nur EIICMan mit dem Zucker interagiert. Untersuchungen haben gezeigt, dass die EIIMan Domäne den aminoterminalen Teil des Proteins darstellt und von HPr am N-3 des His-10 phosphoryliert wird. Die carboxyterminale EIIBMan Domäne wird vom EIIMan am N-1 des His-175 phosphoryliert (Postma *et al.*, 1993).

### **B.3.2 Zusammenhang zwischen den PTS und der Kohlenstoff-Katabolitrepession (CCR)**

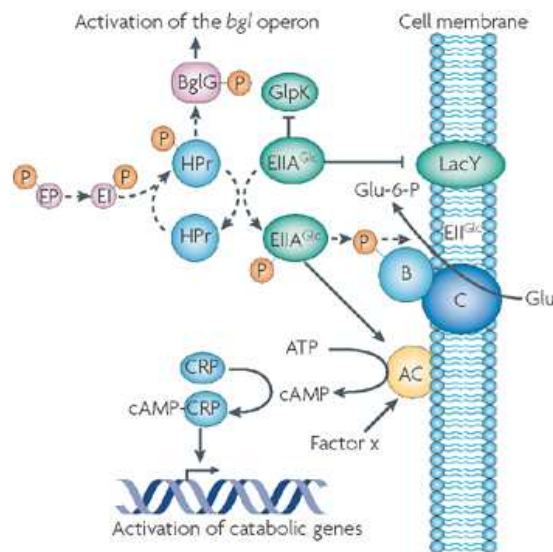
Die meisten Bakterien verwenden verschiedenste Komponenten als Kohlenstoffquellen. Diese können entweder co-metabolisiert werden oder das Bakterium kann bevorzugt die Kohlenstoffquelle nutzen die am leichtesten verfügbar ist und das schnellste Wachstum erlaubt. Ein Beispiel dieser selektiven Kohlenstoffquellennutzung ist die Glucose-Lactose-Diauxie in *E. coli*, welche zuerst 1942 von Jaques Monod beobachtet wurde. Viele Studien haben gezeigt, dass selektive Kohlenstoffverwertung weit verbreitet, Glucose die bevorzugte Kohlenstoffquelle in vielen dieser Organismen ist und die Aufnahme sekundärer Kohlenstoffquellen verhindert. Dieses Phänomen wird als Kohlenstoffkatabolitrepession (CCR) bezeichnet. CCR ist das wichtigste regulatorische Phänomen in vielen Bakterien, da oft 5-10% aller bakterieller Gene unter CCR stehen (Görke and Stülke, 2008). Die CCR ist ein klassisches Modell für zelluläre Regulation auf Grund veränderter Umweltbedingungen, bei dem Komponenten der PTS und die Protein-Phosphorylierung eine große Rolle spielen.

Jaques Monod erkannte, dass nach Zugabe von zwei Kohlenstoffquellen ins Medium ein diauxisches Wachstum auftritt, das heißt, zunächst wird die bevorzugte, leichter verwertbare Kohlenstoffquelle (meist Glucose) bis zu einem vorübergehenden Wachstumsstopp verwertet und nach einer kurzen Lag-Phase wird die weniger bevorzugte Kohlenstoffquelle (z.B. Lactose) von den Bakterien genutzt und das Wachstum fortgesetzt. Verantwortlich für dieses Phänomen ist die „inducer exclusion“ (Induktorausschluß) und/oder unterdrückte Expression von katabolen Genen auf Grund des geringen Crp/cAMP Levels (Deutscher *et al.*, 2006).

CCR verläuft in Gram-negativen *E.coli* über EIIGlc als zentralen Regulator, anders als im Gram-positiven Bakterium *Bacillus subtilis*, wo das an Ser-46 phosphorylierte HPr die wichtigste Rolle spielt (Stülke and Hillen, 2000). Zudem unterscheidet sich in den Bakterien die Art der Regulation, denn bei Gram-negativen Bakterien führt eine fehlende Transkriptionsaktivierung zur Katabolitrepession (positive Regulation), bei Gram-positiven Bakterien eine Repression der Transkription (negative Regulation).

### B.3.2.1 CCR in Gram-negativen Bakterien

In Gram-negativen Bakterien reguliert der Phosphorylierungsstatus der Glucose-spezifischen  $EIIA^{Glc}$  die Aktivität der Adenylatzyklase und somit das intrazelluläre Level an cAMP. Ist ein ausreichend hohes Level an cAMP erreicht, bindet dieses an den Transkriptionsregulator Crp, welcher nun an die spezifische Promotorregion der Zielgene bindet und durch Interaktion mit der RNA-Polymerase die Transkription initiiert (Görke and Stülke, 2008; Warner and Lolkema, 2003). In nicht-phosphoryliertem Zustand bindet  $EIIA^{Glc}$  an zahlreiche nicht-PTS Proteine, verhindert so die Aufnahme der weniger gut verwertbaren Kohlenstoffquellen und führt zum diauxischen Wachstum. Die Konzentration an PEP und P- $EIIA^{Glc}$  ist also während des Wachstums auf Glucose gering, steigt aber stark, wenn die Glucose verbraucht ist (Hogema *et al.*, 1998). Hohe Mengen an PEP und P- $EIIA^{Glc}$  schalten den Induktorauschluss ab und erlauben die Aufnahme der zweiten Kohlenstoffquelle. Dafür wird von P- $EIIA^{Glc}$  die Adenylatzyklase (AC) aktiviert. Erst kürzlich konnte von Park und Kollegen die direkte Interaktion von *E. coli*  $EIIA^{Glc}$  mit AC demonstriert werden. Die Experimente zeigten, dass  $EIIA^{Glc}$  und P- $EIIA^{Glc}$  beide an AC binden, jedoch nur die phosphorylierte Form die Aktivität stimuliert (Park *et al.*, 2006). Die Adenylatzyklase bildet nun ATP-abhängig cAMP, welches sich mit dem Transkriptionsregulator Crp verbindet und an die Promotorregion der Zielgene bindet, wobei die Genauigkeit der Konsensussequenz in der Bindestelle bestimmt, wie viel cAMP-Crp für die Transkriptionsinitiation benötigt wird (Busby and Ebricht, 1999; Deutscher, 2008; Görke and Stülke, 2008).



**Abbildung 7:** Kohlenstoffkatabolitrepression (CCR) in *E. coli*: Die  $EIIA$ -Domäne des Glucose-Transporters ( $EIIA^{Glc}$ ) ist die zentrale Verarbeitungseinheit der CCR in *E. coli*. Phosphoryliertes  $EIIA^{Glc}$  bindet und aktiviert die Adenylatzyklase (AC), was zu Synthese von zyklischem AMP (cAMP) führt. Ein unbekannter Faktor X wird ebenfalls für die Aktivierung der AC benötigt. Hohe cAMP-Konzentrationen fördern die Bildung des cAMP-CRP-Komplexes, welcher an die Promotorregion von katabolen Genen bindet und diese aktiviert. In nicht-phosphorylierter Form kann  $EIIA^{Glc}$  die AC nicht aktivieren, bindet an metabolische Enzyme, inaktiviert diese und so auch die Transporter für sekundäre Kohlenstoffquellen (Induktorauschluss). Der  $EIIA^{Glc}$ -Phosphorylierungsstatus korreliert mit der PTS-Transportaktivität und dem intrazellulären PEP- und Pyruvat-Verhältnis. HPr wirkt ebenfalls an der CCR mit, indem es BglG phosphoryliert, den Transkriptionsantiterminator, welcher die Expression von Beta-Glucosid-Genen kontrolliert und so wird in der Gegenwart des bevorzugten Zuckers das *bgl*-Operon nicht exprimiert (Görke and Stülke, 2008).

Weitere globale Transkriptionsregulatoren in *E. coli* sind Mlc und FruR. Beide Proteine haben zusätzlich zu ihrer Funktion in der Zuckeraufnahme noch regulatorische Ziele und werden monocystonisch exprimiert. Mlc kontrolliert die Expression verschiedener katabolischer Proteine als Antwort auf den Phosphorylierungsstatus der PTS. In *E. coli* kontrolliert Mlc die Expression seines eigenen Gens und die von *ptsHI*, *ptsG*, *manXYZ*, *malt* und *sgrS*. In Abwesenheit von Glucose ist  $EIICB^{Glc}$  phosphoryliert in der Zellmembran verankert und die *ptsG* Expression ist durch Mlc, welches upstream vom Promotor bindet, gehemmt. Wird nun Glucose aufgenommen, bindet Mlc an die nicht phosphorylierte  $EIIB^{Glc}$  Domäne und die Mlc

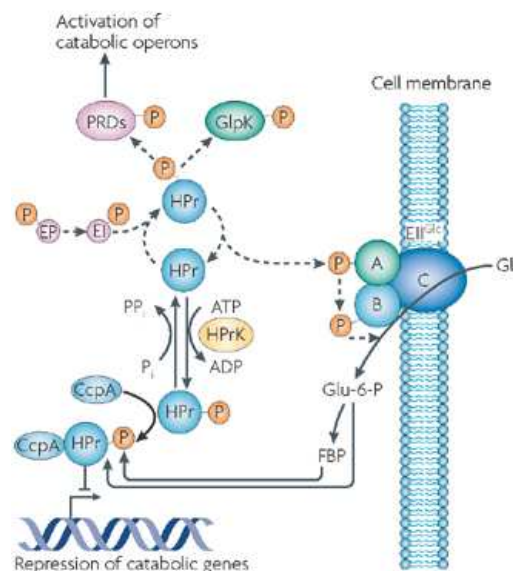
kontrollierten Gene sind dereprimiert und können transkribiert werden (Deutscher, 2008; Plumbridge, 2002; Tanaka *et al.*, 2004).

FruR kann als Aktivator und Repressor wirken, wobei es im Allgemeinen glykolytische Funktionen hemmt und auf Schritte der Gluconeogenese aktivierend wirkt. Es ist als Repressor des Fructose-Operons bekannt und als Aktivator für *pps*, welches für die PEP-Synthetase codiert. Fructose-1-Phosphat und in geringerem Maße Fructose-1,6-Bisphosphat wirken *in vitro* induzierend auf FruR (Plumbridge, 2002).

### B.3.2.2 CCR in Gram-positiven Bakterien

Die meisten Gram-positiven Bakterien besitzen keine Adenylatzyklase und Katabolitrepession erfolgt mit HPr als Signalüberträger, welches neben der His-15 Phosphorylierungsstelle auch an Ser-46 phosphoryliert werden kann. Letzteres wird ATP- oder GTP-abhängig von der HPr-Kinase (HPrK) vermittelt, welche den primären Sensor in diesem regulatorischen Weg darstellt. HPr-Ser46-P bindet an den globalen Transkriptionsregulator der CCR in Gram-positiven Bakterien CcpA, welcher nun an so genannte *cre*-Boxen (catabolite responsive element) in der Promotorregion der Zielgene bindet und so deren Transkription verhindert (Görke and Stülke, 2008; Warner and Lolkema, 2003).

Ähnlich wie EIIA<sup>Glc</sup> in Gram-negativen Bakterien hat also HPr eine differentielle Rolle in der Genregulation der Gram-positiven Bakterien mit geringem G+C Gehalt. Da HPr nicht nur von PEP am His-15 phosphoryliert wird, sondern auch von HPrK am Ser-46, existieren vier verschiedene Formen von HPr: unphosphoryliertes HPr, P-His-HPr, P-Ser-HPr und doppelt phosphoryliertes P-His-Ser-HPr (Vadeboncoeur *et al.*, 1991). Die Hpr-Kinase wird durch den Zuckermetabolismus in ihrer Aktivität beeinflusst, da die Konzentrationen von ATP, P<sub>i</sub>, PP<sub>i</sub> und FBP direkt auf HPrK einwirken, genauso wie EI auf das PEP - Pyruvat Verhältnis reagiert. HPrK und EI kontrollieren also als Antwort auf die Art und Menge der Zuckerquelle den Phosphorylierungsstatus von HPr. Wird bei hohem Energiestatus in der Zelle HPr ATP-abhängig von der HPr-Kinase am Ser-46 phosphoryliert, verringert sich die Menge an vom EI PEP-abhängig am His-15 phosphorylierten HPr, und umgekehrt. Im HPr:HPrK Komplex interagiert die vierte  $\alpha$ -Helix der HPrK mit His-15, weswegen vermutlich die HPrK von P-His-15 in seiner Interaktion mit HPr



**Abbildung 8:** Kohlenstoffkatabolitrepession (CCR) in *B. subtilis* und anderen Firmicutes: In Firmicutes kann HPr von der HPr-Kinase (HPrK) am Ser-46 phosphoryliert werden. Dies geschieht, wenn die intrazelluläre Konzentration an Fructose-1,6-Bisphosphat (FBP) und ATP hoch ist, was die Anwesenheit bevorzugter Kohlenstoffquellen anzeigt. HPr-Ser-P bindet das CcpA-Protein und dieser Komplex bindet an die *cre*-Boxen an der DNA und reprimiert so die Transkription der katabolen Gene. HPrK ist auch zuständig für die Dephosphorylierung von HPr-Ser-P wenn in der Zelle eine hohe Konzentration an P<sub>i</sub>, nur wenig ATP vorhanden ist und die FBP-Konzentration gering ist. In der Abwesenheit von Glucose trägt auch HPr-His-P zur CCR bei, indem es die Glycerin-Kinase GlpK und PRD-enthaltende Transkriptionsaktivatoren phosphoryliert, was Voraussetzung für deren Aktivität ist. Diese aktivieren nun die Transkription katabolitrepresmierter Gene (Görke and Stülke, 2008).

gestört werden kann. Umgekehrt weiß man aber auch, dass Mutationen im Ser-46 von HPr die His-15 Phosphorylierung beeinflussen (Reizer *et al.*, 1989).

Die HPr-Kinase ist ein bifunktionelles Enzym, da sie nicht nur in der Lage ist, HPr ATP-abhängig zu phosphorylieren, sondern auch unter Bildung von  $PP_i$  aus  $P_i$  HPr-Ser-P zu dephosphorylieren (Kravanja *et al.*, 1999). Sie wird daher auch als HPr-Kinase/HPr-Phosphorylase (HPrK/P) bezeichnet und ist auch in *L. monocytogenes* vorhanden (Herro *et al.*, 2005). Ist bei Energiearmut viel freies  $P_i$  in der Zelle vorhanden, so bindet dieses im Bereich des Walker Motivs A an die HPrK/P und inhibiert so die Kinase-Aktivität des Enzyms und umgekehrt inhibiert ATP die Phosphorylaseaktivität. Ebenso stimulierend auf die Kinase-Aktivität wirkt FBP (Fructose-Bis-Phosphat), wobei die Hauptfunktion in der Blockade der Phosphorylaseaktivität liegt. Die intrazellulären Konzentrationen an ATP, FBP und  $P_i$  variieren sehr stark, abhängig davon, ob das Bakterium eine favorisierte Kohlenstoffquelle nutzt oder nicht. Nutzt das Bakterium eine gut verwertbare Zuckerquelle wie Glucose oder Mannose, so ist die Konzentration von  $P_i$  gering und die von ATP und FBP hoch und die HPrK/P wirkt als Kinase. HPr liegt nun als HPr-Ser-P oder doppelt phosphoryliert (mit geringerer Affinität zu EIIA) vor. Unter diesen Bedingungen existiert nur eine geringe Menge an HPr-His-P, welche offenbar für eine ausreichende Glucose-Aufnahme über PTS sorgt. Bei Wachstum auf einer nicht favorisierten Kohlenstoffquelle tritt der gegenteilige Effekt ein. Mit dieser Funktion reguliert HPr über einen Feedback-Mechanismus den PTS-Transport von Kohlenstoffquellen über die Zellmembran, denn HPr-Ser-P bindet das Catabolite Control Protein A (CcpA) (Deutscher *et al.*, 1995) und ermöglicht es so diesem an die *cre*-Boxen in den Genen für die PTS der nicht favorisierten Kohlenstoffquellen zu binden und so deren Transkription zu verhindern. CcpA gehört zur Familie der LacI/GalR Repressoren, kann aber auf Grund einer charakteristischen Sequenz am Ende der DNA-bindenden Domäne leicht von den anderen Mitgliedern dieser Familie unterschieden werden. Diese Region ist wichtig für die Funktion von CcpA. CcpA liegt als Dimer vor, welches mit einem Molekül HPr-Ser-P interagiert. HPr-Ser-P wirkt somit als Korepressor der CCR, da er CcpA erlaubt an die *cre*-Boxen zu binden.

Die *cre*-Boxen sind nicht-perfekte palindromische Sequenzen am 5' Ende, am Transkriptionsstartpunkt oder im Promotorbereich vieler katabolitreprimierter Transkriptionseinheiten, welche sich auch in *L. monocytogenes* finden lassen, z.B. im Gen für die  $\beta$ -Glucosidase (Behari and Youngman, 1998). Die Bindung von HPr-Ser-P und CcpA an *cre*-Boxen in der Promotorregion scheint mit der Bindung der RNAP zu interferieren, während *cre*'s am 5' Ende über einen „road block“ reguliert werden. Ist nun kein HPr-Ser-P vorhanden wird die Transkription nicht verhindert und die Bakterien können die Gene für die Aufnahme der weniger gut verwertbaren Kohlenstoffquellen exprimieren (Deutscher *et al.*, 2006).

*L. monocytogenes* besitzt die Gene *ptsH*, *hprK*, *ptsI* und *ccpA*, codierend für HPr, HPrK/P, Enzym I und CcpA (Behari and Youngman, 1998; Christensen and Hutkins, 1994). Eine ATP-abhängige Phosphorylierung des HPr am Ser46 durch die HPr-Kinase aus *L. monocytogenes* konnte nachgewiesen werden und ebenso, dass HPr-Ser-P den Zuckertransport über das PTS reduziert (Christensen and Hutkins, 1994). Neueste Studien haben gezeigt, dass die Komponenten der CCR in *L. monocytogenes* offenbar nicht direkt in die Regulation der PrfA-Aktivität involviert sind (Mertins *et al.*, 2007; Milenbachs-Lukowiak *et al.*, 2004). Diese Studien deuten eher auf eine Beteiligung der EIIA- und/oder EIIB-Komponenten spezifischer PTS-Permeasen an der Modulierung der PrfA-Aktivität hin, wobei

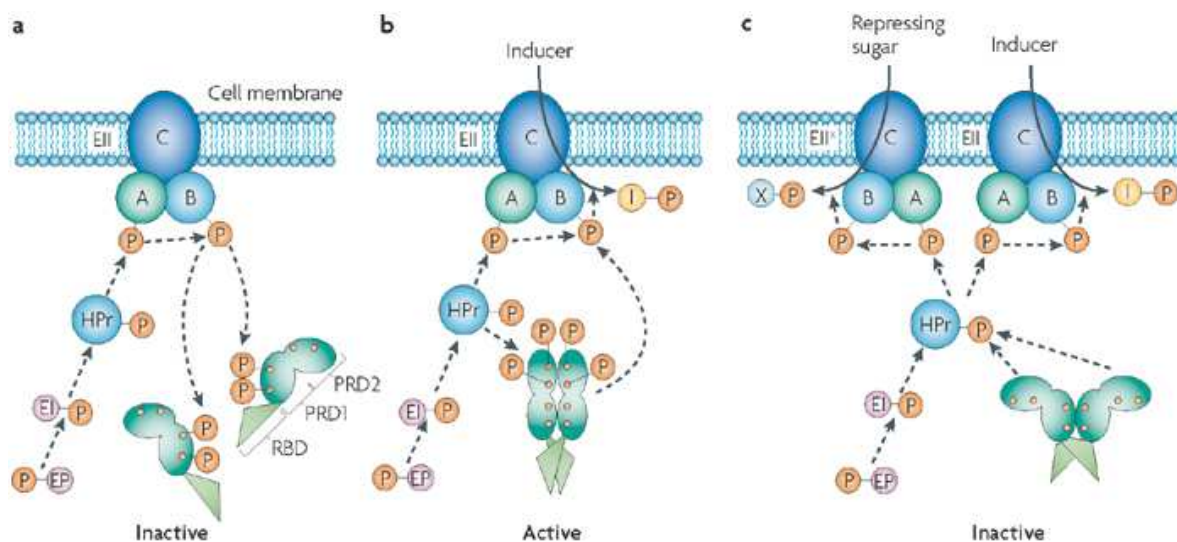
der Phosphorylierungsstatus dieser Komponenten für die positive oder negative Kontrolle von PrfA zuständig ist.

### B.3.2.3 PTS regulierende Domänen (PRDs)

In Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien wird die Kohlenstoff-Katabolitrepression zum Teil durch Phosphorylierung konservierter Histidin-Reste in so genannten PTS regulierenden Domänen (PRDs) verschiedener Antiterminatoren und Aktivator-Proteinen umgesetzt. Solche Antiterminatoren sind weit verbreitet in vielen Bakterienspezies zu finden und fast ausschließlich in der Regulation von Beta-Glucosid PTS zu finden. Aktivatoren mit PRDs fand man bisher ausschließlich bei Gram-positiven Bakterien (Stülke *et al.*, 1998; Xue and Miller, 2007).

PRD-enthaltende Regulatoren erhalten die Informationen über das Substrat und diese Art der Regulation erlaubt eine hierarchische Nutzung der PTS-Zucker (Görke and Stülke, 2008). PRD-enthaltende Regulatoren werden von PTS-abhängiger Phosphorylierung kontrolliert, wobei in Abwesenheit eines Induktors die phosphorylierte EIIB-Komponente des PTS sein Phosphat auf eine PRD überträgt und den Regulator damit inaktiviert. In Anwesenheit des PTS-spezifischen Substrats ist der Regulator dephosphoryliert und das Phosphat wird auf den Zucker übertragen, wodurch die Expression des Operons induziert wird (Stülke *et al.*, 1998).

Die Transkription von Genen, die von Antiterminatoren kontrolliert werden, ist grundsätzlich initiiert, aber die Elongation wird von Transkriptionsterminatoren geblockt. Die 5`Enden dieser Terminatoren überlappen konservierte inverted Repeats, so genannte Ribonuclein-Antiterminatoren (RAT). Wenn der Antiterminator bindet, stabilisiert er wahrscheinlich die RAT Sekundärstruktur und erlaubt so die Transkription der Zielgene, z.B. *bglG* in *E. coli*. Antiterminatoren dieser Familie besitzen eine N-terminale RNA-Bindungsstelle (RBD) und



**Abbildung 9:** Regulation der LicT-Antiterminator-Aktivität über HPr- und EII<sup>Bgl</sup>-katalysierte Phosphorylierung: (a) In der Abwesenheit von PTS-Zuckern phosphoryliert EII<sup>Bgl</sup> LicT am Histidin der PRD-I. Zusätzlich könnte HPr LicT am Histidin der PRD-II phosphorylieren. Diese multiple Phosphorylierungsform von LicT kann nicht dimerisieren und ist daher nicht aktiv. (b) In Anwesenheit induzierender Zuckere (Beta-Glucoside) dephosphoryliert EII<sup>Bgl</sup> LicT an PRD-I, was die Bildung von LicT-Dimeren fördert. Jedoch benötigt die Aktivierung von LicT HPr-katalysierte Phosphorylierung an PRD-II. (c) In Anwesenheit zusätzlicher PTS-Zucker, wie Glucose, nimmt die Menge an HPr-His-P ab und die Phosphatgruppen der PRD-II von LicT werden an HPr zurück übertragen. Im nicht-phosphorylierten Status dreht sich PRD-II und nur PRD-I ist dimerisiert. Die Dimerisierung der RNA-bindenden Domäne wird so verhindert und LicT kann nicht mehr an sein mRNA-Ziel binden (Görke and Stülke, 2008).

zwei konservierte PRD Regionen, über die der Antiterminator moduliert wird. Einen gut untersuchten Transkriptionsantiterminator stellt LicT aus *Bacillus subtilis* dar (siehe Abbildung 9). Der LicT-Antiterminator kontrolliert die Expression des BglPH-Operons (codiert für Aryl-Beta-Glucoside) in *B. subtilis*. In der Abwesenheit von Beta-Glucosiden wird LicT vom Beta-Glucosid-spezifischen EII an der PRD-I phosphoryliert und somit inaktiviert. Sind Beta-Glucoside vorhanden, werden die in die Zelle transportierten Zucker phosphoryliert und LicT ist dephosphoryliert und aktiv. LicT wird jedoch nicht nur Substrat-spezifisch reguliert, sondern auch von der Verfügbarkeit von Glucose und anderer PTS-Zucker. In der Anwesenheit von Glucose ist LicT inaktiv. Um aktiviert zu sein muss es nicht nur an PRD-I phosphoryliert werden, sondern auch an PRD-II. PRD-II wird von HPr-His-P phosphoryliert, welches nur in der Abwesenheit von Glucose verfügbar ist (Görke and Stülke, 2008).

Transkriptionsaktivatoren mit PRDs wurden bisher nur in Gram-positiven Bakterien gefunden, z.B. das LevR Protein in *Bacillus subtilis*, welches die Expression des Levanase-Operons kontrolliert. Das Levanase-Operon wurde als erstes als strikt abhängig von  $\sigma^{54}$  und dem Transkriptionsaktivator LevR beschrieben (Martin *et al.*, 1989). Es codiert für ein Fructose-spezifisches PTS und das Enzym Levanase. LevR hat unter den  $\sigma^{54}$ -abhängigen Aktivatoren eine einheitliche Struktur (Debarbouille *et al.*, 1991). Es besteht aus einem N-terminalen Helix-turn-Helix Motiv, einer zum zentralen Regulator NifA homologen Region, welche für die Interaktion von  $\sigma^{54}$  an der RNAP wichtig ist und zwei PRDs. Zudem konnten C-Terminal EIIB und IIB Domänen mit hoch konservierten Phosphorylierungsstellen (Cystein oder Histidin) gefunden werden. Wie bei den Antiterminatoren sind die PRDs wichtig für die Modulation der LevR-Aktivität als Reaktion auf die Fructose und Glucose Verfügbarkeit (Greenberg *et al.*, 2002; Stülke *et al.*, 1998). EIIB wirkt hier als negativer Regulator der Transkription. Wenn der für das PTS benötigte Zucker nicht vorhanden ist, kann EIIB sein von HPr erhaltenes Phosphat nicht an den Zucker abgeben und ist so in der Lage, die PRDs von Transkriptionsregulatoren zu phosphorylieren (PRD-I bei BglG und PRD-II bei LevR). Diese binden nun an die DNA und unterdrücken die Transkription der PTS-Gene. Ändert sich jedoch die Zusammensetzung der Kohlenstoffquellen und der Zucker wird aufgenommen, so kann EIIB die PRDs nicht mehr phosphorylieren und die Transkription der Gene startet. Für LevR ist zudem bekannt, dass es auch positiv vom dem Histidin-Phosphatüberträger HPr der PTS reguliert werden kann. Diese zweite Form der LevR-Aktivitätskontrolle ist abhängig von HPr-His15-P, was mittels Punktmutation im *ptsH*-Gen nachgewiesen werden konnte. Nach dem Modell der LevR-Regulation besteht LevR aus drei Domänen (A, B und C). In Anwesenheit von HPr-His-P wird die Domäne B von HPr phosphoryliert und aktiviert LevR. Ist nun keine Fructose als Kohlenstoffquelle vorhanden, so wird die Domäne C von den LevD und LevE Komponenten des *lev*-PTS phosphoryliert und inaktiviert, unabhängig vom Phosphorylierungsstatus der Domäne B. Sind nun beide Domänen nicht phosphoryliert, wird die Transkription des Levanase-Operons aktiviert (Stülke *et al.*, 1995; Stülke *et al.*, 1998; van Tilbeurgh and Declerck, 2001). *B. subtilis* LevR kann auch von *E. coli* PTS positiv reguliert werden, was zeigt, dass auch Gram-negative Bakterien die Fähigkeit haben die Aktivität PRD-enthaltender Regulatoren positiv zu kontrollieren (Stülke *et al.*, 1995)

Vier weitere  $\sigma^{54}$ -abhängige Aktivatoren wurden in *B. subtilis* beschrieben: RocR (Calogero *et al.*, 1994), AcoR (Ali *et al.*, 2001; Huang *et al.*, 1999), BkdR (Debarbouille *et al.*, 1999) und YlpP (Beckerling *et al.*, 2002).

Von den zwei PRDs wird das dem N-Terminus näher liegende als PRD-I und das nahe dem C-Terminus als PRD-II bezeichnet. Alle PRD Sequenzen besitzen an Position 7 ein Histidin als Ziel der positiven oder negativen Regulation durch PTS-abhängige Phosphorylierung. Downstream von diesem Histidin findet sich ein hoch konserviertes Arginin und in vielen PRDs an Position 70 ein weiteres Histidin. EIIB, die letzte Komponente in der Phosphorylierungskaskade von PTS, ist also für den Zuckertransport und die Phosphorylierung von PRDs zuständig.

### B.3.3 Listerielle Phosphotransferase-Systeme

Von den sieben PTS-Familien weisen die meisten bisher sequenzierten Bakterien in ihrem Genom nicht alle auf. Anders dagegen Listerien, sie codieren für alle sieben PTS EIIC Familien und *L. monocytogenes* ist das Bakterium mit den meisten *pts* Genen. 91 Gene codieren für 29 komplette und einige unvollständige PTS. *L. monocytogenes* EGD-e weist mit 3,2% unter allen bislang sequenzierten Bakterien den höchsten Prozentsatz an genetischem Material in PTS auf (Glaser *et al.*, 2001). Vergleicht man die zwei *L. monocytogenes* Stämme EGD-e und 4b F2365, dann besitzt EGD-e zwei zusätzliche Glucose-PTS, drei für Fructose und eines aus der Ascorbat-Familie. Dies sind deutlich mehr als in der apathogenen Art *L. innocua* (siehe Tabelle 2). Zusätzlich zu den Zucker-PTS besitzt *L. monocytogenes* auch noch ein für Dihydroxyaceton (DHA) spezifisches PTS (Barabote and Saier, 2005; Glaser *et al.*, 2001).

	Glc	Fru	Lac	Gut	Gat	Man	Asc
<i>L. innocua</i> Clip11262	2	4	8	1	3	4	1
<i>L. monocytogenes</i> EGD-e	6	6	8	1	3	4	2

**Tabelle 2** Vergleich der vollständigen PTS von *L. innocua* Clip11262 und *L. monocytogenes* EGD-e aus den Familien Glucose (Glc), Fructose (Fru), Lactose (Lac), Glucitol (Gut), Galactitol (Gat), Mannose (Man) und L-Ascorbat (Asc) (Barabote and Saier, 2005).

Trotz der großen Anzahl an PTS-Genen besitzt *L. monocytogenes* kein vollständiges PtsG, lediglich ein EIIA<sup>Glc</sup> konnte annotiert werden. Dieses ist jedoch nicht an der Glucoseaufnahme in Listerien beteiligt (S. Mertins, persönliche Mitteilung). Für zwei der PTS<sup>Man</sup>-Permeasen konnte dagegen schon gezeigt werden, dass sie am Glucose-Transport in *L. monocytogenes* (Arous *et al.*, 2004a; Dalet *et al.*, 2001) und *L. innocua* (Xue and Miller, 2007) beteiligt sind. Diese Studien zeigten zudem, dass die Operons der zwei PTS-Permeasen *mpt*ABCD (lmo0781-0784) und *mpt*ACD (lmo0096-0098)  $\sigma^{54}$ -abhängig transkribiert werden.

In *L. monocytogenes* wird die Expression des *mpt*-Operons (Abbildung 10) von  $\sigma^{54}$  und ManR kontrolliert und von den Zuckern Glucose und Mannose induziert, welche über die von *mpt* codierte Permease transportiert werden. Der von *rpoN* codierte  $\sigma^{54}$ -Faktor ist eine alternative Untereinheit der RNA-Polymerase und wurde zunächst in *E. coli* als Faktor zur Regulierung des Stickstoffkreislaufes identifiziert. Heute ist eine große Bandbreite an  $\sigma^{54}$ -abhängigen Genen in Gram-negativen und Gram-positiven Bakterien bekannt, welche in den Stickstoff- und Kohlenstoffmetabolismus, Flagellensynthese und Virulenz involviert sind (Studholme and Buck, 2000). Der  $\sigma^{54}$ -Faktor ermöglicht es der RNAP die Transkription von einer Klasse -24/-12-Promotoren zu initiieren, welche sich beträchtlich von den -35/-10-Promotoren des vegetativen  $\sigma^{70}$ -Faktors unterscheiden (Barrios *et al.*, 1999). Die Konsensussequenz der  $\sigma^{54}$ -



Promotoren ist TGGCACN5-TTGCa/t, wobei GG und GC hochkonserviert sind (Morett and Buck, 1989). Im Gegensatz zu  $\sigma^{70}$  benötigt die  $\sigma^{54}$ -abhängige RNAP einen Aktivator um den offenen Komplex der Transkriptionsinitiation zu bilden. Solche  $\sigma^{54}$ -abhängigen Aktivatoren

(auch als Enhancer bindende Proteine (EBPs) beschrieben) binden spezifisch an eine upstream liegende

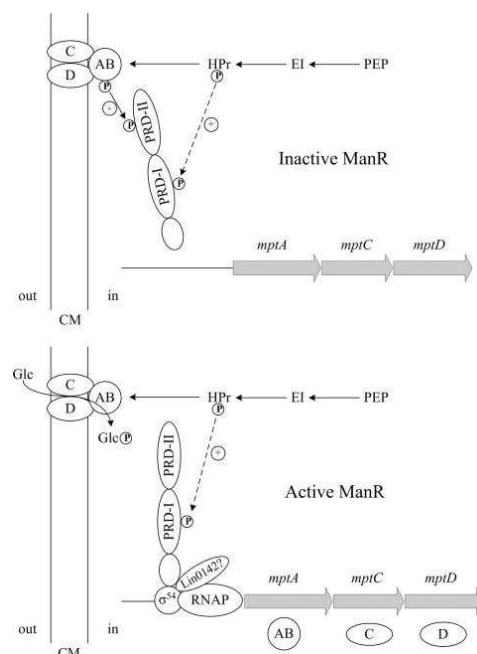
aktivierende Sequenz (UAS), welche generell 100 bis 200 bp upstream vom Promotor

liegt (Shingler, 1996).  $\sigma^{54}$ -Faktor assoziierte Aktivatoren der NifA-NtrC-Familie sind klassischerweise aus drei unabhängigen Domänen zusammengesetzt, welche in Signalerkennung, transkriptionelle Aktivierung und DNA-Bindung involviert sind. Die zentrale Domäne, welche die Transkriptionsinitiation mittels Interaktion mit  $\sigma^{54}$  steuert, ist am stärksten konserviert. Für *L. monocytogenes* wurden bisher nur das Mannose-Operon *mpt* (Arous *et al.*, 2004a) und das Operon für den Carnitin-Transporter *opu* (Okada *et al.*, 2006) als  $\sigma^{54}$ -abhängig beschrieben. Die Expression des *mpt*-Operons (lmo0096-0098) wird zusätzlich vom ManR-Aktivator reguliert, welcher zur LevR-Familie gehört (Dalet *et al.*, 2001). ManR könnte  $\sigma^{54}$  dabei helfen die *mpt*-Promotor-DNA während der Transkriptionsinitiation aufzuschmelzen (Xue and Miller, 2007). In einer *rpoN*-Mutante ist die Expression von *mpt* stark herunterreguliert (Arous *et al.*, 2004a), was neben der starken Hochregulation von  $\text{PTS}^{\text{Glc}}$  (lmo0027) auch zu einer Resistenz gegen Bakteriocine der Subklasse IIa führt (Dalet *et al.*, 2001).



**Abbildung 10:** Genetische Organisation des *mpt*-Operons in *L. monocytogenes*. Die open reading frames sind mit offenen Pfeilen dargestellt (*mptA* (lmo0096), *mptC* (lmo0097) und *mptD* (lmo0098)), der putative *rpoN*-abhängige Promotor und die Terminatoren sind gezeigt. (Dalet *et al.*, 2001; Milenbachs-Lukowiak *et al.*, 2004)

Für die Regulation von *mpt* in *L. innocua* wurde bisher folgendes Modell aufgestellt: In Abwesenheit von Glucose transferiert lin0143 (EIIAB codiert von *mptA*, entspricht lmo0096) seine von HPr-His-P übertragene Phosphatgruppe auf His-871 in PRD-II, inaktiviert so ManR, wodurch die *mpt*-Expression reprimiert wird. His-506 könnte zur gleichen Zeit ebenfalls von HPr-His-P phosphoryliert werden. Ist nun Glucose im Medium vorhanden, so gibt es einen aktiven Phosphatgruppentransfer von EIIAB über EIIC und EIID auf die durch die Membran tretende Glucose und ManR wird nicht am His-871 phosphoryliert. Gleichzeitig werden auch weniger ManR-Moleküle von Hpr am His-506 der PRD-I phosphoryliert. Diese nur an PRD-I phosphorylierten ManR-Proteine wären nun aktiv und in der Lage mit der RNAP,  $\sigma^{54}$  und möglicherweise auch Lin0142 zu interagieren und die Transkription des *mpt*-Operons zu initiieren (Xue and Miller, 2007).



**Abbildung 11:** Schema der *mpt* Regulation mittels  $\sigma^{54}$  und ManR (nach Xue and Miller, 2007)

Arous *et al.* (2004a) stellten anhand ihrer Daten und dem bekannten Mechanismus aus *B. subtilis* (Deutscher, 2008) die Theorie auf, dass die Abnahme der *mpt* Expression möglicherweise in einer erhöhten Menge HPr-His-P resultiert, was in einer Phosphorylierung der GlpK oder PTS-Komponenten und Abnahme an HPr-Ser-P resultiert, was wiederum zu einer Verringerung der CCR führt, wodurch mehr PTS<sup>Glc</sup>(Imo0027) gebildet wird. Eine solche Regulation anderer PTS durch Mannose-spezifische PTS-Komponenten wurde schon zuvor als Teil der CCR in *Streptococcus salivarius* und *Lactobacillus pentosus* beschrieben (Bourassa and Vadeboncoeur, 1992; Chaillou *et al.*, 2001).

*In silico* Analysen lassen vermuten, dass die *mpo*-Transkription  $\sigma^{54}$ -abhängig verläuft. Zudem liegt das *mpo*-Operon direkt downstream vom  $\sigma^{54}$ -abhängigen Transkriptionsaktivator ManR.

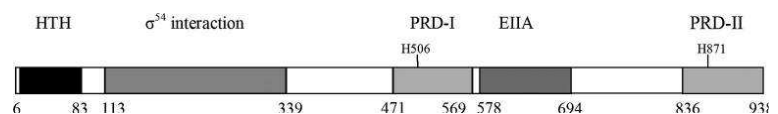
Eine Sequenzanalyse der Upstream-Region von *mpo* zeigt einen putativen  $\sigma^{54}$ -spezifischen -24/-12-Promotor und einen zusätzlich überlappenden putativen -35/-10-Promotor. Eine regulatorische Konsensussequenz der Cre-Box wurde ebenfalls 79 bp upstream der Transkriptionsinitiationsstelle gefunden. Offenbar steht *mpo*ABCD also unter Katabolitrepression. Inaktivierung des *mpo*-Operons (Imo0781-0784) führt zu einer leichten Resistenz gegen Bakteriocine der Subklasse IIa, wahrscheinlich als Antwort auf die verringerte *mpt*-Expression. Im Gegenzug führt eine Inhibierung von *mpt* zu einer erhöhten Expression von *mpo*. Offenbar gibt es eine Cross-Regulation zwischen *mpt* und *mpo*. In beiden Mutanten ist wie in der *rpoN*-Mutante das PTS<sup>Glc</sup>(Imo0027) hochreguliert.



**Abbildung 12:** Genetische Organisation des *mpo*-Operons in *L. monocytogenes*. Die open reading frames sind mit offenen Pfeilen dargestellt (*manR* (Imo0785), *mpoA* (Imo0784), *mpoB* (Imo0783), *mpoC* (Imo0782) und *mpoD* (Imo0781)) und der putative rpoN-abhängige Promotor ist gezeigt (Arous *et al.*, 2004b).

Offenbar steht *mpo*ABCD also unter Katabolitrepression. Inaktivierung des *mpo*-Operons (Imo0781-0784) führt zu einer leichten Resistenz gegen Bakteriocine der Subklasse IIa, wahrscheinlich als Antwort auf die verringerte *mpt*-Expression. Im Gegenzug führt eine Inhibierung von *mpt* zu einer erhöhten Expression von *mpo*. Offenbar gibt es eine Cross-Regulation zwischen *mpt* und *mpo*. In beiden Mutanten ist wie in der *rpoN*-Mutante das PTS<sup>Glc</sup>(Imo0027) hochreguliert.

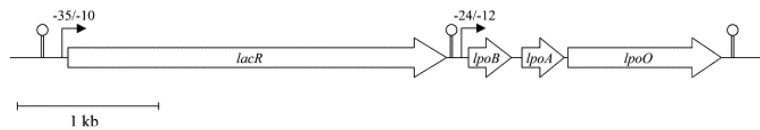
ManR besitzt die klassischen Bindemotive anderer  $\sigma^{54}$ -assoziierter Aktivatoren: Ein ATP/GTP-Bindemotiv A (Position 144-151) und eine  $\sigma^{54}$ -Interaktionsdomäne (Position 209-224). Interessanterweise hat Man R auch eine normalerweise in Helicasen gefundenes klassisches DEAH-Motiv mit 10 aa Sequenz (Position 217-226) (Luking *et al.*, 1998). Offenbar könnte ManR also nicht nur ATPase- sondern auch Helicase-Aktivität besitzen. Und ManR besitzt zwei PTS regulierende Domänen (PRD-I an Position 501-566 und PRD-II an Position 863-929), welche für LevR in *Bacillus subtilis* beschrieben sind. LevR kontrolliert die Expression des *lev*-Operons, welches für eine Permease der Mannose-Familie codiert (Dalet *et al.*, 2001).



**Abbildung 13:** Domänen-Organisation von ManR in *L. innocua* Lin11. Das Protein wurde mittels dem InterProScan server (<http://www.ebi.ac.uk/InterProScan>) geprüft. Konservierte Histidine und die Grenzen von jeder Domäne sind nummeriert. HTH, helix-turn-helix DNA-bindende Domäne; EIIA, Fructose-PTS-Permease EIIA-ähnliche Domäne. (Xue and Miller, 2007)

2003 beschreiben Dalet *et al.* mit LacR (codiert von Imo1721) einen neuen  $\sigma^{54}$ -assozierten Aktivator der LevR-Familie und das  $\sigma^{54}$ -abhängige Operon *lpo*. Das *lpo*-Operon (Imo1720, Imo1719 und Imo1718) codiert für EII-Untereinheiten, die der Lactose-Familie ähneln und werden von Cellobiose, Chitobiose und Lactose initiiert. LacR weist eine 54%-ige Ähnlichkeit mit LevR von *B. subtilis* auf. Der N-Terminus von LacR besitzt eine Glycin-

reiche Region, die zu einem ATP/GTP-Bindemotiv gehört (Position 113-120) und eine  $\sigma^{54}$ -Interaktionsdomäne (Position 178-193). Ein putatives Helix-Turn-Helix-Motiv für die LacR-DNA-Interaktion wurde im N-Terminus identifiziert und zwei PRDs (PRD-I von Position 436-531 und PRD-II von Position 791-887). Zwischen den zwei PRDs wurde wie schon für LevR beschrieben eine EIIA-PTS-Komponente an Position 543-



**Abbildung 14:** Genetische Organisation des *lacR*- und *lpo*-Operons in *L. monocytogenes*. Die open reading frames sind mit offenen Pfeilen dargestellt (*lacR* (lmo1721), *lpoB* (lmo1720), *lpoA* (lmo1719) und *lpoO* (lmo1718)), die putativen Promotoren und die Terminatoren sind gezeigt. (Dalet *et al.*, 2003; Milenbachs-Lukowiak *et al.*, 2004)

658 gefunden. Die PRD-I, PRD-II und die EIIA-Domäne teilen ein gemeinsames Merkmal, und zwar konservierte Histidinreste an den Positionen 468, 823 und 550, welche von PTS-Komponenten phosphoryliert werden könnten und so die Aktivität von LacR regulieren. Die Zuckerverwertung von *lpoA*- und *lpoO*-Mutanten (lmo1719 und lmo1718) wurde mit dem Wildtyp verglichen und es konnte hierbei kein Unterschied festgestellt werden. Das *L. monocytogenes* EGD-e Genom wurde analysiert und für lmo2708 (PTS<sup>Lac</sup>(EIIC)) konnte ebenfalls ein putativer  $\sigma^{54}$ -abhängiger Promotorbereich mit UAS-Motiven wie im *lpo*-Promotor gefunden werden. Daher nahmen Dalet *et al.* (2003) an, dass lmo2708 ebenfalls  $\sigma^{54}$ - und LacR-abhängig kontrolliert wird und eine funktionelle Einheit mit PTS<sup>Lac</sup>(EIIB/A) codiert von lmo1720/1719 bilden könnte.

Schon zuvor sind zwei spontante Mutanten in Phosphotransferasesystemen von *L. monocytogenes* beschrieben worden, die resistent gegen Bakteriocine sind. Bei der ersten Mutante handelt es sich um eine Deletion von lmo0096, was zu einer Resistenz gegen Leucocin A führt (Ramnath *et al.*, 2000) und die zweite Mutante, die gegen Pediocin PA-1 resistent ist, überexprimiert ein Beta-Glucosid-spezifisches PTS (Gravesen *et al.*, 2000). Schon früher konnte gezeigt werden, dass die Glucoseaufnahme in *L. monocytogenes* sensitiv gegenüber Pediocin JD ist (Christensen and Hutkins, 1994).

## B.4 Zielsetzung

Die Pathogenität von *L. monocytogenes* wird durch verschiedene Virulenzfaktoren bestimmt, deren Expression großteils vom zentralen Virulenzgenregulator PrfA kontrolliert wird. Die Expression von PrfA selbst wird auf transkriptioneller und posttranskriptioneller Ebene reguliert und hauptsächlich durch verschiedene Umweltbedingungen moduliert (Johansson *et al.*, 2002; Kreft and Vázquez-Boland, 2001; Milenbachs *et al.*, 1997). So führt die Anwesenheit verschiedener Kohlenstoffquellen wie Glucose oder Cellobiose zu einer starken Inhibierung der PrfA-Aktivität. Diese Zucker werden über PEP-PTS in die Zelle transportiert. Dagegen zeigte die PTS-unabhängige Aufnahme von Glucose-1-Phosphat und Glycerin keine Inhibierung der PrfA-Aktivität (Joseph *et al.*, 2008; Ripio *et al.*, 1997).

Die drei *Listeria*-Spezies *L. monocytogenes*, *L. ivanovii* und *L. seeligeri* verfügen über ähnliche Pathogenitätsinseln (LIPI-1), deren enthaltenen Gene in unterschiedlicher Weise reguliert werden und verschiedene Aktivität zeigen (Kreft *et al.*, 2002). In dieser Arbeit wurde zunächst die Bindungseigenschaften der verschiedenen PrfA-Proteine an PrfA-abhängigen Promotoren der drei Spezies untersucht und anschließend mit den PrfA-überexprimierenden Stämmen EGD $\Delta$ prfApPrfA und EGD $\Delta$ prfApPrfA\* die Auswirkung verschiedener Medien und Kohlenstoffquellen auf Wachstum, PrfA-Aktivität und Expression der PTS-Gene.

Um ein tieferes Verständnis der Rolle der PTS-Permeasen als potentielle Modulatoren der PrfA-Aktivität zu erhalten, wurden Deletionsmutanten verschiedener PTS-Permeasen hergestellt und die Auswirkung der Deletion auf die Zuckeraufnahme und die PrfA-Aktivität *in vitro* und *in vivo* untersucht. Da bisherige PTS-Studien alle mit den komplexen Medien BHI und LB gemacht wurden und eine *ptsH*-Mutante zwar in BHI noch wachsen kann, aber nicht in einem definierten Minimalmedium, welches nur PTS-Kohlenstoffquellen enthält (Mertins *et al.*, 2007), wurden die Studien dieser Mutanten vor allem in Minimalmedium durchgeführt. Die erhaltenen Daten wurden schließlich noch mit dem Nachweis einer direkten Proteininteraktion von PrfA mit PTS-Komponenten unterstützt.

## C Material und Methoden

### C.1 Bakterienmedien und Antibiotika

#### C.1.1 Bakterienmedien

Die Medien bzw. Agarplatten wurden nach den aufgeführten Rezepten zusammengestellt und autoklaviert (20 min. bei 120°C). Das Minimal-Medium wurde mittels einem sterilen Filter (Porendurchmesser 22µm) sterilisiert. Nach dem Abkühlen auf unter 50°C konnten Zusätze wie Antibiotika steril zugeben und die Agarplatten gegossen werden.

##### C.1.1.1 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<sub>2</sub>O auf gewünschtes Volumen auffüllen und autoklavieren.

##### C.1.1.2 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<sub>2</sub>O auf gewünschtes Volumen auffüllen und autoklavieren.

##### C.1.1.3 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 <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (136,1 g/mol)	6,56 g/l	48,2 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (142,0 g/mol)	16,4 g/l	115 mM
MgSO <sub>4</sub> × 7 H <sub>2</sub> O (246,5 g/mol)	0,41 g/l	1,66 mM
Eisen-III-zitrat	100 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	
[Agar	15 g/l]	

Mit dH<sub>2</sub>O auf gewünschtes Volumen auffüllen und steril filtrieren. Anschließend die gewünschte molare Menge einer steril filtrierten Kohlenstoffquelle zugeben.

### C.1.1.4 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 dH<sub>2</sub>O auf gewünschtes Volumen auffüllen und autoklavieren.

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

### C.1.2 Antibiotika, Stammlösungen

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

Sterilfiltrieren und bei -20 °C aufbewahren.

## C.2 Verwendete Bakterienstämme

Name	Beschreibung	Herkunft
<i>E.coli</i> DH5α	siehe Stratagene Katalog	Stratagene
<i>E.coli</i> M15	siehe QIAexpressionist™	QIAGEN
<i>L. monocytogenes</i> Sv1/2a EGD	Hly <sup>+/-</sup>	S.H.E. Kaufmann
<i>L. monocytogenes</i> A42	Hly <sup>-</sup> , Δ <i>prfA</i>	B. Middendorf 1995
<i>L. monocytogenes</i> A42 x pERL3	Hly <sup>-</sup> , Δ <i>prfA</i> , Em <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup>	Diplomarbeit
<i>L. monocytogenes</i> A42 x pERL3 x pPrfA (EGD <sub>pPrfA</sub> )	Hly <sup>-</sup> , trägt auf pERL3 <i>prfA</i> -Gen aus EGD, Em <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup>	A. Marr 2004
<i>L. monocytogenes</i> A42 x pERL3 x pPrfA* (EGD <sub>pPrfA*</sub> )	Hly <sup>-</sup> , trägt auf pERL3 <i>prfA*</i> -Gen aus P14A, Em <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup>	A. Marr 2004
<i>L. monocytogenes</i> Sv1/2a EGD-e	schwach hämolytisch human- und tierpathogen Genom sequenziert (Glaser <i>et.al</i> 2002) Ausgangsstamm aller in dieser Arbeit hergestellten Deletionsmutanten	(Glaser <i>et al.</i> , 2001)
<i>L. monocytogenes</i> EGD-e Δ0021-4	lmo0021-0024 deletiert	diese Arbeit
<i>L. monocytogenes</i> EGD-e Δ0027	lmo0027 deletiert	diese Arbeit
<i>L. monocytogenes</i> EGD-e Δ0096-8	lmo0096-0098 deletiert	diese Arbeit
<i>L. monocytogenes</i> EGD-e Δ0738	lmo0738 deletiert	diese Arbeit
<i>L. monocytogenes</i> EGD-e Δ0781-4	lmo0781-0784 deletiert	diese Arbeit
<i>L. monocytogenes</i> EGD-e Δ1017	lmo1017 deletiert	S. Mertins (2008)
<i>L. monocytogenes</i> EGD-e Δ1035	lmo1035 deletiert	diese Arbeit

<i>L. monocytogenes</i> <b>EGD-e Δ1255</b>	lmo1255 deletiert	diese Arbeit
<i>L. monocytogenes</i> <b>EGD-e Δ1997/2000-2</b>	lmo1997 und lmo2000-2002 deletiert	diese Arbeit
<i>L. monocytogenes</i> <b>EGD-e Δ2683-5</b>	lmo2683-2685 deletiert	diese Arbeit
<i>L. monocytogenes</i> <b>EGD-e Δ2772</b>	lmo2772 deletiert	diese Arbeit
<i>L. monocytogenes</i> <b>EGD-e Δ2787</b>	lmo2787 deletiert	diese Arbeit
<i>L. monocytogenes</i> <b>EGD-e Δ0096-8 Δ0027</b>	lmo0096-0098 und lmo0027 deletiert	diese Arbeit
<i>L. monocytogenes</i> <b>EGD-e Δ0096-8 Δ0781-4 Δ0027</b>	lmo0096-0098, lmo0781-0784 und lmo0027 deletiert	diese Arbeit
<i>L. monocytogenes</i> <b>EGD-e ΔManPTS</b>	lmo0021-0024, lmo0096-0098, lmo0781-0784 und lmo1997/2000-2002 deletiert	diese Arbeit
<i>L. monocytogenes</i> <b>EGD-e ΔManPTS Δ0027</b>	lmo0021-0024, lmo0096-0098, lmo0781-0784, lmo1997/2000-2002 und lmo0027 deletiert	diese Arbeit
<i>L. monocytogenes</i> <b>EGD-e ΔManPTS Δ0027 Δ2683-5</b>	lmo0021-0024, lmo0096-0098, lmo0781-0784, lmo1997/2000-2002, lmo0027 und lmo2683-2685 deletiert	diese Arbeit
<i>L. monocytogenes</i> <b>EGD-e ΔManPTS Δ0027 Δ2683-5 Δ2708</b>	lmo0021-0024, lmo0096-0098, lmo0781-0784, lmo1997/2000-2002, lmo0027, lmo2683-2685 und lmo2708 deletiert	diese Arbeit
<i>L. monocytogenes</i> <b>EGD-e Δ2683-5 Δ0027</b>	lmo2683-2685 und lmo0027 deletiert	diese Arbeit
<i>L. monocytogenes</i> <b>EGD-e x pERL3</b>	Em <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup>	diese Arbeit
<i>L. monocytogenes</i> <b>EGD-e Δ0096-8 x pERL3</b>	Em <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup>	diese Arbeit
<i>L. monocytogenes</i> <b>EGD-e x p0096</b>	trägt auf pERL3 lmo0096-Gen Em <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup>	diese Arbeit
<i>L. monocytogenes</i> <b>EGD-e Δ0096-8 x p0096</b>	trägt auf pERL3 lmo0096-Gen Em <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup>	diese Arbeit

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.3 Verwendete Plasmide

Name	Beschreibung	Herkunft
pERL3	Shuttle-Vektor, Em <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup>	Hartl 1990
pERL3 x PrfA	Shuttle-Vektor, trägt <i>prfA</i> -Gen von <i>L.monocytogenes</i> EGD <sub>WT</sub> , Em <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup>	A. Marr, 2004
pERL3 x PrfA*	Shuttle-Vektor, trägt <i>prfA</i> * Gen von <i>L.monocytogenes</i> P14A, Em <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup>	A. Marr, 2004
pERL3 x 0096	Shuttle-Vektor, trägt lmo0096 Gen von <i>L.monocytogenes</i> , Em <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup>	diese Arbeit

pLSV101	Shuttle-Vektor, trägt einen temperatur-sensitiven Gram-positiven Replikationsursprung (bei 30°C aktiv, bei 42°C inaktiv), trägt Origin vom Typ ColE1 für die Replikation in <i>E.coli</i> , besitzt eine Erythromycinresistenz (Em <sup>R</sup> )	K. Knuth, 2004
<b>Derivate von pLSV101</b>	<b>Enthält in der Multiple-Cloning-site zwischen der <i>EcoRI</i>- und <i>BamHI</i>-Restriktionsschnittstelle homologe Sequenz zur Deletion von:</b>	
pLSV101_0021-0024	lmo0021 bis 0024 aus <i>L. monocytogenes</i> EGD-e	diese Arbeit
pLSV101_0027	lmo0027 aus <i>L. monocytogenes</i> EGD-e	diese Arbeit
pLSV101_0096-0098	lmo0096 bis 0098 aus <i>L. monocytogenes</i> EGD-e	diese Arbeit
pLSV101_0738	lmo0738 aus <i>L. monocytogenes</i> EGD-e	diese Arbeit
pLSV101_0781-0784	lmo0781 bis 0784 aus <i>L. monocytogenes</i> EGD-e	diese Arbeit
pLSV101_1997	lmo1997 aus <i>L. monocytogenes</i> EGD-e	diese Arbeit
pLSV101_2000-2002	lmo2000 bis 2002 aus <i>L. monocytogenes</i> EGD-e	diese Arbeit
pLSV101_2683-2685	lmo2683 bis 2685 aus <i>L. monocytogenes</i> EGD-e	diese Arbeit
pLSV101_2772	lmo2772 aus <i>L. monocytogenes</i> EGD-e	diese Arbeit
pLSV101_2787	lmo2787 ( <i>bvrB</i> ) aus <i>L. monocytogenes</i> EGD-e	diese Arbeit
pLSV101_2708	lmo2708 aus <i>L. monocytogenes</i> EGD-e	diese Arbeit
pQE30, pQE60	pQE Vektoren vermitteln Amp <sup>R</sup> ; <i>E. coli</i> M15 mit pQE wurden in Gegenwart von 100 mg/l Ampicillin und 25 mg/l Kanamycin kultiviert	Qiagen
<b>Derivate von pQE Vektoren</b>	<b>produziert His-Tag Fusionsprotein mit Template:</b>	
pQE30_0096	lmo0096 von <i>L. monocytogenes</i> EGD-e	diese Arbeit
pQE60_0783	lmo0783 von <i>L. monocytogenes</i> EGD-e	diese Arbeit
pQE30_2685	lmo2685 von <i>L. monocytogenes</i> EGD-e	diese Arbeit

## C.4 Verwendete Zelllinie

Name	Beschreibung	Herkunft
J774A.1	adhärent wachsende Zelllinie epithelialer Morphologie aus einem retikulärem Zell Sarkom der Maus Volle Beschreibung: ATCC TIB-67 (ACC170)	Stammsammlung

## C.5 Oligonukleotide

### C.5.1 für EMSA

Name	Sequenz 5'-3' Richtung	Gen/Bezugssequenz
BM1	tcc tat cta gaa gtg act ttt atg tt	Promotor <i>hly</i> <i>L. monocytogenes</i> EGD-e
BM2	gct tct cta gat gaa acg caa tat ta	Promotor <i>hly</i> <i>L. monocytogenes</i> EGD-e
CD1	gat gct tct aga aaa gtt gct gaa gc	Promotor <i>actA</i> <i>L. monocytogenes</i> EGD-e
CD2	tat tct aga att att tta aga ata tca	Promotor <i>actA</i> <i>L. monocytogenes</i> EGD-e
LivActA-1	cat ggg aag aag ttg gcg tta gat	Promotor <i>actA</i> <i>L. ivanovii</i>
LivActA-2	caa ttc atg aat tgc ttc aag aat agc a	Promotor <i>actA</i> <i>L. ivanovii</i>
LivHly-1	gcc tat cta gaa aat aat ttc aca tc	Promotor <i>hly</i> <i>L. ivanovii</i>
LivHly-2	ctt cca aga ttt aga aac gca ata tta	Promotor <i>hly</i> <i>L. ivanovii</i>
LSActA-1	cat ggc tcg gtg tag gta ttt c	Promotor <i>actA</i> <i>L. seeligeri</i>
LSActA-2	att cat gaa tta ttt aca gaa taa cac	Promotor <i>actA</i> <i>L. seeligeri</i>
LSHly-1	gtc tta tct aga tca aca tta aca ta	Promotor <i>hly</i> <i>L. seeligeri</i>



Name	Sequenz 5'-3' Richtung	Gen/Bezugssequenz
LSHly-2	cga ttc att agc ttg aaa cgc aat att a	Promotor <i>hly L. seeligeri</i>

## C.5.2 für Klonierung und Überprüfung pERL3-Stämme

Name	Sequenz 5'-3' Richtung	Gen/Bezugssequenz
pERL3-CheckF	tgg atg atc ctc cag cgc ggg	Multiple cloning site pERL3
pERL3-CheckR	cta gac tgc aga gct ctc g	Multiple cloning site pERL3
PrfA-CheckF	aac agc tga gct atg tgc g	<i>prfA L.monocytogenes</i> EGD-e
PrfA-CheckR	ata ccc taa aaa cat tag gc	<i>prfA L.monocytogenes</i> EGD-e
Lmo0096-XhoI-pERL3	atc att ggt act cga ggc ttt taa g	<i>lmo0095 L. monocytogenes</i> EGD-e
Lmo0096-SmaI-pERL3	cag aca taa tac ccg ggc tat ttt a	<i>lmo0096 L. monocytogenes</i> EGD-e

## C.5.3 für Klonierung in pLSV101

Name	Sequenz 5'-3' Richtung	Gen/Bezugssequenz
Lmo0021-BamHI	tgc cga acg gat cct tca atc g	<i>lmo0020 L. monocytogenes</i> EGD-e
Lmo0021-XhoI	acc atg tgc ctc gag aat ata atc c	<i>lmo0021 L. monocytogenes</i> EGD-e
Lmo0024-XhoI	ttt att caa cct cga gat tct agg tta aaa	<i>lmo0024 L. monocytogenes</i> EGD-e
Lmo0024-EcoRI	acg att atc taa aat aga att cgc aaa ctc	<i>lmo0025 L. monocytogenes</i> EGD-e
Lmo0027-BamHI	agc agg tct gga tcc gac ttt tc	<i>lmo0026 L. monocytogenes</i> EGD-e
Lmo0027-EcoRI	ctt tac cga cta aat gaa ttc att gat aat tat	<i>lmo0028 L. monocytogenes</i> EGD-e
Lmo0027-XhoI-for	taa tca cac tgc aga tct aag act ttt aaa t	<i>lmo0027 L. monocytogenes</i> EGD-e
Lmo0027-XhoI-rev	gct aat tgc tgc agt ttc att ttg ac	<i>lmo0027 L. monocytogenes</i> EGD-e
Lmo0096-BamHI	ggt gaa aat tat gga tcc tta tga aat aaa	<i>lmo0095 L. monocytogenes</i> EGD-e
Lmo0096-XhoI	acc gtg agt ctc gag gat aat tcc	<i>lmo0096 L. monocytogenes</i> EGD-e
Lmo0098-EcoRI	gta ttt tac gta aga att ctt tag gtc gtt	<i>lmo0099 L. monocytogenes</i> EGD-e
Lmo0098-XhoI	tgg tca ctt act cga gct tct gta aa	<i>lmo0098 L. monocytogenes</i> EGD-e
Lmo0738-BamHI	ttc tat tca agg gat cct tga aac aac	<i>lmo0737 L. monocytogenes</i> EGD-e
Lmo0738-EcoRI	ggt aat ctt tga att ctg ctc tat c	<i>lmo0739 L. monocytogenes</i> EGD-e
Lmo0738-XhoI-for	tta gat gta ctc gag tgc gat c	<i>lmo0738 L. monocytogenes</i> EGD-e
Lmo0738-XhoI-rev-2	tct tta gct agc tgc aga taa tcc att	<i>lmo0738 L. monocytogenes</i> EGD-e
Lmo0781-BamHI	aat tct agt tgg atc cat tac agt t	<i>lmo0780 L. monocytogenes</i> EGD-e
Lmo0781-HindIII	ttc att aac tgt aag ctt ttc act c	<i>lmo0781 L. monocytogenes</i> EGD-e
Lmo0784-HindIII	gtc ggg gag aag ctt tta taa tg	<i>lmo0784 L. monocytogenes</i> EGD-e
Lmo0784-EcoRI	taa aaa tag gga att cgc gga tga a	<i>lmo0785 L. monocytogenes</i> EGD-e
Lmo1035-BamHI	tac aga tat agg atc cga gat tct cg	<i>lmo1034 L. monocytogenes</i> EGD-e
Lmo1035-EcoRI	tgt tcc aac atg aat tct gta tag ggt tta a	<i>lmo1036 L. monocytogenes</i> EGD-e
Lmo1035-HindIII-for	aga caa taa cca aaa gct ttt aga agc aaa g	<i>lmo1035 L. monocytogenes</i> EGD-e
Lmo1035-HindIII-rev	ttt cca cca aca agc ttt aca acc tc	<i>lmo1035 L. monocytogenes</i> EGD-e
Lmo1255-BamHI	ttt aac tgc gat cct gtc tc	<i>lmo1256 L. monocytogenes</i> EGD-e
Lmo1255-XhoI-rev	tat taa ttc ctc gag agc gc	<i>lmo1255 L. monocytogenes</i> EGD-e
Lmo1255-XhoI-for	aaa aac act cga gta aaa agt ga	<i>lmo1255 L. monocytogenes</i> EGD-e
Lmo1255-EcoRI	cat cgt atg aat tca aat agt ac	<i>lmo1254 L. monocytogenes</i> EGD-e
Lmo1997-BamHI	tgc taa agg gat cct aga agt ag	<i>lmo1998 L. monocytogenes</i> EGD-e
Lmo1997-Xho-rev	gag tac act cga gaa ttg ctt tc	<i>lmo1997 L. monocytogenes</i> EGD-e
Lmo1997-Xho-for	gct tga aga act cga gga aga tt	<i>lmo1997 L. monocytogenes</i> EGD-e
Lmo1997-EcoRI	acg act ttg aat tct gct ttt agt g	<i>lmo1996 L. monocytogenes</i> EGD-e
Lmo2000-EcoRI	taa aag ggc gaa ttc aag cgc ca	<i>lmo1999 L. monocytogenes</i> EGD-e
Lmo2000-XhoI	tag gag cgc tgc agg gtt tat ta	<i>lmo2000 L. monocytogenes</i> EGD-e
Lmo2002-XhoI	cga tgg tct acc tgc aga aat tg	<i>lmo2002 L. monocytogenes</i> EGD-e

Name	Sequenz 5'-3' Richtung	Gen/Bezugssequenz
Lmo2002-BamHI	tac atc cca gga tcc cct aga aa	<i>lmo2003 L. monocytogenes</i> EGD-e
Lmo2683-BamHI	cct ttt ccc gga tcc tca ctt tat a	<i>lmo2682 L. monocytogenes</i> EGD-e
Lmo2683-HindIII	gct gaa cat aca agc ttg att gtt ttc	<i>lmo2683 L. monocytogenes</i> EGD-e
Lmo2685-HindIII	aaa gaa att gtt aag ctt tat aag aat aaa	<i>lmo2685 L. monocytogenes</i> EGD-e
Lmo2685-EcoRI	ttg gat agc gaa ttc tat acc aat t	<i>lmo2686 L. monocytogenes</i> EGD-e
Lmo2772-BamHI	aga gct gcc gga tcc tga aat ttc	<i>lmo2773 L. monocytogenes</i> EGD-e
Lmo2772-EcoRI	aac cag tgt ttt act aaa tga att caa cg	<i>lmo2771 L. monocytogenes</i> EGD-e
Lmo2772-XhoI-for	gga gtg agc tcg agg agt aat ac	<i>lmo2772 L. monocytogenes</i> EGD-e
Lmo2772-XhoI-rev	ttg cta act gct cga ggt cca tg	<i>lmo2772 L. monocytogenes</i> EGD-e
Lmo2708-BamHI	tct tat ctt tac gga tcc tta gca cg	<i>lmo2707 L. monocytogenes</i> EGD-e
Lmo2708-EcoRI	att ttt tga att ctc cgg cat atc gc	<i>lmo2709 L. monocytogenes</i> EGD-e
Lmo2708-XhoI-for	tac caga ac tcg aga tga aag ctt ag	<i>lmo2708 L. monocytogenes</i> EGD-e
Lmo2708-XhoI-rev	tta act cga gca tat ttt atc ctc cc	<i>lmo2708 L. monocytogenes</i> EGD-e
Lmo2787-BamHI	tac tgg aag agg atc cag gat tta ttg	<i>lmo2788 L. monocytogenes</i> EGD-e
Lmo2787-EcoRI	tgg cat tat gtg tag gaa ttc aaa ttt g	<i>lmo2786 L. monocytogenes</i> EGD-e
Lmo2787-XhoI-for	aaa gct act aat gat ctc gag gtt tc	<i>lmo2787 L. monocytogenes</i> EGD-e
Lmo2787-XhoI-rev-2	gaa ttt aga caa ctc gag ata ctt ccc	<i>lmo2787 L. monocytogenes</i> EGD-e
pLSV1BamHI	aat aag ctt ggc tgc agg tc	Multiple cloning site pLSV1
pLSV1EcoRI	gtt ttc cca gtc acg acg tt	Multiple cloning site pLSV1

### C.5.4 für Überprüfung und Sequenzierung der Deletion

Name	Sequenz 5'-3' Richtung	Gen/Bezugssequenz
Lmo0021-1	caa gga aaa ggc aca tac gta ag	<i>lmo0020 L. monocytogenes</i> EGD-e
Lmo0024-2	gag gtt cca caa act ttt cct tc	<i>lmo0025 L. monocytogenes</i> EGD-e
Lmo0027-1	gta tta cgg att ctg gat tg	<i>lmo0026 L. monocytogenes</i> EGD-e
Lmo0027-2	tct ccg cta att aat aca cg	<i>lmo0028 L. monocytogenes</i> EGD-e
Lmo0096-1	aga agg gtt tag act ggc aaa g	<i>lmo0095 L. monocytogenes</i> EGD-e
Lmo0098-2	acc gaa acg agc gct tca taa c	<i>lmo0099 L. monocytogenes</i> EGD-e
Lmo0738-1	gaa att ggc gca gat ttt att g	<i>lmo0737 L. monocytogenes</i> EGD-e
Lmo0738-2	aac cca ata ttt cac tcg acc	<i>lmo0739 L. monocytogenes</i> EGD-e
Lmo0781-1	caa gat atc agc gta ggt att tc	<i>lmo0780 L. monocytogenes</i> EGD-e
Lmo0784-2	acc cct tta aag gtc ttc ctt ta	<i>lmo0785 L. monocytogenes</i> EGD-e
Lmo1035-1	cac att ggt ttt ttt atc cga ac	<i>lmo1034 L. monocytogenes</i> EGD-e
Lmo1035-2	tta gaa acg gtt tct aaa gct tc	<i>lmo1036 L. monocytogenes</i> EGD-e
Lmo1255-1	ggg tat ttt tat gct gtt tat tg	<i>lmo1256 L. monocytogenes</i> EGD-e
Lmo1255-2	caa aaa ttc acg aca gca aag ag	<i>lmo1254 L. monocytogenes</i> EGD-e
Lmo1997-1	ggc aga tcg ttt tat gta ttt agc	<i>lmo1998 L. monocytogenes</i> EGD-e
Lmo1997-2	aac gtt tca gca gca tac gta ttg	<i>lmo1996 L. monocytogenes</i> EGD-e
Lmo2000-2	tat cac ttg tgg taa atg agc gg	<i>lmo1999 L. monocytogenes</i> EGD-e
Lmo2002-1	aag gtt tgg tcg ttc gca aaa ac	<i>lmo2003 L. monocytogenes</i> EGD-e
Lmo2683-1	agc aag tac gga tac cgc ata	<i>lmo2682 L. monocytogenes</i> EGD-e
Lmo2685-2	ctc tgg ttc aag cgc tag tta	<i>lmo2686 L. monocytogenes</i> EGD-e
Lmo2708-1	ggt tct ttt ata tca tca gga aac	<i>lmo2709 L. monocytogenes</i> EGD-e
Lmo2708-1	ggg ata tat ata att tct gtg tg	<i>lmo2707 L. monocytogenes</i> EGD-e
Lmo2772-1	aga ata tgc agt ggc caa ag	<i>lmo2773 L. monocytogenes</i> EGD-e
Lmo2772-2	ccc aag cga taa ata att ccc	<i>lmo2771 L. monocytogenes</i> EGD-e
Lmo2787-1	agc taa gaa ttc cgt taa aac c	<i>lmo2788 L. monocytogenes</i> EGD-e
Lmo2787-2	agc cac ata act aat tgc agc	<i>lmo2786 L. monocytogenes</i> EGD-e

## C.5.5 für Klonierung und Sequenzierung in pQE30 und pQE60

Name	Sequenz 5'-3' Richtung	Gen/Bezugssequenz
0096-BamHI	gag gga aag gat ccg tag gaa tta tc	<i>lmo0096 L. monocytogenes</i> EGD-e
0096-SalI	acc tcc tat gtc gac ttt tta ttg tgt c	<i>lmo0096 L. monocytogenes</i> EGD-e
0096-test1	gct ttc tca tca cgt ttt ac	<i>lmo0096 L. monocytogenes</i> EGD-e
0096-test2	tgg act ggg ata aca tta gc	<i>lmo0096 L. monocytogenes</i> EGD-e
0783-NcoI	gga cga ttt acc atg gaa att cgc	<i>lmo0783 L. monocytogenes</i> EGD-e
0783-BglII	agc cgc gga tag atc ttt tat ctt	<i>lmo0783 L. monocytogenes</i> EGD-e
2685-BamHI	gac gtg ttt agg atc cga ttt aga g	<i>lmo2685 L. monocytogenes</i> EGD-e
2685-HindIII	aac tgg ttt tta agc ttt tat tta ttc tta	<i>lmo2685 L. monocytogenes</i> EGD-e
pQE-for	cccgaaaagtgccacctg	für pQE Vektoren (plus Insert) und Klontest-PCR
pQE-rev	gttctgaggtcattactgg	für pQE Vektoren (plus Insert) und Klontest-PCR

## C.5.6 für Real-Time-PCR

Name	Sequenz 5'-3' Richtung	Gen/Bezugssequenz
RT-0021-1	tta ctg aag aaa tgg ggg tga cg	<i>lmo0021 L. monocytogenes</i> EGD-e
RT-0021-2	aac att tga gcc gca tta cac gg	<i>lmo0021 L. monocytogenes</i> EGD-e
RT-0022-1	ggt gcc tta aaa acc gca gta	<i>lmo0022 L. monocytogenes</i> EGD-e
RT-0022-2	cga aga gca tga ggt gat ttt acg	<i>lmo0022 L. monocytogenes</i> EGD-e
RT-0023-1	tcc agt ggg gct ttt aat ggt tc	<i>lmo0023 L. monocytogenes</i> EGD-e
RT-0023-2	ggt aat gcg ccg tac caa ata ttc	<i>lmo0023 L. monocytogenes</i> EGD-e
RT-0024-1	att aat ggg acc gtt tgc tgg tg	<i>lmo0024 L. monocytogenes</i> EGD-e
RT-0024-2	acc cag ata act aca cct gtc ac	<i>lmo0024 L. monocytogenes</i> EGD-e
RT-0027-1	tcg cag gtc taa ttt tag gtg gtt	<i>lmo0027 L. monocytogenes</i> EGD-e
RT-0027-2	tga gca aaa gat gca cca aat gtc	<i>lmo0027 L. monocytogenes</i> EGD-e
RT-0096-1	gca agt aac agc tac tga aca	<i>lmo0096 L. monocytogenes</i> EGD-e
RT-0096-2	ttt gtc cat gca gtg gct act	<i>lmo0096 L. monocytogenes</i> EGD-e
RT-0097-1	tac gca gcg tag agt ggt tac at	<i>lmo0097 L. monocytogenes</i> EGD-e
RT-0097-2	acc atc tgt taa cca agc tgg ca	<i>lmo0097 L. monocytogenes</i> EGD-e
RT-0098-1	gct tct ctt gcc ttg agt gga aa	<i>lmo0098 L. monocytogenes</i> EGD-e
RT-0098-2	gta atc cac cag aaa ggt cat cag	<i>lmo0098 L. monocytogenes</i> EGD-e
RT-0738-1	gtg cgt tct ggc aag tat tag tta	<i>lmo0738 L. monocytogenes</i> EGD-e
RT-0738-2	ata ctc caa gtg atg cac ctg ctt	<i>lmo0738 L. monocytogenes</i> EGD-e
RT-0781-1	gaa cgg ttc gtc cag tac tt	<i>lmo0781 L. monocytogenes</i> EGD-e
RT-0781-2	atc cgt aga aca cgc ccc aat aa	<i>lmo0781 L. monocytogenes</i> EGD-e
RT-0782-1	tgc att cca aca cat ggc tga ta	<i>lmo0782 L. monocytogenes</i> EGD-e
RT-0782-2	atc gcg ata cgc ata gct tga ag	<i>lmo0782 L. monocytogenes</i> EGD-e
RT-0783-1	agc acc tcc agg cgt taa agc ta	<i>lmo0783 L. monocytogenes</i> EGD-e
RT-0783-2	cga ggg tta gta cat ctg tag ga	<i>lmo0783 L. monocytogenes</i> EGD-e
RT-0784-1	gga tac ttc tga agg cgt cat tt	<i>lmo0784 L. monocytogenes</i> EGD-e
RT-0784-2	cgc ata gag agc gtt tca agc aa	<i>lmo0784 L. monocytogenes</i> EGD-e
RT-1035-1	gca agt ggc tgt cat gtt cgg att	<i>lmo1035 L. monocytogenes</i> EGD-e
RT-1035-2	tta ctg cca taa ccg cgc cag ttt	<i>lmo1035 L. monocytogenes</i> EGD-e
RT-1719-1	aat gct agc aat cga agc ggc aa	<i>lmo1719 L. monocytogenes</i> EGD-e
RT-1719-2	gat act tet gct ttt tcg cca cg	<i>lmo1719 L. monocytogenes</i> EGD-e
RT-1720-1	gca gtt gca gaa gct gat ttc ga	<i>lmo1720 L. monocytogenes</i> EGD-e
RT-1720-2	cgc aac tgg aat acc taa tgg	<i>lmo1720 L. monocytogenes</i> EGD-e
RT-1997-1	ttg cca gtg agg tag cta aac tc	<i>lmo1997 L. monocytogenes</i> EGD-e

Name	Sequenz 5'-3' Richtung	Gen/Bezugssequenz
RT-1997-2	aaa agc gga ata ttc acg cct gc	<i>lmo1997 L. monocytogenes</i> EGD-e
RT-2000-1	aat ggg tcc tct tag tgg gat tg	<i>lmo2000 L. monocytogenes</i> EGD-e
RT-2000-2	gct gga ata ttg aaa ata agg agg	<i>lmo2000 L. monocytogenes</i> EGD-e
RT-2001-1	ata cgc act cga ggg aaa ttc ac	<i>lmo2001 L. monocytogenes</i> EGD-e
RT-2001-2	ggg atg gca tca agt acg ttt tg	<i>lmo2001 L. monocytogenes</i> EGD-e
RT-2002-1	tcg taa gtc agc aat acg gct tg	<i>lmo2002 L. monocytogenes</i> EGD-e
RT-2002-2	tgt aag cgt ctt caa ccg att cg	<i>lmo2002 L. monocytogenes</i> EGD-e
RT-2683-1	cga agc aga agc agc taa cca tt	<i>lmo2683 L. monocytogenes</i> EGD-e
RT-2683-2	gct aat gga ata cct ttt ggc tct a	<i>lmo2683 L. monocytogenes</i> EGD-e
RT-2684-1	gca gct ggt gtg act aac tta gt	<i>lmo2684 L. monocytogenes</i> EGD-e
RT-2684-2	gat aat gtt cgc acc gtg taa acc	<i>lmo2684 L. monocytogenes</i> EGD-e
RT-2685-1	ttc cgc taa aaa agg gga ttt cg	<i>lmo2685 L. monocytogenes</i> EGD-e
RT-2685-2	tct tgt gcg tga acg agt aga ag	<i>lmo2685 L. monocytogenes</i> EGD-e
RT-2772-1	cgt tat gac tgg tat gca cta tgc	<i>lmo2772 L. monocytogenes</i> EGD-e
RT-2772-2	gct cgg aaa aat aca ccg aaa gtc	<i>lmo2772 L. monocytogenes</i> EGD-e
RT-2787-1	tcg gta gtt gtt ggg cta ctt tat	<i>lmo2787 L. monocytogenes</i> EGD-e
RT-2787-2	act gcc gtt tgg gca aaa ctt g	<i>lmo2787 L. monocytogenes</i> EGD-e
actA-qRT-F	ata gcg cag cgg aaa tta aa	<i>actA L. monocytogenes</i> EGD-e
actA-qRT-R	aag cat ccg caa ctg act ct	<i>actA L. monocytogenes</i> EGD-e
hly-qRT-F	ccg cca aga aaa ggt tac aa	<i>hly L. monocytogenes</i> EGD-e
hly-qRT-R	tcg ctt tta cga gag cac ct	<i>hly L. monocytogenes</i> EGD-e
plcA-qRT-F	cga gca aaa cag caa cga ta	<i>plcA L. monocytogenes</i> EGD-e
plcA-qRT-R	ccg cgg aca tct ttt aat gt	<i>plcA L. monocytogenes</i> EGD-e
plcB-qRT-F	aaa gcg gac tac ccg aaa at	<i>plcB L. monocytogenes</i> EGD-e
plcB-qRT-R	aac ctg cca aag ttt gct gt	<i>plcB L. monocytogenes</i> EGD-e
prfA-qRT-F	acg gga agc ttg gct cta tt	<i>prfA L. monocytogenes</i> EGD-e
prfA-qRT-R	tgc gat gcc act tga ata tc	<i>prfA L. monocytogenes</i> EGD-e
rpoB-qRT-F	cac cct gaa gct cca ttt gt	<i>rpoB L. monocytogenes</i> EGD-e
rpoB-qRT-R	aca cga cga acc cag att tc	<i>rpoB L. monocytogenes</i> EGD-e

## C.6 Verwendete Proteine

Name	Beschreibung	Herkunft, Hersteller
m-PrfA <sub>nt</sub>	wildtypisches PrfA von <i>L. monocytogenes</i>	Stefanie Müller-Altrock & Nico Marr
m-PrfA* <sub>nt</sub>	wie m-PrfA <sub>nt</sub> , aber mit G145S Substitution	Stefanie Müller-Altrock & Nico Marr
m-PrfA	wildtypisches PrfA von <i>L. monocytogenes</i> mit N-terminaler His <sub>6</sub> -Markierung und anschließender Enterokinaseschnittstelle	Regine Böckmann & Norman Mauder
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 <sub>6</sub> -Markierung	Norman Mauder
sm-PrfA	wie s-PrfA, doch C-terminale 38 AS entsprechen denen von m-PrfA (Hybridprotein)	Norman Mauder
i-PrfA	wildtypisches PrfA von <i>L. ivanovii</i> mit N-terminaler His <sub>6</sub> -Markierung	Stefanie Müller-Altrock
Lmo0096	Protein mit der Sequenz von Lmo0096, einem Mannose-spezifischen EIIAB mit N-terminaler His <sub>6</sub> -Markierung	diese Arbeit
Lmo0783	Protein mit der Sequenz von Lmo0783, einem Mannose-spezifischen EIIB mit C-terminaler His <sub>6</sub> -Markierung	diese Arbeit
Lmo1017	Protein mit der Sequenz von Lmo1017, einem Mannose-	Stefanie Müller-Altrock

Lmo2259	spezifischen EIIAB mit N-terminaler His <sub>6</sub> -Markierung Protein mit der Sequenz von Lmo2259, einem Mannose- spezifischen EIIAB mit N-terminaler His <sub>6</sub> -Markierung	Stefanie Müller-Altrock
Lmo2685	Protein mit der Sequenz von Lmo2685, einem Cellobiose- spezifischen EIIA mit N-terminaler His <sub>6</sub> -Markierung	diese Arbeit

## C.7 Allgemeine Puffer und Reagenzien

### C.7.1.1 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 <sub>n</sub>	c <sub>m</sub>
NaCl (58,44 g/mol)	2,74 M	160 g/l
KCl (74,56 g/mol)	54 mM	4 g/l
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (141,96 g/mol)	162 mM	23 g/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (136,09 g/mol)	29 mM	4 g/l

Mit dH<sub>2</sub>O auf gewünschtes Volumen auffüllen und autoklavieren.

### C.7.1.2 TBE (Tris Borsäure EDTA)

Puffer für Elektrophorese mit Agarose-, EMSA- (C.20) oder Harnstoffgelen (C.22).

Stammlösung, 10×	c <sub>n</sub>	c <sub>m</sub>
Tris Base (121,14 g/mol)	0,89 M	109,03 g/l
Borsäure (61,8 g/mol)	0,89 M	55,62 g/l
Na <sub>2</sub> -EDTA × H <sub>2</sub> O (372,3 g/mol)	0,02 M	9,31 g/l

Mit dH<sub>2</sub>O auf gewünschtes Volumen auffüllen. Die 1× Lösung hat pH 8,3.

## 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 <sub>2</sub>	1,5 mM (oder entsprechend angepasste Konzentration)
Taq-/Pfu-Polymerase	1 U für 1 kb Extension
DNA (Template)	max. 1 µg (20 ng)

Mit dH<sub>2</sub>O auf 100 µl auffüllen.

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

Bromphenolblau	0,1%
Xylen Cyanol FF	0,2%
Saccharose	40% (w/v)

### C.8.3 Anwendung von Ethidiumbromid

Stammlösung (10 mg Ethidiumbromid pro ml dH<sub>2</sub>O) dunkel und kühl lagern.

Ethidiumbromid-Stammlösung im Verhältnis 1:10000 (1µg/ml Endkonzentration) in ein Pufferbad geben und das fertige Gel 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 dH<sub>2</sub>O 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 von 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 ½ Volumen 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% Ethanol 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 <sub>4</sub> (246 mg MgSO <sub>4</sub> × 7 H <sub>2</sub> 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 <sub>4</sub>	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 OD<sub>600</sub> 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 <sub>2</sub> (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 dH<sub>2</sub>O auf gewünschtes Volumen auffüllen und sterilfiltrieren.

### C.8.5.2.2 Durchführung

- Übernachtkultur 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 OD<sub>600</sub> 0,5 (80-90 Klett) wachsen lassen.
- Penicillin G mit einer Endkonzentration von 5 µg/ml hinzugeben und bis OD<sub>600</sub> 0,65 (110-120 Klett) wachsen lassen.
- Für 10 min bei 1200 rcf und 4 °C abzentrifugieren.
- Bakterien in 5 ml (1/10 Kulturvolumen) SMHEM waschen.
- Gewaschenes Bakterienpellet in 0,5 ml (1/100 Kulturvolumen) SMHEM aufnehmen, zu je 100 µl aliquotieren und bei -80 °C aufbewahren.

## C.8.6 Restriktionsverdau

Etwa 3 µg DNA (ds) werden zusammen mit 1 µl Restriktionsenzym und 2 µl passendem Puffer (10×) in einem Gesamtvolumen von 20 µl 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 etwa 30 bis 50%.

## C.8.7 Ligation

	blunt end	sticky end
Volumen	20 µl	20 µl
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 µg)	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 µg doppelsträngige DNA (1 kb) entspricht 1500 fmol (1,5 pmol).

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

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

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

## 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 µl 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 30 bis 60 min auf Eis inkubieren.
- Den Ansatz für 90 s bei 42 °C inkubieren und anschließend sofort für 2 min auf Eis stellen.
- 800 µl 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 elektrokompente Listerien

- Etwa 100  $\mu$ l der bei -80 °C gelagerten kompetenten Zellen (Herstellung beschrieben unter C.8.5.2) auf Eis auftauen.
- Die kompetenten Zellen und 1-5 $\mu$ g Plasmid-DNA (maximal 3  $\mu$ l) mischen und in einer Elektroporationsküvette (PEQLAB Electroporation Cuvette) auf Eis abkühlen.
- Ansatz in einem MicroPulser™ (Bio-Rad) für ca. 3,5 ms einer Spannung von 2,25 kV aussetzen und anschließend sofort 1 ml BHI-Medium hinzugeben.
- Bakterien für 1h (6h, wenn das Plasmid Erythromycinresistenz verleihen soll) unter Schütteln bei 30 °C inkubieren.
- Bakterien auf BHI-Agar-Platte mit Antibiotika ausplattieren und entsprechend inkubieren.

### C.8.9 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 werfen.
- 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 werfen.
- 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 werfen.

### C.8.10 DNA-Präzipitation

2,5 Volumen (kaltes,) reines Ethanol und ein Zehntel Volumen 3M Natriumacetat (pH 4,8) zur DNA/RNA-Lösung hinzugeben und eine halbe Stunde bei -20°C lagern. Dann bei 4 °C und 14000 rpm abzentrifugieren. Pellet zweimal mit kaltem 70% (v/v) Ethanol waschen (14000 rpm, 5 Minuten, 4 °C). Anschließend das Pellet in der SpeedVac® trocknen und in dH<sub>2</sub>O aufnehmen. Die gereinigte DNA bei -20°C aufbewahren.

### C.8.11 DNA/RNA-Messung

Die Konzentration von Nukleinsäuren wird über die Messung der optischen Dichte oder Extinktion ( $E_\lambda$ ) 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.

$E_\lambda$  = Extinktion bei Wellenlänge  $\lambda$  (in nm),  $c$  = Konzentration,  $\epsilon$  = spezifischer Extinktionskoeffizient,  $d$  = Schichtdicke der gemessenen Lösung

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

$$R = (E_{260} - E_{320}) / (E_{280} - E_{320})$$

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

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

### 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.

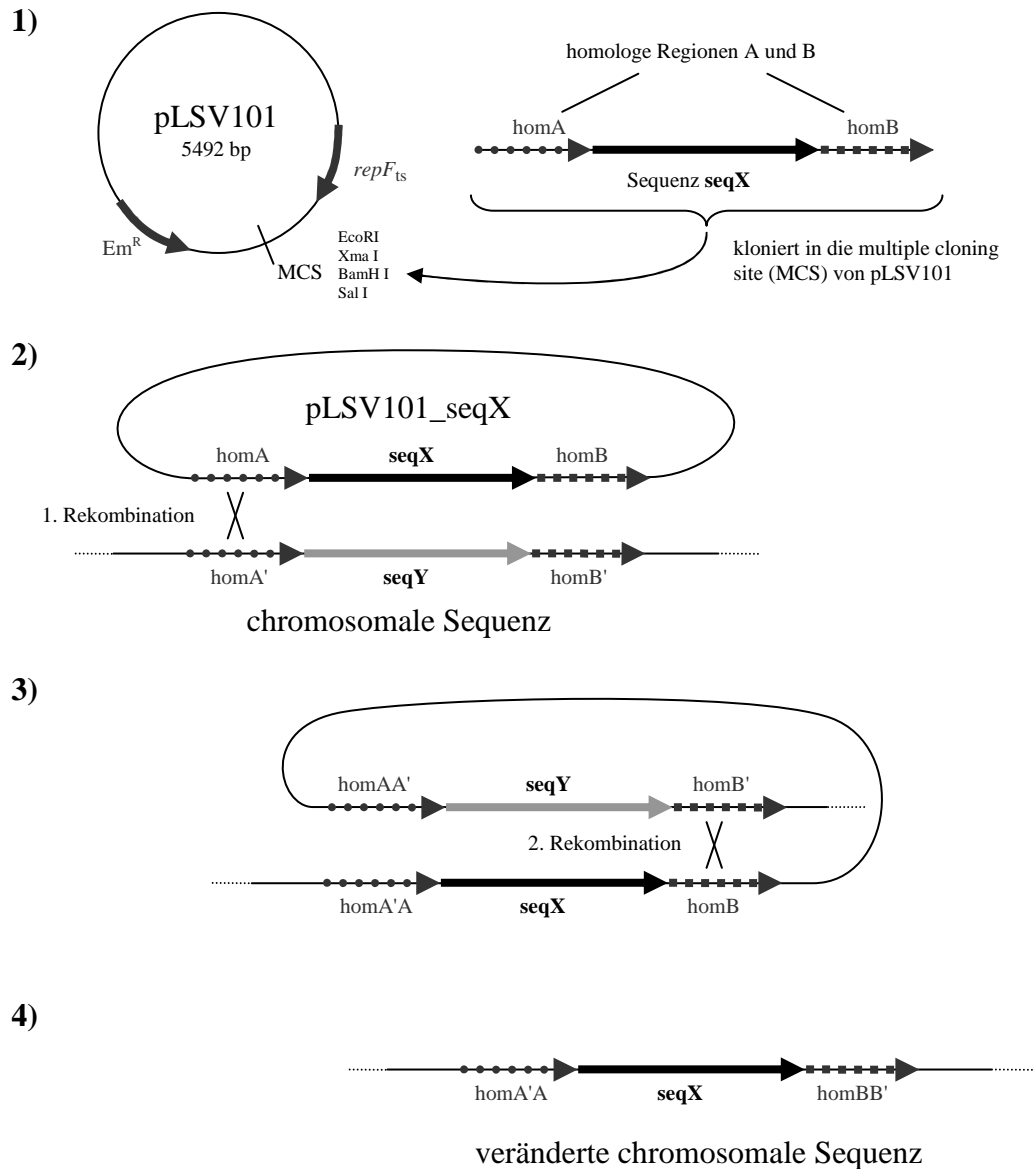


Dieser Vektor verleiht Antibiotikaresistenz und kann aufgrund seines temperatursensitiven Origins in grampositiven Bakterien bei Temperaturen deutlich über 30 °C nicht extrachromosomal replizieren. Wird der Vektor mit Sequenzen ausgestattet, die zum Genom des zu mutierenden Bakteriums homolog sind, so kann eine Integration des Vektors ins bakterielle Chromosom erfolgen. Die so entstandenen Mutanten können bei 30 °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 15).

### 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 $\alpha$  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 2 Tagen wird von einem in PCR positiv auf das Plasmid getesteten 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 über Nacht bei 42°C inkubiert.
- Die Integration des Plasmids in das Chromosom wird mittels PCR überprüft.
- Positive Klone werden in BHI ohne Antibiotikum bei 30°C 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) die Verdünnungsstufe  $10^{-6}$  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 15.** 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 (nach N. Mauder, Dissertation, 2006).

## 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 µl zusammen mit 4 µl 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	(ohne QSM, dieses wurde erst anschließend hinzu pipettiert)
Denaturierung	96 °C	20 s	30 Zyklen
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 bei SeqLab

Während der Promotionszeit wurde die Methode der Sequenzierung verändert und die DNA mit Primer direkt zur Firma SeqLab, Postfach 3343, Göttingen versendet. Dafür wurden 20 pmol Primer und 25 µg / 100 bp DNA bei PCR-Produkt oder 700 µg Plasmid-DNA in einem Gesamtvolumen von 7 µl vereint. Von der Firma SeqLab wurde eine extended HotShot Sequenzierung durchgeführt.

## C.10 Arbeiten mit Bakterien

### C.10.1 Untersuchung des Wachstumsverhaltens von *Listeria monocytogenes*

Eine bei 37°C gewachsene Listerien-ÜN-Kultur wurde 1:10 verdünnt und in einem Erlenmeyerkolben bei 37°C im Schüttler (190 rpm) inkubiert. Die optische Dichte der Listeriensuspension wurde in regelmäßigen Abständen im Klett-Photometer bzw. im Photometer bei 600 nm gemessen und notiert. Aus den Messwerten bis zur stationären Phase konnten Wachstumskurven erstellt werden. Alternativ konnte die Bakterienkultur in bestimmten Wachstumsphasen abzentrifugiert werden (6000 rpm; 4°C; 15 min) und das Pellet für die spätere Isolierung von RNA oder zytoplasmatischen Proteinen bei -80°C gelagert werden oder der Überstand zur Isolierung von Überstandspoteinen bei -20°C eingefroren werden.

### C.10.2 Anzucht von Listerien in XAD4-haltigem Medium

Amberlite © XAD4 (Sigma) wurde in einem Erlenmeyerolben in H<sub>2</sub>Odest. autoklaviert und anschließend das Wasser unter der Sterilbank mittels Vakuumpumpe abgesaugt. Steriles Medium wurde hinzugefügt, so dass eine 1%ige XAD4-Lösung (w/v) entsteht. Das XAD4-haltige Medium wurde dann mit Listerien aus einer ÜN-Kultur angeimpft, bei 37°C im Schüttler (190 rpm) inkubiert und wie unter C.1.1 beschrieben behandelt.

### C.10.3 Medien-Shift Experimente

Die verschiedenen Listerien-Stämme wurden zunächst in einem Medium bis zu der gewünschten optischen Dichte OD<sub>600nm</sub> von 0.2 – 0.5 herangezogen. Das nach der Zentrifugation (6000 rpm, 5 min, 4°C) erhaltene Pellet wurde zweimal mit 1x PBS bzw. mit dem Medium, in das überführt wird, gewaschen und anschließend in dem gleichen Volumen neuem Medium resuspendiert. In regelmäßigen Abständen wurde die optische Dichte der Listeriensuspension im Klett-Photometer bzw. im Photometer bei 600 nm gemessen und notiert.

### C.10.4 Messung <sup>14</sup>C-Glucoseaufnahme in *L. monocytogenes*

#### Transportpuffer:

Tris-HCl, pH 7,2	50 mM
MgCl <sub>2</sub>	20 mM

Zur Bestimmung der Menge an aufgenommener Glukose wurde der entsprechende Stamm in LB-Medium mit 50 mM Glukose bis zu einer OD<sub>600nm</sub> von 0.4 und 1.0 in einem 50 ml Ansatz herangezogen. 20 ml Kultur wurden durch Zentrifugation (5000 rpm, 3 min, 4 °C) pelletiert und das Pellet dreimal mit 5 ml eiskaltem Transportpuffer gewaschen. Anschließend wurde das Pellet in 1 ml Transportpuffer resuspendiert, ein 850 µl Aliquot abgenommen und bis zur Aufnahmemessung auf Eis gehalten. Zur Bestimmung der Lebendzellzahl

(CFU) wurden 100 µl von dem verbleibenden Bakterienansatz in Transportpuffer bei einer Verdünnungsstufe von  $10^{-7}$  ausplattiert.

Aus dem Aliquot wurden als Nullwert 50 µl Bakterien entnommen, auf einen Nitrozellulosefilter mit einer Porengröße von 0,45 µm (Sanatorius) pipettiert. Für die Messung wurden die verbliebenen 800 µl mit 2 mM Glukose und 2 µCi/ml in einem Gemisch aus [ $^{14}\text{C}$ ] Glukose (GE Healthcare) und [ $^{12}\text{C}$ ] Glukose versetzt und bei 37°C im Heizblock inkubiert. Nach 15 sec, 30 sec, 45 sec, 60 sec, 75 sec und 90 sec wurden jeweils 50 µl Probe entnommen, auf einen Nitrozellulosefilter gesaugt (in der Sampling Mannifold 1225 von Millipore) und dreimal mit 3 ml kalter Saline (0,9 % NaCl) gewaschen. Anschließend wurden alle Filter bei 42°C 45 - 60 min getrocknet. Die trockenen Filter wurden je in ein Szintillationsröhrchen mit 3 ml Szintillationsflüssigkeit (Rotiszint® von Roth) gegeben und die Menge an Radioaktivität auf den Filtern im Szintillationszähler gemessen. Als Standard für die Gesamtmenge an eingesetzter Radioaktivität wurden aus jedem Ansatz 50 µl unfiltrierte Probe gemessen.

Mittels der gemessenen DPM (Disintegration / min), der Avogadro-Konstante und Einberechnung der CFU (Lebendzellzahl) lässt sich die Anzahl der aufgenommenen Glukosemoleküle pro Zelle berechnen.

## C.11 Präparation von listeriellen Proteinen

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

### C.11.1 Zytosolische Proteine

Das Bakterienpellet wird in 5ml 1xPBS gewaschen und anschließend in 850µl kaltem Lysispuffer (1xPBS mit Complete Mini, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail Tablets; Roche) resuspendiert und in Lysing Matrix B (Q-Biogene) überführt. Die Proben werden dann in einem FastPrep™ FP120 Gerät (Savant Instruments, Inc.) sechsmal für jeweils 30 Sekunden mit 6,5facher Geschwindigkeit geschüttelt. Um ein Denaturieren der Proteine zu verhindern werden die Lysing Matrix B Caps nach jeder Runde für eine Minute auf Eis abgekühlt. Anschließend werden die Zelltrümmer durch Zentrifugation bei 4 °C und 20000 rcf für 30 min sedimentiert und der Überstand mit den zytosolischen Proteinen abgenommen, aliquotiert und bei -80°C eingefroren. Die Proteinkonzentration wird mittels Bradford-Methode (Bio-Rad-Protein Microassay, BioRad) bestimmt.

### C.11.2 Überstandsproteine

#### Harnstoffpuffer:

Harnstoff	7 M
Thioharnstoff	2 M
DTT	70 mM

Kulturüberstände werden mit 10% TCA (Trichloressigsäure, Endkonzentration) auf Eis für 30-60 min präzipitiert und anschließend bei 5000 rcf für 30 bis 60 Minuten abzentrifugiert. Der Überstand wird abgezogen und das Präzipitat in 4 ml Aceton von der Wand des Reaktionsgefäßes gewaschen. Anschließend wird das Pellet zweimal in 900 µl Aceton gewaschen und danach bei 30 °C im offenem Probenbehälter getrocknet. Das trockene Pellet wird in 150 µl Harnstoffpuffer und 15 µl Chaps (in  $\text{dH}_2\text{O}_{\text{steril}}$  gelöstes 3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-Propansulfonat) aufgenommen und über Nacht im Kühlschrank gelöst.

Die Proteinkonzentration wird mittels Bradford-Methode (Bio-Rad-Protein Microassay, BioRad) bestimmt.

## 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

In 2 ml Reagiergefäßen wird je 1 ml frisches Pferdeblut (oder Schafsblut) mehrmals mit kalter Saline (0,9% (w/v) NaCl) gewaschen (Zentrifugationen mit 2500 rpm für 5 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, aber nicht länger als 24h.

### C.12.1.2 Durchführung des Assays

Bakterielle Gesamtzellsuspensionen einer gewünschten optischen Dichte (je 20 bis 50 µl) bzw. reines Medium als Negativkontrolle werden mit 1 ml 2% Erythrozytensuspension für 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend werden die Proben abzentrifugiert (2500 rpm, 5 min) und die Absorption der Überstände durch frei gewordenes Hämoglobin bei 543 nm photometrisch gemessen (Ultraspec 2100 pro Photometer, Amersham). Aufgrund relativ hoher Schwankungen empfiehlt es sich, jeden Kulturüberstand in vier bis fünf getrennten Proben zu messen, oder mehrfache Probenreihen mit Konzentrationsgradienten herzustellen.

## C.13 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Bei der SDS-PAGE handelt es sich um eine Methode, mit der Proteine entsprechend ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden.

Die Proteinauftrennung mittels SDS-PAGE findet unter denaturierenden Bedingungen in Gegenwart von Natriumdodecylsulfat (SDS) und Mercaptoethanol statt. Durch die Bindung von SDS an die hydrophobe Region des Proteinmoleküls bildet sich ein SDS-Protein-Komplex, dessen negative Ladungsenergie etwa proportional zum Molekulargewicht des Proteins ist. Der Überschuss an negativen Ladungen ermöglicht die Gelelektrophorese. Mercaptoethanol ist eine reduzierende Substanz, die alle Disulfid-Brücken-Bindungen im Protein löst. Auf diese Weise werden Proteine, unabhängig von ihrer ursprünglichen Ladung und Konformation, der Größe nach im Spannungsfeld von der Kathode zur Anode hin aufgetrennt.

### Zusammensetzung eines 12%igen SDS-Polyacrylamidgels:

#### 30 % Acrylamid-Lösung:

Acrylamid-Lösung	292 g/l
Bisacrylamid	8 g/l

#### 1,5 M Tris-HCl (pH 8,8):

Tris Base	181,5 g/l
konz. HCl	bis pH 8,8

#### 1 M Tris-HCl (pH 6,8):

Tris Base	121 g/l
konz. HCl	bis pH 6,8

#### 10 % SDS (w/v)

#### 10 % Ammonium Persulfat (w/v)

#### 4 x Laemmli-Puffer:

Glyzerin	20 ml
10 % SDS	15 ml
2 M Tris pH 6,8	10 ml
β-Mercaptoethanol	3,75 ml
Bromphenolblau	50 mg
ad 50 ml H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	

#### PAGE-Puffer:

Tris Base	3 g/l
Glycin	14,4 g/l
SDS	1 g/l

Reagenzien	Trenngel 12 %	Sammelgel 5 %
30 % Acrylamid Mix	8,0 ml	1,0 ml
1,5 M Tris (pH 8,8)	5,0 ml	-----
1 M Tris (pH 6,8)	-----	750 µl
10 % SDS	200 µl	60 µl
10 % Ammonium Persulfat	200 µl	60 µl
TEMED	8,0 µl	6,0 µl
	ad 20 ml H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad 6 ml H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>

Zur Denaturierung wurden die Proteinproben in 1x Laemmli-Puffer bei 95°C 5 min aufgekocht. Die Elektrophorese erfolgt bei 25 mA (pro Gel) und 150 V und wird beendet, sobald die Bromphenolblaufront aus dem Gel herausgelaufen ist.

Anschließend erfolgt entweder die Färbung des Trenngels mit Coomassie, eine Silberfärbung oder eine Immunfärbung.

## 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
Coomassie R250	2 g
Coomassie G250	0,5 g
Ethanol	500 ml
Essigsäure	100 ml
dH <sub>2</sub> O	400 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. Anschließend wird das Gel in 5% Essigsäure entfärbt.

### C.14.2 Silbernitratfärbung von Polyacrylamidgelen

Die Silbernitratfärbung 10 – 50 mal empfindlicher als die Coomassie-Färbung und dazu geeignet Proteinbanden ab einer Nachweisgrenze von etwa 0.5 bis 1 ng anzufärben. Die im Gel fixierten Proteine binden die Silberionen und diese werden dann, initiiert von funktionellen Gruppen und Peptidbindungen in den Proteinen, durch Reduktion in Silberkeime umgewandelt. Durch starke Reduktionsmittel werden alle Silberionen im Gel zu metallischem Silber reduziert. Diese Reaktion erfolgt in der Nähe der Silberkeime viel schneller als im übrigen Gel. Damit nicht alle Silberionen im gesamten Gel zu metallischem Silber reduziert werden und so das gesamte Gel schwarz wird, muss die Reaktion rechtzeitig durch eine starke pH-Wert-Änderung gestoppt werden.

#### Fixierer:

EtOH	50 % (v/v)
Essigsäure	12 % (v/v)

#### 30% EtOH

#### Oxidierer:

37 %iges Formaldehyd	33,3 µl
43 %iges Na-Thiosulfat	25 µl
dH <sub>2</sub> O	50 ml

**Silbernitratlösung:**

Silbernitrat	0,10 g
37 %iges Formaldehyd	33,3 µl
dH <sub>2</sub> O	50 ml

**Entwickler-Lösung:**

Na-Carbonat	3 g
37 %iges Formaldehyd	25 µl
43 %iges Na-Thiosulfat	0,9 µl
dH <sub>2</sub> O	50 ml

Das Proteingel für 1 h oder über Nacht in der Fixierer-Lösung schütteln und anschließend 2x 30

**Stopping-Lösung:**

EDTA Na <sub>2</sub> 2 H <sub>2</sub> O	14,6 g/l
-----------------------------------------	----------

min in 30%igem EtOH waschen. Dann für 1 min in die Oxidierer-Lösung legen und 3 mal 1 min in dH<sub>2</sub>O waschen. Nun erfolgt eine Inkubation für 1 h mit der Silbernitratlösung und nach zweimaligem Waschen mit dH<sub>2</sub>O für 30 sec wird das Gel 1 - 5 min in der Entwickler Lösung geschüttelt. Die Entwicklung des Gels wird durch die Stopping-Lösung beendet.

## C.15 Western Blot

Mittels Western Blot werden Proteine aus einer PAGE (C.13) elektrophoretisch auf eine Nitrozellulosemembran überführt. Dort können sie dann 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 in dieser Arbeit verwendeten Antikörper wurden mit selbst aufgereinigtem Protein (C.19) von der Firma SeqLab (Göttingen) hergestellt.

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

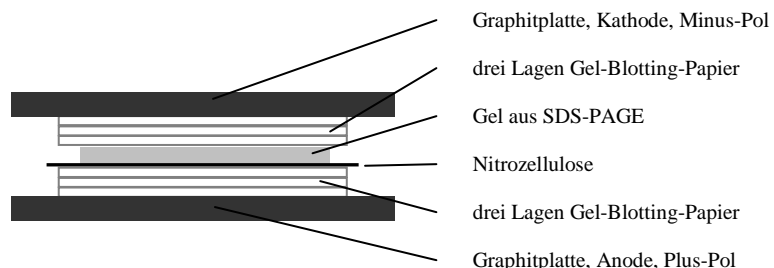
#### C.15.1.1 Material

- ein unfixiertes Trenngel 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 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 (in Blot-Puffer getränkt) und darauf die mit dH<sub>2</sub>O angefeuchtete 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 mit Blot-Puffer getränkte Blatt Gel-Blotting-Papier gelegt und Luftblasen aus dem Stapel z.B. durch Darüberrollen mit einer Pasteurpipette entfernt.

**Abbildung 16.** Schematische Darstellung des Aufbaus eines Western Blots.



Die Blotkammer wird verschlossen und mit einem Gewicht (etwa 1 bis 2 kg) beschwert. Nun wird für etwa 2 Stunden (abhängig von Geldicke und Proteingröße) eine Spannung angelegt, bei der ca. 1 mA Strom pro cm<sup>2</sup> Gelfläche fließen.

Um den Transfer zu kontrollieren, können die Proteine auf der Nitrozellulose nun mit Ponceau S Rot gefärbt werden. Das Entfärben erfolgt mit dH<sub>2</sub>O und PBS plus 0,05% (v/v) Tween 20. Anschließend erfolgt das Blocken der Nitrozellulose mit 5% (w/v) Magermilchpulver in PBS bei dem alle freien Stellen der Nitrozellulose mit Proteinen abgesättigt werden.

## C.15.2 Dekoration und ECL

In dieser Arbeit wurde hauptsächlich eine Methode der Dekoration verwendet, die zum Ziel hat eine ECL (enhanced chemiluminescence) durchzuführen und dabei die Lichtemission mit einem Röntgenfilm zu dokumentieren. Dabei wird das geblottete Antigen mit einem spezifischen Antikörper detektiert, der wiederum von einem mit Meerrettich-Peroxidase (HRP) konjugierten Antikörper erkannt wird.

### 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 30 min oder länger mit einem geeigneten Reagenz geblockt werden. Normalerweise ist 5% (w/v) Magermilchpulver in PBS eine gute Wahl (Magermilchpulver eignet sich, da es zu viel Biotin enthält). Eine Alternative wäre 2% (w/v) BSA oder Kasein in PBS. Der geblockte Blot wird in der Erstantikörperlösung bei RT für zwei Stunden, oder bei 4 °C ÜN inkubiert. Die Lösung kann danach abgegossen und eingefroren werden, um sie später erneut zu verwenden. Der Blot wird dreimal für je 10 min in Waschpuffer gewaschen. Es folgt eine Inkubation in der Zweitantikörperlösung für 45 min bei RT. Der Blot wird dann 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.

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 geblotteten Proteinen verloren geht, kann diese Prozedur nicht beliebig häufig wiederholt werden. In dieser Arbeit wurden Blots höchstens *einmal* gestrippt.

### 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 Zellkultur

### C.16.1 Zellkulturmedien, und -puffer

- **RPMI 1640** mit L-Glutamin (Gibco, 21875-034)
- Fötales Kälberserum (**FCS**, Biochrom AG), wird vor Verwendung in Zellkulturmedien durch Hitze inaktiviert (56 °C, 30 min)
- Dimethylsulfoxid (**DMSO**, Fluka 41639)
- **Waschpuffer** (PBS, wenn die Zellen abgelöst werden oder PBS mit je 0,1 g/l CaCl<sub>2</sub> und MgCl<sub>2</sub>, wenn die Zellen fixiert bleiben sollen)

#### C.16.1.1 Medium für J774A.1

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

### C.16.2 Kultivierung der Zellen

Die Zelllinie J774A.1 (ATCC TIB-67) wurde gemäß den Empfehlungen der American Type Culture Collection (ATCC, <http://www.atcc.org/> bzw. <http://www.lgcpromochem-atcc.com/>) kultiviert. Die Zelllinie wurde in einem begasteten Brutschrank bei 37°C in einer humiden Atmosphäre mit 5% CO<sub>2</sub>-Gehalt in speziellen Kulturflaschen kultiviert. Die verwendeten Waschpuffer und Medien wurden im Vorfeld auf 37°C vorgewärmt.

#### C.16.2.1 Einfrieren und Auftauen

Um eukaryotische Zellen für längere Zeit zu lagern, werden sie in flüssigem Stickstoff bei -195,8°C aufbewahrt. Zum Einfrieren werden die Zellen zunächst zu hoher Dichte herangezogen, dann mit PBS gewaschen und mit Trypsin abgelöst. Danach werden sie in Medium mit 10% (v/v) DMSO (Gefrierschutzmittel für die Zellen) aufgenommen und gut resuspendiert, in Kryoröhrchen (Greiner, Cryo.S) aliquotiert und mit Zellstoff oder ähnlichem isoliert bei -80 °C langsam eingefroren. Nach 24 h werden sie endgültig in flüssigem Stickstoff gelagert.

Im Gegensatz zum langsamen Einfrieren, ist es am schonensten für die Zellen, wenn sie schnell aufgetaut werden. 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 dem für Zellen im Wachstum schädlichen DMSO ausgetauscht werden.

#### C.16.2.2 Subkultivierung von Monolayerkulturen/eukaryotischen Zellen

Die verwendeten eukaryotische Zellen bilden nach ca. 3-4 Tagen einen Monolayer und müssen dann auf neue Zellkulturflaschen gesplittet werden. Nach dem Abtsaugen des Mediums aus der Zellkulturflasche werden die Zellen PBS gewaschen. Das Ablösen der adhärenen J744 Makrophagen erfolgt durch mechanisches Abkratzen vom Untergrund der Kulturflasche. Die Zellen werden in frischem RPMI Medium mit FCS resuspendiert und im Verhältnis 3:7 auf neue Zellkulturflaschen verteilt und erneut bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert.

### C.16.3 Herstellung von Infektionsaliquots

Wie unter C.1.1 beschrieben werden die zu untersuchenden Bakterien bis zu einer OD<sub>600nm</sub> von 1,0 herangezogen. Von der Kultur werden 10 ml bei 5000 rpm für 10 min bei 4°C pelletiert und zweimal mit PBS gewaschen. Das Zellpellet wird dann in 10 ml 1x PBS/20% Glycerin resuspendiert, in 1ml-Portionen aliquotiert und bei -80°C eingefroren.

Zur Bestimmung der Bakterienzellzahl werden von jeweils zwei Aliquots eines Bakterienstammes Verdünnungsreihen bis 10<sup>-6</sup> hergestellt und anschließend die Zahl der Bakterien pro ml bestimmt.

### C.16.4 Infektion mit *Listeria monocytogenes*

In den Infektionsversuchen wurden verschiedene Listerien-Stämme in einer bestimmten MOI („multiplicity of infection“; Verhältnis der Bakterien zur ausgesäten Zellzahl) in serumfreien RPMI-Medium auf einen semikonfluenten Zellrasen gegeben. Bei den verwendeten Zelllinien handelt es sich um professionell phagozierende J744 Makrophagen, die gemäß ihrer natürlichen Funktion eine erhöhte Anzahl von Bakterien aufnehmen. Für eine ineffiziente Bakterienaufnahme wurden die J774 Makrophagen mit MOI 1 infiziert.

### C.16.4.1 Aussäen der Zellen

Für eine Infektion von J744 Makrophagen wird ca. 42 h vor Infektionsbeginn mit dem Aussäen der Zellen begonnen. Dafür werden die Zellen vom Boden der Zellkulturflasche gelöst und die Zellzahl in einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer bestimmt. Anschließend wird die Zellzahl auf  $1 \times 10^5$  Zellen / ml eingestellt und je 1 ml der Zellsuspension pro Well in einer 24well-Kulturplatte ausgesät.

### C.16.4.2 Infektion der eukaryotischen Zellen

Vor der Infektion wird die genaue Zellzahl in zwei extra ausgesäten Wells bestimmt, um die MOI berechnen zu können. Dafür werden die Zellen gelöst, die Zellzahl mit Hilfe einer Fuchs-Rosenthal Zählkammer ausgezählt und die passende Menge RPMI ohne FCS mit der errechneten Bakterienmenge versetzt.

Die Zellen in den zu infizierenden Wells werden einmal mit 1 ml Waschpuffer gewaschen und mit 1 ml Infektionsmedium infiziert. Die Bakterienzellzahl im Infektionsmedium wird durch Ausplattieren bestimmt.

Nach einer Infektionsdauer von 45 min (J744) wird das Medium abgenommen und die Zellen werden einmal mit 1 ml Waschpuffer gewaschen um einen Großteil extrazellulärer Bakterien zu entfernen (Zeitpunkt t<sub>0</sub>). Außerdem werden die noch extrazellulär verbliebenen Bakterien durch die Inkubation von Gentamycin-haltigem RPMI-Medium mit FCS (50 µg/ml Gentamycin) für 1 h im Zellkulturschrank abgetötet. Nach dieser Inkubation wird Medium gegen 1 ml RPMI-Medium mit 10 µg/ml Gentamycin ausgetauscht und die Zellen bis zu den weiteren Messwerten (Zeitpunkte t<sub>3</sub>, t<sub>5</sub> und t<sub>7</sub>) im Zellkulturbrutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert.

An den verschiedenen Zeitpunkten (t<sub>0</sub>, t<sub>1</sub>, t<sub>3</sub>, t<sub>5</sub> und t<sub>7</sub>) wird das Medium in den jeweiligen Ansätzen vorsichtig abgesaugt. Die Zellen werden einmal mit 1 ml PBS gewaschen und durch die Zugabe von 1 ml eiskaltem, sterilem dH<sub>2</sub>O und Ultraschallbehandlung lysiert. Von den gut gemischten Zelllysaten werden Verdünnungsreihen hergestellt und auf BHI Platten ausplattiert. Die BHI Platten werden bei 37°C inkubiert und die Bakterienzahl / ml bestimmt.

## C.17 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 dH<sub>2</sub>O) gelöst werden.

### C.17.1 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 CO<sub>2</sub> 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 dH<sub>2</sub>O gelöst werden.

### C.17.2 RNA-Isolierung aus in BHI gewachsenen Listerien

Wie unter C.1 beschrieben werden die zu untersuchenden Bakterien bis zu einer OD<sub>600nm</sub> von 1,0 herangezogen. Von der Kultur werden 10 ml bei 5000 rpm für 10 min bei 4°C pelletiert und das Pellet in flüssigem N<sub>2</sub> schockgefroren. Bis zur Weiterbearbeitung kann das Pellet bei -80°C gelagert werden.

Das auf Eis aufgetaute Pellet wird in 700 µl RLT-Puffer (RNeasy Mini Kit von Qiagen) und 7 µl β-Mercaptoethanol resuspendiert. Die entstandene Lösung wird in ein Lysing Matrix B Tube (Qiagen) mit Silikatkügelchen überführt. Die Bakterien werden im FastPrep™ FP120 Gerät (Savant Instruments, Inc.) dreimal für jeweils 45 Sekunden mit 6,5facher Geschwindigkeit lysiert. Um ein starkes Erwärmen der Lösung zu vermeiden, wird das Tube zwischen den einzelnen Vorgängen kurze Zeit auf Eis inkubiert. Die Bakterientrümmern und Silikatkügelchen werden für 3 - 5 min bei 15000 rpm abzentrifugiert.

Der Überstand wird in ein 2 ml Eppendorf Gefäß überführt, mit 500 µl absolutem EtOH gemischt, auf eine Säule (RNeasy Mini Kit) gegeben und zentrifugiert (15000 rpm, 1 min; RT). Die Säule wird mit 700 µl RWI Puffer gewaschen und erneut zentrifugiert (15000 rpm, 1 min; RT). Nun erfolgt eine DNase-Behandlung, für die 70 µl RDD-Puffer und 10 µl DNase I (Qiagen) vorsichtig gemischt (DNase I ist sehr empfindlich gegenüber physikalischer Denaturierung) und für 15 min auf der Säule inkubiert werden. Anschließend werden 350 µl RWI-Puffer zugegeben und zentrifugiert (15000 rpm, 1 min; RT) und die Säule zweimal mit je 500 µl RPE-

Puffer gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wird die Säule durch erneutes Zentrifugieren getrocknet (15000 rpm, 3 min; RT) und in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Die RNA wird in 40 µl RNase freiem Wasser mittels Zentrifugation (15000 rpm, 1 min; RT) eluiert und bei -80 °C aufbewahrt.

### C.17.3 RNA-Isolierung aus in Minimalmedium gewachsenen Listerien

Wie unter C.1 beschrieben werden die zu untersuchenden Bakterien bis zu einer OD<sub>600nm</sub> von 1,0 herangezogen. Von der Kultur werden 50 ml bei 5000 rpm für 10 min bei 4°C pelletiert und das Pellet in flüssigem N<sub>2</sub> schockgefroren. Bis zur Weiterbearbeitung kann das Pellet bei -80°C gelagert werden.

Das auf Eis aufgetaute Pellet wird in 1,5 ml RLT-Puffer (RNeasy Mini Kit von Qiagen) und 15 µl β-Mercaptoethanol resuspendiert. Die entstandene Lösung wird in ein Lysing Matrix B Tube (Qiagen) mit Silikatkügelchen überführt. Die Bakterien werden im FastPrep™ FP120 Gerät (Savant Instruments, Inc.) dreimal für jeweils 45 Sekunden mit 6,5facher Geschwindigkeit lysiert. Um ein starkes Erwärmen der Lösung zu vermeiden, wird das Tube zwischen den einzelnen Vorgängen kurze Zeit auf Eis inkubiert. Die Bakterientrümmern und Silikatkügelchen werden für 3 - 5 min bei 15000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wird in zwei 2 ml-Reaktionsgefäße überführt und mit je 1 ml TRIzol Reagent (Invitrogen) versetzt, gevortext und 5 min bei RT inkubiert. Anschließend werden 200 µl Chlorophorm hinzugefügt, der Ansatz gevortext und 3 min bei RT inkubiert. Nun werden die Proben für 10 min zentrifugiert (15000 rpm, 4°C) und anschließend die obere Phase in ein frisches 2 ml-Reaktionsgefäß überführt. Die TRIzol Reagent- und Chlorophorm-Behandlung wird wiederholt und die obere Phase erneut in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Der Lösung werden 500 µl Isopropanol zugegeben und zur Fällung der DANN und RNA für 15 min zentrifugiert (15000 rpm, 4°C). Das Pellet wird mit 1 ml 70%igem EtOH mittels gewaschen (15000rpm, 4°C, 10 min) und anschließend mit offenem Gefäß bei 50°C getrocknet. Das trockene Pellet wird in 100 ml RNase freiem H<sub>2</sub>O resuspendiert und durch Wärmebehandlung (50°C) gelöst. Die Lösungen in den zwei Caps eines Stammes werden nun wieder vereint und mit 350 µl RLT-Puffer und 250 µl EtOH vermischt und auf eine Säule (Qiagen) überführt und abzentrifugiert (15000 rpm, 1 min; RT). Im Anschluss daran erfolgt das Waschen mit 700 µl RWI-Puffer und alle weiteren Schritte wie unter C.17.2 aufgeführt.

### C.17.4 DNase-Behandlung mit DNA-free™ Kit von Ambion

Die DNase-Behandlung mit dem DNA-free™ Kit von Ambion ist eine sehr schnelle und effiziente Methode zur Herstellung DNA-freier RNA. Die Durchführung erfolgte nach Anleitung des Herstellers.

Wird die RNA zur Herstellung von cDNA für die Real-time RT-PCR verwendet sollte nach der RNA-Isolierung eine PCR (siehe C.8.1) mit 1 µl RNA als Template durchgeführt werden. Kann noch DNA nachgewiesen werden, ist diese zusätzliche DNase-Behandlung erforderlich, da die vorhandene DNA das Ergebnis der Real-time RT-PCR verfälschen kann. Nach der DNase-Behandlung sollte eine weitere PCR durchgeführt werden, um zu überprüfen, ob die RNA frei von DNA ist. Erhält man kein PCR-Produkt, so kann davon ausgegangen werden, dass die DNA vollständig abgebaut wurde.

### C.17.5 Reverse Transkription von RNA für die Real-time RT-PCR

Die komplementäre DNA (cDNA), wird durch reverse Transkription aus der RNA als Matrize geschrieben. Die Reverse Transkriptase ist *in vivo* ein Enzym mit drei verschiedenen enzymatischen Aktivitäten: RNA-abhängige DNA-Polymerase („Reverse Transkriptase“), Ribonuclease („RNaseH“; Abbau von RNA in RNA/DNA-Hybriden) und DNA-abhängige DNA-Polymerase. In der molekularen Genetik ist die Reverse Transkriptase ein nützliches Werkzeug, denn jede beliebige RNA wird unter geeigneten Bedingungen von der reversen Transkriptase akzeptiert.

#### C.17.5.1 Reverse Transkription mit der SuperScript™ II (Invitrogen)

In einem Gesamtvolumen von 15 µl DEPC-H<sub>2</sub>O werden 5 µg RNA aufgenommen und mit 9 µg random Hexamer-Oligonukleotide (Invitrogen) für die Reverse Transkription versetzt. Der Ansatz wird für 5 min bei 70°C inkubiert, zur Zerstörung der Sekundärstruktur der RNA, so dass die Oligonukleotide an die komplementäre mRNA-Sequenz binden können. Nun erfolgt eine Abkühlung des Ansatzes für 10 min auf Eis. 20 µl des folgenden Mixes werden hinzu pipettiert:

5 x 1st Strand Buffer (Invitrogen)	8,0 µl
0,1 M DTT (Invitrogen)	0,4 µl
dATP ( 20 mM)	1,0 µl

dCTP ( 20 mM)	1,0 µl
dGTP ( 20 mM)	1,0 µl
dTTP ( 20 mM)	1,0 µl
Ribonuclease Inhibitor (RNase out; Invitrogen)	1,0 µl
Superscript TM II (Invitrogen)	1,0 µl
ad 20 µl DEPC d H <sub>2</sub> O	

Der gesamte Ansatz wird gut gemischt, 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und dann erfolgt die cDNA-Synthese für 2 Stunden bei 42°C. Anschließend wird der Ansatz zur Zerstörung des Ribonuclease-Inhibitors für 15 min bei 70°C inkubiert. Die Zugabe von 2 µl RNase (Roche, DNasefree) und eine weitere Inkubation für 45 min bei 37°C zerstört die Template-RNA. Die fertige cDNA wird mit dem Qiagen PCR-Purification Kit gereinigt und in 30 µl EB-Puffer (Qiagen) eluiert. Die fertige cDNA kann entweder sofort für die Real-time RT-PCR eingesetzt oder bei -20°C eingefroren werden.

### C.17.6 Quantitative Real-Time-PCR (RT-PCR)

Die Real-Time-PCR stellt die modernste Methode der Quantifizierung von Nukleinsäuren dar. Bei dieser empfindlichen Methode werden nicht absolute Mengen an PCR-Produkt gemessen, sondern die DNA-Amplifikation kann Zyklus für Zyklus verfolgt werden. Dies geschieht mit Hilfe von Fluoreszenzsignalen, die durch einen bestimmten Farbstoff entstehen, welcher zum Reaktionsansatz hinzugegeben wird. Dieser Fluoreszenzfarbstoff, Sybr<sup>®</sup>Green I, kann sich sequenzunspezifisch in die kleine Furche der DNA-Doppel-Helix einlagern und dadurch Licht emittieren. Im ungebundenen Zustand besitzt Sybr<sup>®</sup>Green I eine relativ niedrige Fluoreszenz und es bindet nicht an ssDNA.

Steigt die DNA-Menge in der PCR-Reaktion an, so steigt auch proportional die Fluoreszenz des Farbstoffes. Die Fluoreszenz der Probe kann mit Hilfe eines LightCyclers<sup>®</sup> (BIO-RAD) nach jedem Zyklus quantifiziert werden. Die gemessene Stärke des Fluoreszenzsignals wird gegen die Zyklenzahlen per Computer in einem Diagramm dargestellt. Durch die Mitführung von Standardwerten mit bekannten DNA-Konzentrationen können die im Reaktionsansatz enthaltenden DNA-Mengen zu jedem Zeitpunkt quantifiziert werden. Die quantitative Information in einer RT-PCR-Reaktion liefern nur wenige Zyklen, in denen die DNA-Menge logarithmisch ansteigt.

Sybr<sup>®</sup>Green I ist einfach zu verwenden, da es keine Sequenzspezifität besitzt, dadurch aber auch an jedes doppelsträngige Produkt bindet, egal ob es sich dabei um das gewünschte Produkt oder ein unspezifisches Nebenprodukt handelt. Um die Spezifität der PCR-Reaktion überprüfen zu können, werden im Anschluss an die Bildung der PCR-Produkte Schmelzkurven gebildet. Unspezifische Produkte schmelzen meist bei niedrigeren Temperaturen als die längeren spezifischen Produkte. Aufgrund des Schmelzverhaltens von DNA nimmt die Fluoreszenz mit steigender Temperatur ab. Die maximale Fluoreszenzänderung pro Temperaturerhöhung ergibt ein Maximum in der Schmelzkurve, welches charakteristisch für jedes PCR-Produkt ist.

Bei der Wahl der Oligonukleotide für die Real-time RT-PCR sollten folgende Kriterien beachtet werden:

- die Wahl der Oligonukleotide sollte in der Mitte des Gens erfolgen, um trotz eines möglichen Abbaus der weniger stabilen mRNA, ein Produkt bei der cDNA-Synthese und somit auch in der Real-Time RT-PCR zu erhalten
- das resultierende PCR-Fragment sollte 130 – 150 bp lang sein
- GC-Gehalt 40 – 50 %
- ideale Oligonukleotidlänge 20 – 25 bp
- palindromische Sequenzen vermeiden
- Homologie der Oligonukleotide zueinander vermeiden
- höchstens zwei GCs in den letzten fünf Basen am 3'-OH-Ende

#### Standardreaktions-RT-PCR-Ansatz:

Der Absolute<sup>TM</sup> QPCR SYBR Green Mix (ABgene) enthält bereits den Reaktionspuffer, eine Thermo Start DNA Polymerase (Aktivierung des Enzyms bei 95°C für 15 min), dNTPs und MgCl<sub>2</sub>.

Absolute <sup>TM</sup> QPCR SYBR Green Mix	25 µl
Oligonukleotid I	100 nM
Oligonukleotid II	100 nM
cDNA (1:50 verdünnt)	4 µl
ad 50 µl dH <sub>2</sub> O <sub>steril</sub>	

#### Standard-RT-PCR-Bedingungen:

95°C            15 min            Aktivierung der Polymerase

40 Zyklen:

95°C	15 sec	Denaturierung
60°C	1 min	Annealing und Elongation

## C.18 Microarray-Assay

Mit Hilfe der Microarray-Technik werden die parallele Analyse sowie der Vergleich des Expressionsprofils einer Vielzahl von Genen ermöglicht. Die hohe Effizienz steigert die Geschwindigkeit in der molekularbiologischen Forschung. Die Microarray Technik basiert auf der Hybridisierung von Nukleinsäuren. Eine komplementäre Sequenz führt zur Hybridisierung von zwei einzelsträngigen Nukleinsäuremolekülen, von denen eine auf einer Matrix fest gebunden vorliegt.

Es existieren zwei Chip-Varianten: cDNA-Microarrays und Oligonukleotid-Microarrays. In beiden Fällen dient DNA als Sonde, die an definierten Positionen eines Rasters auf den Chip aufgebracht werden.

- **cDNA-Microarrays:** lange DNA Moleküle (100 Nukleotide) werden auf einer festen Oberfläche (Membranen, Glas oder Silikon-Chip) fixiert; die DNA wird mit Hilfe der PCR amplifiziert
- **Oligonukleotid Microarrays:** kurze DNA-Fragmente (25 Nukleotide) mit bekannter Sequenz werden an der Oberfläche des Chips synthetisiert

In dieser Arbeit wurden Oligonukleotid-Microarrays verwendet. Die Oligonukleotide wurden entsprechend der Herstellerangaben auf Epoxy-beschichteten Glas-Objekträgern (Quantifoil) gespottet (whole genome slides von: T. Chakraborty Institut für Medizinische Mikrobiologie, Gießen; M. Frosch, Institut für Hygiene und Mikrobiologie, Würzburg und PTS-slides von: BF-BIOLabs Schneider und Zeltz GbR, 79211 Denzlingen). Die Firma Operon hat die 70 Nukleotid langen Oligomere aller in *L. monocytogenes* vorliegenden ORFs (ca. 3000) entworfen und synthetisiert, sowie jeweils ein zweites Oligomer für die Phosphotransferasesystem Gene.

Zunächst wird RNA aus dem zu untersuchenden Bakterienstamm extrahiert und mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben. Dabei werden fluoreszenzmarkierte Nukleotide (dCTP) eingebaut. Die markierte cDNA wird dann mit den DNA-Microarrays hybridisiert. Hierbei binden markierte cDNA Stücke an ihren komplementären Gegenpart auf dem Array. Nach Abwaschung der nicht gebundenen cDNA-Stücke wird das Fluoreszenzsignal jeder Position des DNA-Microarrays mittels eines Lasers detektiert.

### C.18.1 Herstellung der Sonden

Zunächst erfolgte wie unter C.17 beschrieben die Isolierung bakterieller RNA und es wurden 30-40 µg RNA pro Stamm in einem Volumen von 15 µl für die cDNA Synthese eingesetzt.

gesamte RNA	30-40 µg
random Oligonukleotide (3µg/µl; Invitrogen)	3 µl
	<hr/>
	ad 18 µl DEPC-H <sub>2</sub> O

Der Ansatz wird für 5 min bei 70°C inkubiert, zur Zerstörung der Sekundärstruktur der RNA, so dass die Oligonukleotide an die komplementäre mRNA-Sequenz binden können. Nun erfolgt eine Abkühlung des Ansatzes für 10 min auf Eis.

20 µl des folgenden Mixes werden hinzu pipettiert:

5 x 1st Strand Buffer (Invitrogen)	8 µl
0,1 M DTT (Invitrogen)	0,4 µl
dATP (20 mM)	1 µl
dGTP (20 mM)	1 µl
dTTP (20 mM)	1 µl
dCTP (10 mM)	1 µl
Ribonuclease Inhibitor (RNase out TM; Invitrogen)	1 µl
Superscript TM II (Invitrogen)	1 µl
	<hr/>
	ad 20 µl DEPC-H <sub>2</sub> O

Zusätzlich zum Mastermix werden pro Ansatz 2 µl fluoreszenzmarkierte dCTPs (Cyto dye 3 und Cyto dye 5; GE Healthcare) hinzugefügt und der Ansatz für 10 min bei RT inkubiert (ab hier wird im Dunkeln gearbeitet), mit anschließender cDNA-Synthese bei 42°C für 2 h. Dann wird der Ansatz zur Zerstörung des Ribonuclease-Inhibitors für 15 min bei 70°C inkubiert. Die Zugabe von 2 µl RNase (Roche, DNasefree) und eine weitere Inkubation für 45 min bei 37°C zerstört die Template-RNA. Die fertige cDNA wird mit dem Qiagen PCR-

Purification Kit gereinigt und in 30 µl EB-Puffer (Qiagen) eluiert. Die mittels Microarray zu vergleichenden Ansätze werden vereint und in der Speedvac bei 45°C auf ein Gesamtvolumen von 30 µl reduziert. Die cDNA wird entweder direkt für Microarray-Experimente verwendet oder bei -20°C für höchstens eine Woche eingefroren. Ansätze zur Verwendung mit PTS-Slides mussten nicht eingedampft werden.

## C.18.2 Hybridisierung

### C.18.2.1 Waschen und Blocken des Microarray-Slides

	<u>Whole genome Slide</u>
<b>Rinsing Solution 1:</b>	0,1 % Triton-X100 in dH <sub>2</sub> O
<b>Rinsing Solution 2:</b>	100 µl 37 %ige HCl ad 1000 ml dH <sub>2</sub> O
<b>Rinsing Solution 3:</b>	100 mM KCl in dH <sub>2</sub> O
<b>QMT Blocking Solution:</b> (pH-Wert: 9,0)	50mM Ethanolamin 0,1 % (w/v) SDS 0,1 M Tris

Das Waschen des Slides beginnt für 5 min bei Raumtemperatur (RT) in Rinsing Solution 1, gefolgt von 2 x 2 min in Rinsing Solution 2 (RT), 10 min in Rinsing Solution 3 (RT) und anschließender Minute in dH<sub>2</sub>O. Es folgt eine Inkubation des Slides im QMT Blocking-Puffer für 15 min bei 60°C und ein letzter Waschschrift für 1 min in dH<sub>2</sub>O. Der Slide wird durch Zentrifugation (16000 rpm; RT; 3 min) getrocknet.

Die PTS-Slides wurden schon von der Firma BF-BIOlabs gewaschen und sind direkt einsetzbar.

#### Vorbereitung der Sonde und Hybridisierung

<b>20 x SSC:</b> (pH-Wert: 7,0)	3,0 M NaCl 0,3 M NaCitrat
------------------------------------	------------------------------

Für den Whole genome Slide werden die 30 µl Cye3-/Cye5-markierte cDNA mit 6,0 µl 20x SSC und 4 µl 1% SDS versetzt und 1 min bei 94°C inkubiert. Der Microarray-Slide wird in den Slide-holder gelegt, der Ansatz auf den Microarray-Slide aufgetragen und luftblasenfrei mit einem Deckglas abgedeckt. In die Löcher des Slide-holders werden je 10 µl dH<sub>2</sub>O pipettiert, um den Slide vor dem Austrocknen zu schützen. Der Slide-holder wird in Alufolie eingewickelt und mit der Oberseite nach oben für 16 bis 18 h in einem 64°C warmen Wasserbad inkubiert.

Für den PTS-Slide werden 60 µl Cye3-/Cye5-markierte cDNA, 22,65 µl 20xSSC, 5,7 µl 2%SDS, 25,25 µl dH<sub>2</sub>O und 11,4 µl Array Block (BF-BIOlabs) in ein Gesamtvolumen von 125 µl vereint. Dieser Ansatz wird auf den mit einem Microarray Gene Frame (ABgene) abgedeckten PTS-Slide pipettiert und der Rahmen mit der Deckfolie verklebt. Der Slide wird in ein 50 ml Greiner Röhrchen überführt und in diesem mit einem angefeuchteten Tuch, welches auf der Unterseite des Objektträgers eingeschoben wird, eine hohe Luftfeuchtigkeit erreicht. Das verschlossene Greiner Röhrchen wird zum Verdunkeln mit Aluminiumfolie umwickelt und für 16 bis 18 h bei 64 °C im Hybridisierungssofen gedreht.

### C.18.2.2 Waschen des Microarray-Slides

	<u>Whole genome Slide</u>	<u>PTS Slide</u>
<b>Waschlösung 1:</b> Auf 60°C erwärmt	2 x SSC 0,2 % SDS	2 x SSC 0,5 % SDS
<b>Waschlösung 2:</b>	2 x SSC	0,5 x SSC
<b>Waschlösung 3:</b>	0,2 x SSC	0,1 x SSC

Nach der Hybridisierung über Nacht wird bei dem PTS-Slide der Rahmen abgezogen und bei beiden Arten von Slides erfolgen drei Waschschrte bei RT: 10 min in Waschlösung 1 (das Deckglas löst sich vom Whole genome Slide), 10 min in Waschlösung 2 und 2x 10 min in Waschlösung 3. Der Slide wird durch Zentrifugation

getrocknet (16000 rpm; RT; 3 min). Der Slide wird bis zum Einscannen in einen abgedunkelten Plastikbehälter aufbewahrt.

### C.18.3 Scannen und Auswertung

Die Microarrays werden mit dem ScanArrayLight HT Scanner (Perkin Elmer, Boston) gescannt. Die durchschnittliche Signalintensität jedes einzelnen Spots und des Hintergrunds werden mit der ScanArray Express Software (Perkin Elmer, Boston) oder GenePix Pro 6.0 (Molecular Devices) ausgewertet. Der Cy3/Cy5 Quotient wird aus den korrigierten Werten für jedes einzelne Gen berechnet.

## C.19 Proteinreinigung mittels His-Tag und Ni-NTA-Agarose

Zur Proteinaufreinigung wurde in dieser Arbeit das System QIAexpressionist™ von Qiagen verwendet. Dieses Aufreinigungssystem macht sich die Eigenschaft von Histidinresten zunutze Nickel-Ionen binden zu können. Nitrilotriessigsäure (nitrilotriacetic acid, NTA) besitzt ebenfalls diese Eigenschaft. NTA okkupiert vier von sechs möglichen Bindestellen des Ni<sup>2+</sup>-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.19.1 Liste der isolierten His<sub>6</sub>-markierten Proteine

Die verwendeten Primer und Templates zur Herstellung der pQE-Vektoren sind in C.3 und C.5 aufgelistet.

Protein	pQE-Vektor in <i>E. coli</i> M15	Konzentration
Lmo0096	pQE30_0096	6 g/l
Lmo0783	pQE60_0783	0,8 g/l
Lmo2685	pQE30_2685	6 g/l

**Aufbewahrungspuffer:** 0,01 M HEPES pH 7,4  
0,15 M NaCl  
3mM EDTA  
10 % Glycerin

### C.19.2 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 (His<sub>6</sub>-Tag) besitzt. Das Konstrukt wird in *E. coli* M15 transformiert.

### C.19.3 Aufreinigung

#### C.19.3.1 Material

- **HisTrap™ HP** Säulchen, 1 ml (Amersham Biosciences)
- **Dialyseschlauch**, MWCO 14000 Da
- **Probenpuffer** (20 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 500 mM NaCl, 10 mM Imidazol, pH 8,0)
- **Elutionspuffer** (20 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 500 mM NaCl, 500 mM Imidazol, pH 8,0)
- **Dialysepuffer** (0,1 M HEPES, 0,15 M NaCl, 3 mM EDTA, 10% Glycerin))
- 1 M IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid; 2,38 g IPTG in 10 ml dH<sub>2</sub>O lösen, Aufbewahrung bei -20 °C)
- **Proteinase-Inhibitor** (Complete Mini, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail Tablets; Roche)

### C.19.3.2 Durchführung

Von einer *E. coli* M15 Übernachtskultur werden 100 ml zu 900 ml vorgewärmten LB in einen Erlenmeyerkolben gegeben und unter Schütteln bei 37 °C bis zu  $OD_{600nm}$  0,6 bis 0,8 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 14000 rpm 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, in 8 ml Probenpuffer mit Protease Inhibitor resuspendiert und je 850 µl in eine Lysing Matrix B (Q-Biogene) überführt. Die Proben werden dann in einem FastPrep™ FP120 Gerät (Savant Instruments, Inc.) sechsmal für jeweils 30 Sekunden mit 6,5facher Geschwindigkeit geschüttelt. Um ein Denaturieren der Proteine zu verhindern werden die Lysing Matrix B Caps nach jeder Runde für eine Minute auf Eis abgekühlt. Anschließend werden die Zelltrümmer durch Zentrifugation bei 4 °C und 20000 rcf für 30 min sedimentiert und der Überstand mit den Proteinen abgenommen. Der Überstand wird filtriert (0,45 µm), um ihn für die ÄKTAprime (siehe C.19.4) 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 äquiliert und die Probe über die Säule geschickt (30 ml, 0 %B). Nun wird die Säule bei 22 mM Imidazol gewaschen, bis die  $OD_{280nm}$  wieder das Basislevel erreicht hat (100 ml, 5 %B). In einem linearen Gradienten von 22 bis 500 mM Imidazol und anschließend 500 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 dH<sub>2</sub>O und anschließend 20% (v/v) EtOH gewaschen.

Die Fraktionen werden in einer SDS-PAGE (siehe C.13) mit Coomassie Färbung (siehe C.14.1) auf Reinheit und Ausbeute überprüft. Geeignete Fraktionen werden vereinigt und gegen den Dialysepuffer dialysiert. Nachdem die Proteinkonzentration bestimmt wurde (siehe C.11), wird die Proteinlösung aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

### C.19.4 ÄKTAprime

Die ÄKTAprime von Amersham Biosciences erlaubt die Automatisierung und Dokumentation von verschiedensten chromatographischen Verfahren. Für viele Applikationen wie Aufreinigung von His<sub>6</sub>-markierten oder GST-markierten Proteinen, Ionenaustausch, Entsalzung, etc. sind bereits Programme vorhanden (siehe Abbildung 17).

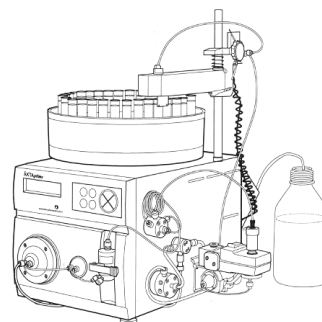
**Abbildung 17.** Skizze der ÄKTAprime und schematische Darstellung der einzelnen Komponenten. Grafik aus dem Handbuch des Herstellers.

*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.

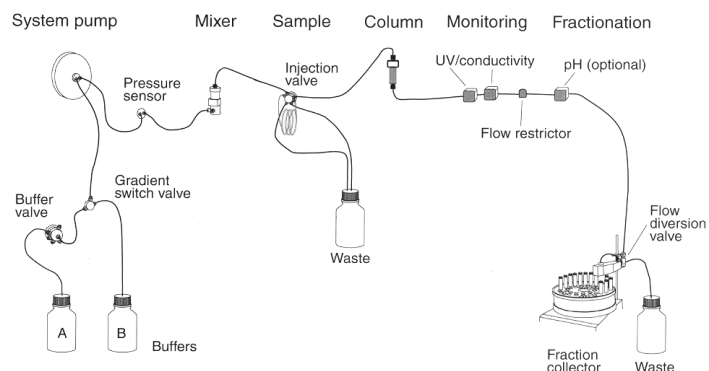
*Injection Valve:* hier wird entschieden, ob die Puffer von der *System pump* durch einen angeschlossenen Loop geschickt werden, oder nicht. In diesem Loop wird gewöhnlich vorher eine Probe geladen.

*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.19.5 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.19.5.1 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)

$\epsilon$  = Extinktionskoeffizient

$c$  = Konzentration

$d$  = Strecke, die das Messlicht durch die Probe zurücklegt

### C.19.5.2 Formeln

$E = \epsilon cd$

$c = E/(\epsilon d)$

### C.19.5.3 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.19.5.4 Internettool zur Berechnung vieler Proteinparameter

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

## C.20 Protein-Protein-Bindungsstudien

### C.20.1 Immunpräzipitation

Für wird zunächst pro Ansatz 50  $\mu\text{l}$  ProteinA-Sepharose 4B aus Staphylococcus (Fast Flow, Sigma-Aldrich) zweimal mit je 50  $\mu\text{l}$  PBS gewaschen (10 sek, 12000g) und am Ende mit PBS auf 50 $\mu\text{l}$  aufgefüllt. 10 $\mu\text{l}$  eines möglichst reiner Antikörper gegen eines der zu untersuchenden Proteine werden nun zugegeben und 30 min bei RT leicht geschüttelt. Anschließend werden die Sepharose-Kugeln für 2 min bei 3000rpm abzentrifugiert und dreimal mit 1ml kaltem PBS gewaschen. In gewünschter Konzentration (z.B. 5 $\mu\text{g}$ ) werden nun die zu untersuchenden Proteine zugegeben und 90 min bei 4°C leicht geschüttelt. Die Sepharose wird anschließend dreimal mit 1ml kaltem PBS gewaschen und mit 2xLaemmli-Puffer (C.13) auf 100 $\mu\text{l}$  aufgefüllt. 20 $\mu\text{l}$  werden nun in einem 12%igem SDS-Gel aufgetrennt und anschließend mittels Western Blot (C.15) eine mögliche Bindung detektiert.

## C.21 Protein-DNA-Bindungsstudien

### C.21.1 Herstellung der DNA-Sonde

Mittels PCR werden die DNA-Fragmente der zu untersuchenden Promotorregion mit den unter C.5 aufgeführten Primerpaaren amplifiziert. Nach Kontrolle im Agarosegel wird der Ansatz aufgereinigt (Qiagen PCR-Purification Kit) und mit den passenden Restriktionsenzymen verdaut, so dass 5'-überhängende Enden

entstehen. Die verdauten DNA-Sonden werden erneut aufgereinigt (Qiagen PCR-Purification Kit), die Konzentration gemessen (Ultraspec 2100 pro Photometer, Amersham) und bei -20°C gelagert.

## C.21.2 Radioaktive Markierung der DNA-Sonde

Die Markierung der Sonde für die Gelretardationsexperimente erfolgt durch Einbau von [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]dATP in die überhängenden Enden mit Hilfe der T4-Polynucleotidkinase (PNK).

### Sondenmix:

10 x PNK-Puffer A	2 $\mu$ l
DNA	0,8 $\mu$ g
[ $\alpha$ - <sup>32</sup> P]dATP (10 $\mu$ Ci/ $\mu$ l)	6 $\mu$ l
T4-Polynucleotidkinase	1 $\mu$ l
dH <sub>2</sub> O	ad 20 $\mu$ l

Der Ansatz wird 30 min bei 37°C inkubiert und anschließend werden nicht eingebaute Nucleotide mit Hilfe der illustra Microspin S-200 HR Säulchen (GE Healthcare) entfernt. Zur Bestimmung der spezifischen Aktivität wird 1 $\mu$ l der gereinigten Sonde auf einen Glasfaserfilter (GF/C-Filter, Whatman) pipettiert, kurz getrocknet und der Filter in ein Szintillationsröhrchen mit 3 ml Szintillationsflüssigkeit (Roth) gegeben. Die Einbaurate (cpm/ $\mu$ l) wird in einem Szintillationszähler gemessen.

## C.21.3 Gelretardationsexperimente (EMSA)

Gelretardationsexperimente, oder auch electrophoretic mobility shift assay (EMSA), dienen dem Nachweis von Protein-DNA-Interaktionen. Dabei wird eine radioaktiv markierte DNA-Sonde, die ein bestimmtes Proteinbindungsmotiv aufweist, mit einem Proteinextrakt oder gereinigtem Protein inkubiert. In dieser Arbeit wurden die Bindungsreaktionen mit einem HEPES-Bindungspuffer (HBP) durchgeführt. Die sich bildenden Protein-DNA-Komplexe wurden anschließend bei elektrophoretischem Lauf in einem nativen Polyacrylamidgel aufgrund ihrer geringeren Mobilität von der ungebundenen DNA-Sonde abgetrennt und autoradiographisch ausgewertet.

### C.21.3.1 5 x HEPES-Bindepuffer (HBP)

	c <sub>n</sub>	Menge für 10 ml
HEPES (pH 7,9)	100 mM	1 ml von 1 M
KCL	250 mM	2,5 ml von 1 M
EDTA (pH 8,0)	5 mM	100 $\mu$ l von 0,5 M
DTT	5 mM	50 $\mu$ l von 1 M
Ficoll	15 %	1,5 g

### C.21.3.2 Mastermix für EMSA

	1 x Mix	15 x Mix
5 x HBP	4,5 $\mu$ l	67,5 $\mu$ l
poly dIdC (1 $\mu$ g/ $\mu$ l)	1,5 $\mu$ l	22,5 $\mu$ l
BSA (1 $\mu$ g/ $\mu$ l, rein)	1,5 $\mu$ l	22,5 $\mu$ l
MgSO <sub>4</sub> (100mM)	3 $\mu$ l	45 $\mu$ l
Proteinextrakt/ reines Protein	x nM	x nM
[ $\gamma$ - <sup>32</sup> P]dATP-markierte Sonde	5 nM	75 nM
dH <sub>2</sub> O	ad 22,5 $\mu$ l	ad 337,5 $\mu$ l

### C.21.3.3 RNA-Polymerase Mix

RNA-Polymerase Puffer:	c <sub>n</sub>	Menge für 10 ml
Tris-HCl (pH 8,0)	50 mM	500 $\mu$ l von 1M
NaCl	150 mM	300 $\mu$ l von 5 M
EDTA (pH 8,0)	1 mM	20 $\mu$ l von 0,5 M
DTT	1 M	10 $\mu$ l von 1 M
CaCl <sub>2</sub>	2,5 mM	300 $\mu$ l von 50 mM
Glycerin	20 %	4 ml von 50 %

Die von N. Mauder aufgereinigte und bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagerte RNA-Polymerase (RNAP) wird für die weitere Verwendung in RNAP-Puffer 1:32 verdünnt und in einer Endkonzentration von  $1,5\text{ nM}$  eingesetzt.

	<b>1 x Mix</b>	<b>7,5 x Mix</b>
<b>1:10 RNAP/RNAP-Puffer</b>	3 $\mu\text{l}$	22,5 $\mu\text{l}$
<b>5 x HBP</b>	1,5 $\mu\text{l}$	22,5 $\mu\text{l}$
<b>dH<sub>2</sub>O</b>	ad 7,5 $\mu\text{l}$	ad 56,25 $\mu\text{l}$

### C.21.3.4 Natives Polyacrylamidgel für EMSA

Das Polyacrylamidgel kann ohne weiteres eine Woche vor seiner Verwendung hergestellt werden. Man sollte es dann feucht eingepackt im Kühlschrank aufbewahren, um ein Austrocknen des Gels zu vermeiden.

#### Farbpuffer:

Hepes (pH 7,6)	10 mM
Glycerin	10 mM
Bromphenolblau	0,01 %

#### 5%iges Polyacrylamidgel

10 x TBE	3,0 ml
30% Acrylamid	12,5 ml
10% APS	0,5 ml
TEMED	0,1 ml
dH <sub>2</sub> O	58,9 ml

### C.21.3.5 Durchführung

Zunächst wird die Lösung für das 5%ige native Polyacrylamidgel luftblasenfrei zwischen zwei gut gereinigte Glasplatten (20x30 cm) gegossen, die durch 1,5 mm dicke Spacer getrennt sind und sorgfältig mit Vaseline abgedichtet wurden. Anschließend setzt man den Kamm ein und lässt das Gel für etwa 1 h auspolymerisieren. Das Gel wird in eine Elektrophoresekammer gespannt und mit 0,4xTBE als Laufpuffer aufgefüllt.

Da für die Bindereaktion häufig verschiedene Proteine oder Proteinmengen verwendet werden ist es möglich diese aus dem Mastermix rauszurechnen und extra zu pipettieren. Der Bindungsansatz aus Protein und Mastermix wird zunächst für 3 min bei  $37^{\circ}\text{C}$  und weitere 22 min auf Eis inkubiert. Um die Ausbildung eines CI-Komplexes nachzuweisen wird RNA-Polymerase oder RNAP-Puffer Mix zugegeben und weitere 5 min bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Für einen Super-Shift können nun noch Antikörper in einer Endkonzentration von 1:15 zugegeben werden und der Ansatz wird dann weitere 25 auf Eis inkubiert, bevor er auf das Gel aufgetragen wird. Die Ansätze werden mit 10  $\mu\text{l}$  Farbpuffer versetzt und 40  $\mu\text{l}$  auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgt bei 250V und 100 mA, bis die Blaufront 17cm weit gewandert ist (ca. 3,5h). Nach Beendigung der Elektrophorese werden die Glasplatten vorsichtig voneinander getrennt und das Gel mit einem trockenen, dünnen Whatman-Papier (GB002) abgezogen, luftblasenfrei mit einer feuchten Cellophanfolie bedeckt und auf drei trockene Whatman-Papiere gelegt. Nach Bedecken des Stapels mit zwei Lagen Whatman-Papier trocknet man das Gel für 2h bei  $80^{\circ}\text{C}$  unter Vakuum. In einer Röntgenfilmkassette wird das Gel für mindestens zwei Stunden mit einem Phosphorimager-Screen bedeckt und anschließend am Phosphorimager (Molecular dynamics Typhoon 9200, Amersham) ausgewertet (siehe C.23).

## C.22 "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 $\alpha$  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.22.1 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% Ammoniumperoxidisulfat	0,5% (v/v)	250 µl

Mit dH<sub>2</sub>O auf Endvolumen auffüllen und rühren, bis Harnstoff gelöst ist. Dann Polymerisation starten mit:

TEMED	0,09% (v/v)	45 µl
-------	-------------	-------

## C.22.2 Reagenzien

Sämtliche Reagenzien werden frei von RNAsen gehalten bzw. mit DEPC behandelt, wenn möglich (siehe C.17.1).

### C.22.2.1 Nukleotide, Nukleotid-Mix

Nukleotide (Roche, 100 mM) werden als Nukleotid-Mix in DEPC-behandeltem dH<sub>2</sub>O 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 [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-CTP benötigt man einen Nukleotid-Mix mit ATP, GTP und UTP (jeweils 3 mM) und separat 750 µM CTP.

### C.22.2.2 Weitere Lösungen

- 100 mM K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>
- 1 M DTT (Dithiothreitol); DTT ist in wässriger Lösung bei Raumtemperatur instabil, wird deshalb aliquotiert und bei -20 °C gelagert
- Heparinlösung (6 g/l, Kaliumheparinsulfat (Fluka, 9005-48-5)); gelagert bei -20 °C

### C.22.2.3 2 xMaster-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 <sub>2</sub> -EDTA	11,4 mM	1,14% (v/v)	114 µl
1 M MgCl <sub>2</sub>	32 mM	3,2% (v/v)	320 µl
100 mM K <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	3,2 mM	3,2% (v/v)	320 µl
Glycerol		20% (v/v)	2 ml
BSA		1 g/l	10 mg
1 M DTT	1 mM	0,1% (v/v)	10 µl

DTT ist in wässriger Lösung bei Raumtemperatur instabil. Deshalb sollte der Master-Mix in kleinen Aliquots bei -20 °C gelagert werden.

### C.22.2.4 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.22.3 *in vitro* Transkriptionsansatz

Die *in vitro* Transkription wurde auf Eis angesetzt.

### C.22.3.1 Vormix

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

	<b>1 x Mix</b>	<b>18 x Mix</b>
<b>2 x MasterMix</b>	5,7 µl	102,6 µl
<b>50 % Glycerin</b>	4 µl	72 µl
<b>0,1 M DTT</b>	0,088 µl	1,6 µl
<b>0,1 M EDTA</b>	0,088 µl	1,6 µl
<b>RNase Inhibitor</b>	0,5 µl	9 µl
<b>Nukleotidmix (je 3 mM)</b>	1,5 µl	27 µl
<b>Promotor-DNA (375 ng/µl)</b>	2 µl	36 µl
<b>dH<sub>2</sub>O</b>	ad 18,5 µl	ad 333 µl

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

	<b>einfacher Ansatz</b>
<b>Vormix</b>	18,5 µl
<b>dH<sub>2</sub>O bzw. Verdünnung eines Faktors</b>	3 µl

### C.22.3.2 Durchführung

Nachdem alle Proben und der Mastermix in die Caos verteilt sind, werden in jeden Ansatz 2 µl der RNA-Polymerase-Verdünnung (12 bis 24 nM) hinzugegeben.

Nach etwa 5 min Inkubation bei RT werden in jeden Ansatz 0,5 µl radioaktives [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-NTP (5 µCi, 3000 Ci/mmol) pipettiert und die Ansätze bei 37 °C für 5 min inkubiert. Daraufhin werden 3 µl Heparinlösung (6 g/l) hinzugefügt, um freie RNA-Polymerase zu binden, und die Proben für weitere 10 min bei 37 °C inkubiert. Danach werden jeweils 0,5 µl des im Überschuss befindlichen unmarkierten NTPs (0,75 mM) hinzu pipettiert, um die Polymerisation zu erleichtern und zu beschleunigen. Die Reaktion wird nach 5 min durch Zugabe von jeweils 40 µl Stopp-Puffer beendet.

Je 14 µl der fertigen Proben werden auf ein Harnstoffgel (siehe C.22.1) aufgetragen und die Transkripte für etwa 1,5 h bei 1500 V separiert. Nach Beendigung der Elektrophorese werden die Glasplatten vorsichtig voneinander getrennt und das Gel mit einem trockenen, dünnen Whatman-Papier (GB002) abgezogen, luftblasenfrei mit einer feuchten Cellophanfolie bedeckt und auf drei trockene Whatman-Papiere gelegt. Nach Bedecken des Stapels mit zwei Lagen Whatman-Papier trocknet man das Gel für 2h bei 80°C unter Vakuum. In einer Röntgenfilmkassette wird das Gel für mindestens zwei Stunden mit einem Phosphorimager-Screen bedeckt und anschließend am Phosphorimager (Molecular dynamics Typhoon 9200, Amersham)ausgewertet (siehe C.23).

## C.23 Optische Quantifizierung von Produktmengen

### C.23.1 Digitale Bildvermessung mit ImageMaster™ Total Lab

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 ImageMaster™ Total Lab vorwiegend Bilder ausgewertet, die durch die Bestrahlung eines Storage Phosphor Screen 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.

### **C.23.2 Storage Phosphor Screen**

Ein Storage Phosphor Screen besteht aus einer Schicht von radiosensitiven Phosphorkristallen, die auf einer Polyesterplatte aufgezogen sind. Er speichert Energie von Betateilchen, 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

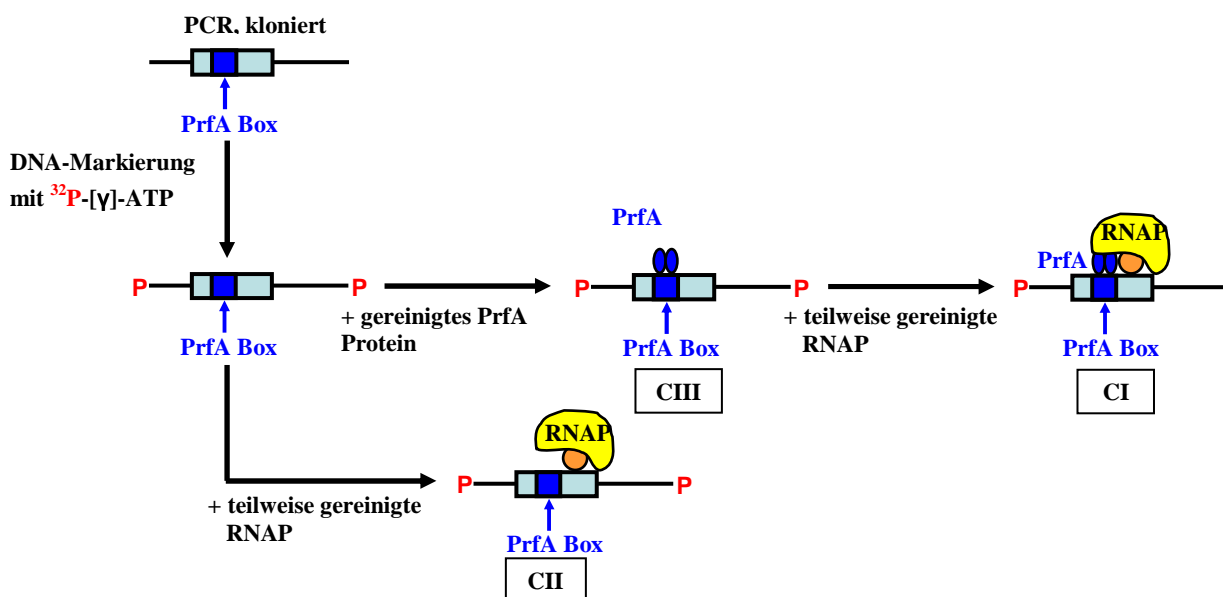
Der globale Regulator der listeriellen Virulenzgene, PrfA, wurde in vielen Studien untersucht, jedoch ohne einen eindeutigen Hinweis darauf zu erhalten, wie die Aktivität dieses Transkriptionsaktivators reguliert wird. Verschiedene Untersuchungen weisen darauf hin, dass die Art der Kohlenstoffquelle und der Mechanismus der Zuckeraufnahme eine Rolle in der Modulation der PrfA-Aktivität spielen könnten (Marr *et al.*, 2006; Mertins *et al.*, 2007; Milenbachs *et al.*, 1997). Es wurde ebenfalls gezeigt, dass die Regulation von PrfA durch verschiedene Zucker nicht auf transkriptioneller Ebene erfolgt (Gilbreth *et al.*, 2004).

PrfA wird von dem ersten Gen des Virulenzgenclusters LIPI-1 kodiert und kontrolliert seine eigene Transkription, sowie der fünf Virulenzgene innerhalb dieses Genclusters und einiger außerhalb liegender Virulenzgene. Ein LIPI-1-ähnliches Virulenzgencluster findet sich ebenso in *L. ivanovii* und *L. seeligeri* (Kreft *et al.*, 2002), und enthält auch *prfA*. Diese PrfA-Proteine weisen eine hohe Homologie zu dem PrfA-Protein aus *L. monocytogenes* auf (Glaser *et al.*, 2001).

In dieser Dissertation wurde zunächst untersucht, wie weit sich die verschiedenen PrfAs der drei Stämme *L. monocytogenes*, *L. ivanovii* und *L. seeligeri* in ihren Bindungseigenschaften an die PrfA-abhängigen *hly*- und *actA*-Promotoren der drei *Listeria*-Spezies unterscheiden.

### D.1 Bindungsstudien an listeriellen Promotoren

PrfA, der Hauptregulator der Virulenzgene in Listerien ist unerlässlich für eine erfolgreiche Pathogenese des Tier- und Humanpathogens *L. monocytogenes*, sowie des Tierpathogens *L. ivanovii*. Man findet PrfA aber auch in der nicht pathogenen Spezies *L. seeligeri*. Die Spezies-spezifischen Unterschiede zwischen den PrfAs der drei Listerien-Stämme bei der Bindung an Promotorbereiche PrfA-abhängiger Gene wurden mittels Gelretardationsexperimenten untersucht und aufgezeigt.

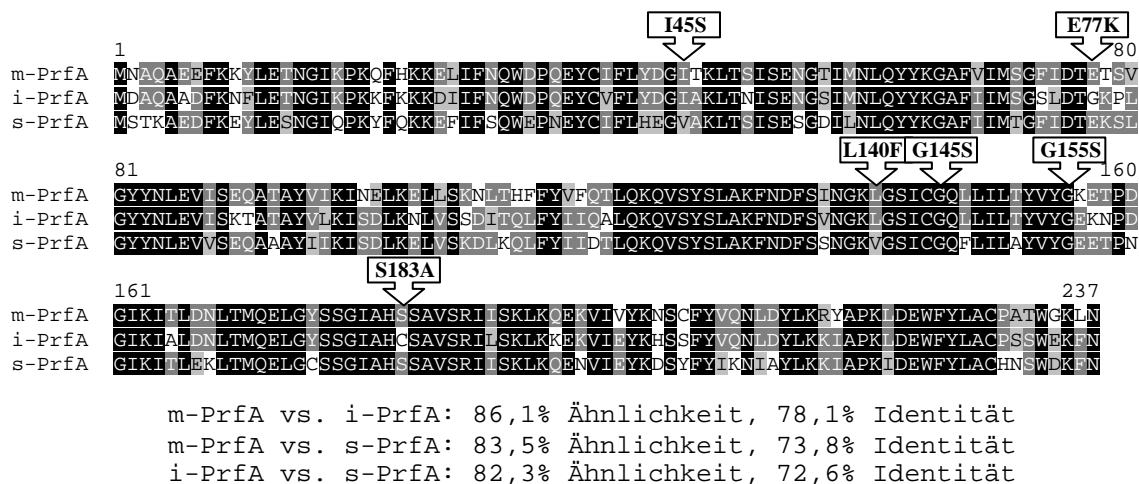


**Abbildung 18** Schematische Darstellung eines EMSA – Gezeigt sind die Komponenten der gebildeten CI-, CII und CIII-Komplexe.

In Gelretardationsexperimenten (auch electrophoretic mobility shift assay, kurz EMSA genannt) wird eine radioaktiv markierte Sonde, die ein bestimmtes Protein-Bindungsmotiv aufweist, mit Zellextrakten oder gereinigtem Protein inkubiert und anschließend in einem nativen Polyacrylamidgel aufgetrennt. Da die Bildung eines Protein-DNA-Komplexes die Gelmobilität des DNA-Fragments verlangsamt, kann dieser elektrophoretisch von der ungebundenen Sonde abgetrennt werden. Die in EMSA-Gelen mit PrfA mit und ohne RNA-Polymerase zu sehenden Banden werden als CI-, CII- und CIII-Komplexe bezeichnet (siehe Abbildung 18). Der CI-Komplex besteht aus der RNA-Polymerase (RNAP), der radioaktiv markierten PrfA-abhängigen Sonde und PrfA. Dieser Komplex ist der größte und wandert am langsamsten im Gel. Etwas schneller ist der kleinere CII-Komplex, der aus an die Sonde gebundener RNAP besteht. Der CIII-Komplex aus PrfA gebunden an die Sonde ist am kleinsten und wandert daher am weitesten (Böckmann *et al.*, 2000; Dickneite *et al.*, 1998).

Mit derartigen EMSAs wurde die Interaktion von m-PrfA<sub>nt</sub>, m-PrfA\*<sub>nt</sub> (nt = not tagged, da diese Proteine keinen His-Tag besitzen), m-PrfA und m-PrfA\* aus *L. monocytogenes*, i-PrfA aus *L. ivanovii*, s-PrfA aus *L. seeligeri* und dem Hybrid sm-PrfA mit der *Phly*- und *PactA*-Promotorregion aus allen drei Stämmen untersucht. Die Proteine wurden von Norman Mauder, Stefanie Müller-Altrock, Marcus Rauch und Regine Böckmann isoliert (C.6).

Die verschiedenen PrfA-Proteine weisen eine 97,5%ige Ähnlichkeit auf und sind in ihrer Proteinsequenz zu 64,6% identisch (Abbildung 19). Das konstitutiv aktive m-PrfA\* hat eine Aminosäuresubstitution an der Stelle 145 (G145S), welche dazu führt, dass m-PrfA\* nicht von äußeren Faktoren beeinflusst wird und dauerhaft aktiv ist.



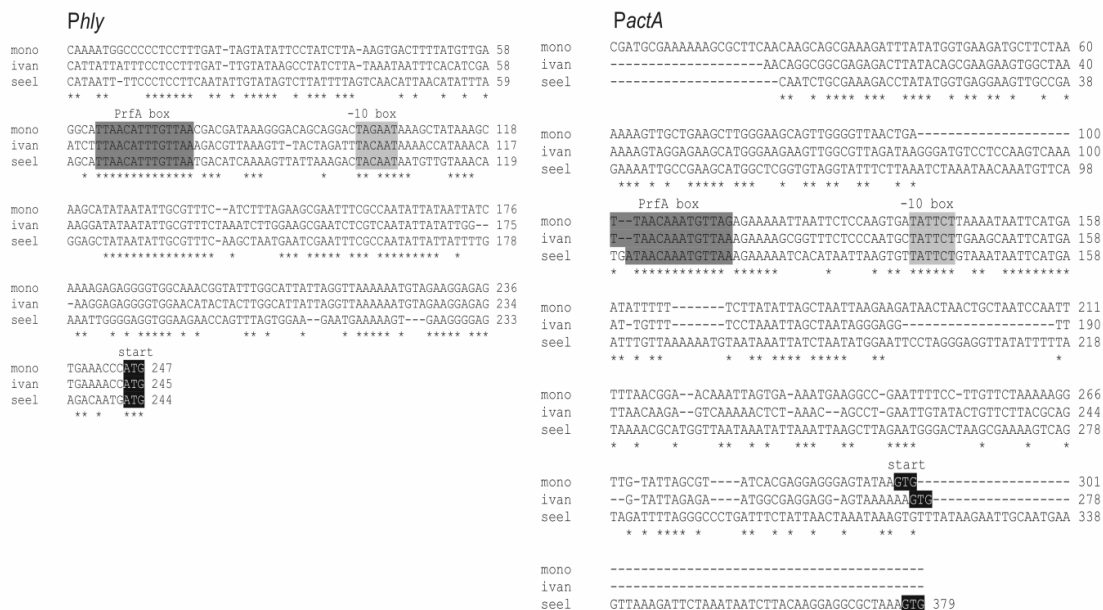
**Abbildung 19** ClustalW Analyse der PrfA-Proteine von *L. monocytogenes* (m-PrfA), *L. ivanovii* (i-PrfA) und *L. seeligeri* (s-PrfA). Die drei Proteine zeigen zusammen 97,5% Ähnlichkeit (bei Verwendung der Matrix BLOSUM 62) und 64,6% Identität. Paarweise Ähnlichkeiten und Identitäten sind unter dem Alignment angegeben. Mutationen, die zu einer Erhöhung der Aktivität von m-PrfA führen, sind durch Pfeile gekennzeichnet (nach N. Mauder).

### D.1.1 Herstellung der DNA-Sonden für EMSA

Die PrfA-abhängigen Promotoren von *hly* teilen sich in allen drei untersuchten *Listeria*-Spezies (*L. monocytogenes*, *L. ivanovii* und *L. seeligeri*) eine gemeinsame perfekte PrfA-Box (siehe Abbildung 20). Die PrfA-Box im *actA* Promotorbereich der drei Stämme unterscheidet sich um 1 bis 2 Basen von der Konsensussequenz. Um die PrfA-Bindeeigenschaften dieser PrfA-Boxen im Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) untersuchen zu können wurde



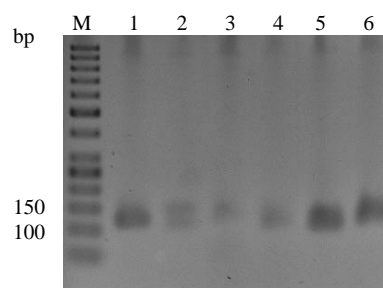
zunächst die DNA der kompletten Promotorbereiche dieser Gene mit den unter C.5.1 angegebenen Oligonukleotiden vervielfältigt. Dabei war es wichtig den ganzen Promotor zu



**Abbildung 20** ClustalW Alignment der *hly* und *actA* Promoter Regionen von *L. monocytogenes* (mono), *L. ivanovii* (ivan) and *L. seeligeri* (seel). Die PrfA Box, die -10 Box, der Translationsstartpunkt und identische Basenpaare in allen drei Sequenzen (\*) sind markiert (nach N. Mauder).

klonieren, da die Ausbildung eines CI-Komplexes den vollständigen Promotorbereich erfordert und auch der CIII-Komplex wesentlich effizienter gebildet wird (Dickneite *et al.*, 1998).

Abbildung 21 zeigt die Produkte der PCR-Reaktionen. Das 121 bp große Genprodukt der Oligonukleotide BM1 und BM2, der Promotorbereich des *hly* Gens in *L. monocytogenes* (m-*Phly*) und der 112 bp große m-*PactA* Promotorbereich (Genprodukt der Oligonukleotide CD1 und CD2).



**Abbildung 21** PCR-Produkte der Sonden für 1) m-*Phly*, 2) m-*PactA*, 3) i-*Phly*, 4) i-*PactA*, 5) s-*PactA* und 6) s-*Phly*. Mit 50 bp Marker aufgetragen

Mittels LivHly1 und 2 konnte der 131 bp große *hly*-Promotorbereich von *L. ivanovii* produziert werden und der 108 bp i-*PactA*-Promotorbereich mit LivActA1 und 2. Für den 127 bp großen *hly*- und den 108 bp langen *actA*-Promotorbereich von *L. seeligeri* wurden die Oligonukleotide LSHly1 und 2 sowie LSActA 1 und 2 verwendet. Die PCR-Produkte wurden anschließend aufgereinigt und für die EMSAs eingesetzt.

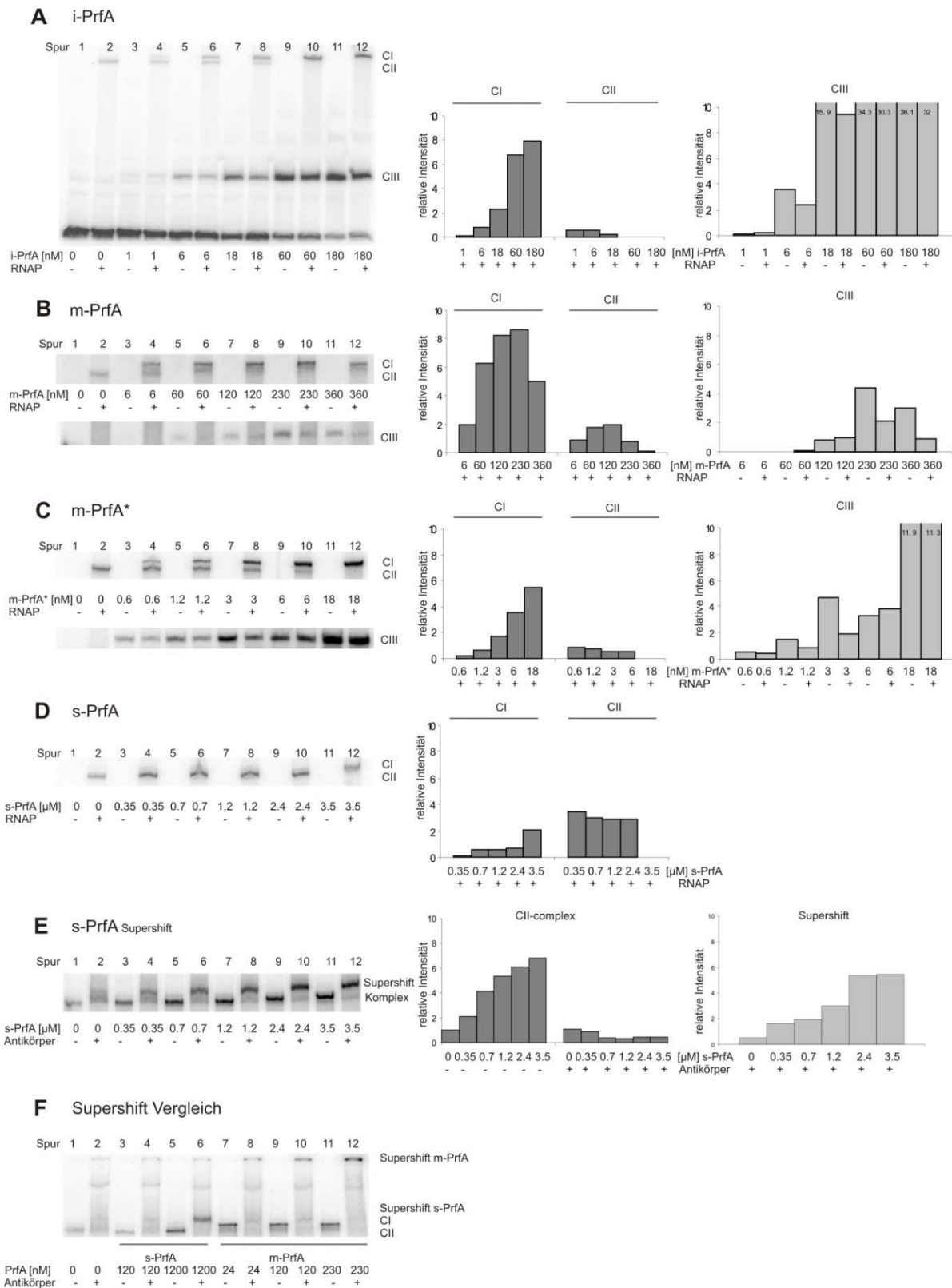
### D.1.2 Bindungsaffinität der verschiedenen PrfA-Proteine an den *hly*-Promotor von *L. monocytogenes*

In Gelretardationsexperimenten mit 5 nM Promotor-DNA wurde die Bindung verschiedener His<sub>6</sub>-markierter aufgereinigter PrfA-Proteine an den *hly* Promotor von *Listeria monocytogenes* (m-*Phly*) untersucht. Wie in Abbildung 22 A bis D (untere Spuren 3, 5, 7, 9 und 11) zu erkennen ist, konnte mit den Proteinen i-PrfA und m-PrfA\* eine eindeutige CIII-

Komplexbildung erreicht werden, wobei die Sättigung der Komplexbildung an 5 nM DNA für i-PrfA mit 60 nM und für m-PrfA\* mit 18 nM erreicht wurde. Im Vergleich dazu hat m-PrfA eine eindeutig schwächere Bindungsaffinität an den m-*Phly* Promotor und bildet erst mit 230 nM Protein einen gesättigten Komplex aus (Abbildung 22). Keinerlei CIII-Komplex konnte mit s-PrfA gezeigt werden, selbst mit einer Konzentrationserhöhung auf 3,5  $\mu$ M (Abbildung 22).

Durch die Zugabe von 1,5 nM RNA-Polymerase (RNAP) konnte parallel zu den CIII-Komplexen die Ausbildung von CI- und CII-Komplexen untersucht werden. Mit 1,5 nM RNAP wurde die Sättigung des CI-Komplexes aus m-*Phly* DNA, PrfA-Protein und RNAP mit 60 nM i-PrfA, 6 nM m-PrfA\* und 230 nM m-PrfA erreicht (Abbildung 22 obere Spuren 4, 6, 8, 10 und 12), also bei fast der gleichen Konzentration wie für den CIII-Komplex. Es konnte besonders für m-PrfA beobachtet werden, dass Konzentrationen von Proteinen über der Sättigungsgrenze wieder zu einer verringerten Komplexbildung führen.

Für s-PrfA (Abbildung 22) konnte auch mit erhöhter Menge an Protein keine Bande gezeigt werden, die in ihrem Laufverhalten im Gel von der des CII-Komplexes abwich. Da sich jedoch die Intensität dieser Bande mit zunehmender Menge an s-PrfA verstärkte, wurde davon ausgegangen, dass s-PrfA in diesem Komplex integriert ist. Nun wurden Supershift-Experimente durchgeführt, bei denen zum Ansatz gereinigter Antikörper gegen PrfA zugegeben wurde. Der Antikörper bindet an PrfA und verändert das Laufverhalten des Komplexes im Gel, wenn PrfA an die DNA gebunden ist. In Abbildung 22 E ist nach Zugabe des Antikörpers eine in ihrem Laufverhalten verlangsamte Bande erkennbar. Aus diesen Daten lässt sich schließen, dass mit 3,5  $\mu$ M s-PrfA eine Sättigung des CI-Komplexes erreicht ist. Ein mit m-PrfA und s-PrfA im Vergleich durchgeführtes Supershift-Experiment (Abbildung 22 F) konnte zeigen, dass die Supershift Bande von s-PrfA viel schneller im Gel wandert, als jene von m-PrfA.



**Abbildung 22** Bestimmung der Bindungsaffinität der PrfA-Proteine (mit und ohne Zugabe von RNA-Polymerase (RNAP)) an den PrfA-abhängigen m-*Phly* Promotor mittels Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA). Der EMSA wurde durchgeführt mit unterschiedlichen Konzentrationen an aufgereinigtem PrfA aus *L. ivanovii* (i-PrfA), *L. monocytogenes* (m-PrfA, m-PrfA\*) und *L. seeligeri* (s-PrfA), 5 nM *hly* Promotor DNA aus *L. monocytogenes* und 1,5 nM RNAP. CI (Komplex aus DNA, RNAP und PrfA), CII (Komplex aus DNA und RNAP) und CIII (Komplex aus DNA und PrfA) wurden mit dem ImageMaster™ Total Lab (Amersham) quantifiziert und in den Grafiken auf der rechten Seite angegeben. In Spur zwei ist jeweils eine Kontrolle aus DNA und RNAP zu sehen, deren CII-Bandenstärke als 1 gesetzt wurde, um alle anderen Werte darauf zu normalisieren.

### D.1.3 Auswirkung der verwendeten RNAP-Konzentration

Um festzustellen, ob die bisher verwendete RNAP-Konzentration von 1,5 nM schon in der Sättigung liegt, wurden Gelretardationsexperimente, mit zunehmender Konzentration an RNAP und konstanter Menge der PrfA-Proteine durchgeführt. Es wurden 230 nM m-PrfA, 3,5  $\mu$ M s-PrfA, 6 nM m-PrfA\* und 60 nM i-PrfA verwendet, da diese die vorher gezeigten Sättigungsmengen für die Ausbildung des CI-Komplexes darstellen (siehe E.1.1). Wie in Abbildung 23 zu sehen, wird mit den verwendeten PrfA-Mengen und geringerer RNAP-Konzentration als 1,5 nM die DNA vollständig in einen CI-Komplex geschifft, das heißt es ist kein CII-Komplex mehr erkennbar. Eine erhöhte RNAP-Konzentration von 3 nM zeigt einen kaum verstärkten CI-Komplex, aber teilweise werden CII-Komplexe wieder sichtbar, was zeigt, dass die verwendete RNAP-Konzentration nahe der Sättigung liegt.

In Abbildung 23 ist zu sehen, dass immer große Mengen m-PrfA\* und i-PrfA direkt an die DNA gebunden sind (CIII-Komplex) und diese auch bei erhöhter Menge an RNAP nicht in den CI-Komplex gebunden werden. Mit m-PrfA und vor allem s-PrfA scheint das Gegenteil der Fall zu sein. Der CI-Komplex wird bevorzugt gebildet und es ist sogar bei m-PrfA-Konzentrationen, die noch keinen CIII-Komplex zeigen, ein CI-Komplex detektierbar. Mit s-PrfA ist unter allen Bedingungen kein CIII-Komplex zu erkennen.



**Abbildung 23** Bestimmung der optimalen RNA-Polymerase (RNAP) Konzentration für Bindungsstudien im Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) am PrfA-abhängigen m-*Phly* Promotor aus *L. monocytogenes*. Der EMSA wurde durchgeführt mit konstanten Konzentrationen an aufgereinigtem PrfA aus *L. ivanovii* (i-PrfA), *L. monocytogenes* (m-PrfA, m-PrfA\*) und *L. seeligeri* (s-PrfA), 5 nM *hly* Promotor DNA aus *L. monocytogenes* und variablen Mengen RNAP.

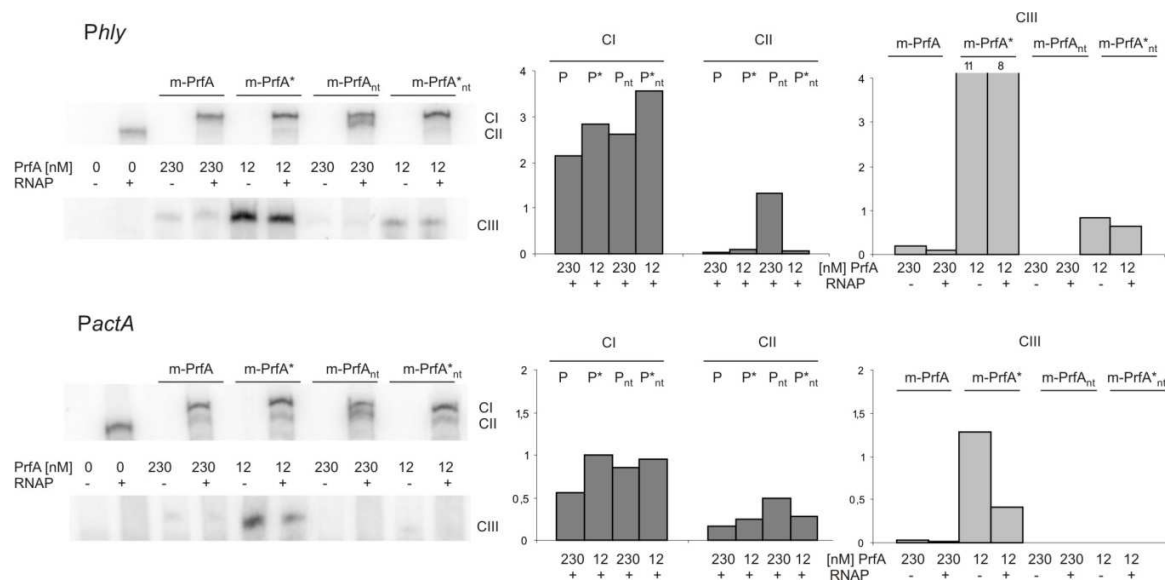
### D.1.4 Die Auswirkung der N-terminalen His<sub>6</sub>-Markierung von PrfA auf die Bindungsaffinität an PrfA-abhängige Promotoren

In weiteren EMSAs wurde ein möglicher Einfluss der His<sub>6</sub>-Markierung am N-Terminus der aufgereinigten Proteine auf die Bindungsaffinität untersucht. Dazu wurden die schon vorher verwendeten His<sub>6</sub>-markierten m-PrfA und m-PrfA\*, sowie die ohne His<sub>6</sub>-Markierung isolierten Proteine m-PrfA<sub>nt</sub> und m-PrfA\*<sub>nt</sub> am m-*Phly* und m-*PactA* Promotor von *L. monocytogenes* auf ihre Fähigkeit zur Bindung an die DNA verglichen. Wie schon zuvor beschrieben wurden wieder 5 nM DNA und 1,5 nM RNAP verwendet. Die eingesetzte Konzentration an PrfA lag mit 230 nM für m-PrfA und m-PrfA<sub>nt</sub> und 12 nM für m-PrfA\* sowie m-PrfA\*<sub>nt</sub> nahe der Sättigungskonzentration der His<sub>6</sub>-markierten Proteine (siehe Abbildung 22).

Wie in Abbildung 24 zu sehen ist, zeigen m-PrfA und m-PrfA\* eine höhere Effizienz CIII-Komplexe zu bilden als die nicht markierten m-PrfA\*<sub>nt</sub> und m-PrfA<sub>nt</sub>. Besonders auffällig ist die fast zehnmal höhere Bindungsaffinität von m-PrfA\* im Vergleich zu m-PrfA\*<sub>nt</sub> an m-*Phly*. Mit den eingesetzten PrfA-Mengen konnte an m-*Phly* und m-*PactA* für m-PrfA nur eine

schwache CIII-Bande und für m-PrfA<sub>nt</sub> gar kein CIII-Komplex detektiert werden. Besonders schwach waren in allen Fällen die Bindungen an den m-*PactA* Promotor, welcher im Gegensatz zum perfekten m-*Phly* einen Basenaustausch in der Konsensussequenz der PrfA-Box besitzt.

Interessanterweise zeigt die N-terminale His<sub>6</sub>-Markierung von PrfA keine zur starken CIII-Komplexbildung korrespondierende CI-Bildung. Wie in den CI-Banden zu sehen ist, beträgt der Unterschied zwischen den His<sub>6</sub>-markierten und den korrespondierenden unmarkierten PrfA-Proteinen höchstens Faktor zwei.



**Abbildung 24** Bestimmung der Bindungsaffinität von PrfA Proteinen an den PrfA-abhängigen m-*Phly* und m-*PactA* Promotor mittels Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA). Der EMSA wurde durchgeführt mit unterschiedlichen Konzentrationen an aufgereinigtem PrfA aus *L. monocytogenes* mit (m-PrfA, m-PrfA\*) und ohne His<sub>6</sub>-Markierung (m-PrfA<sub>nt</sub>, m-PrfA\*<sub>nt</sub>) im N-Terminus, 5 nM *hly* Promotor DNA aus *L. monocytogenes* und 1,5 nM RNAP. Der CI (Komplex aus DNA, RNAP und PrfA), CII (Komplex aus DNA und RNAP) und CIII (Komplex aus DNA und PrfA) wurden mit dem ImageMaster™ Total Lab (Amersham) quantifiziert und in den Grafiken auf der rechten Seite angegeben. In Spur zwei ist jeweils eine Kontrolle aus DNA und RNAP zu sehen, deren CII-Bandenstärke als 1 gesetzt wurde, um alle anderen Werte darauf zu normalisieren.

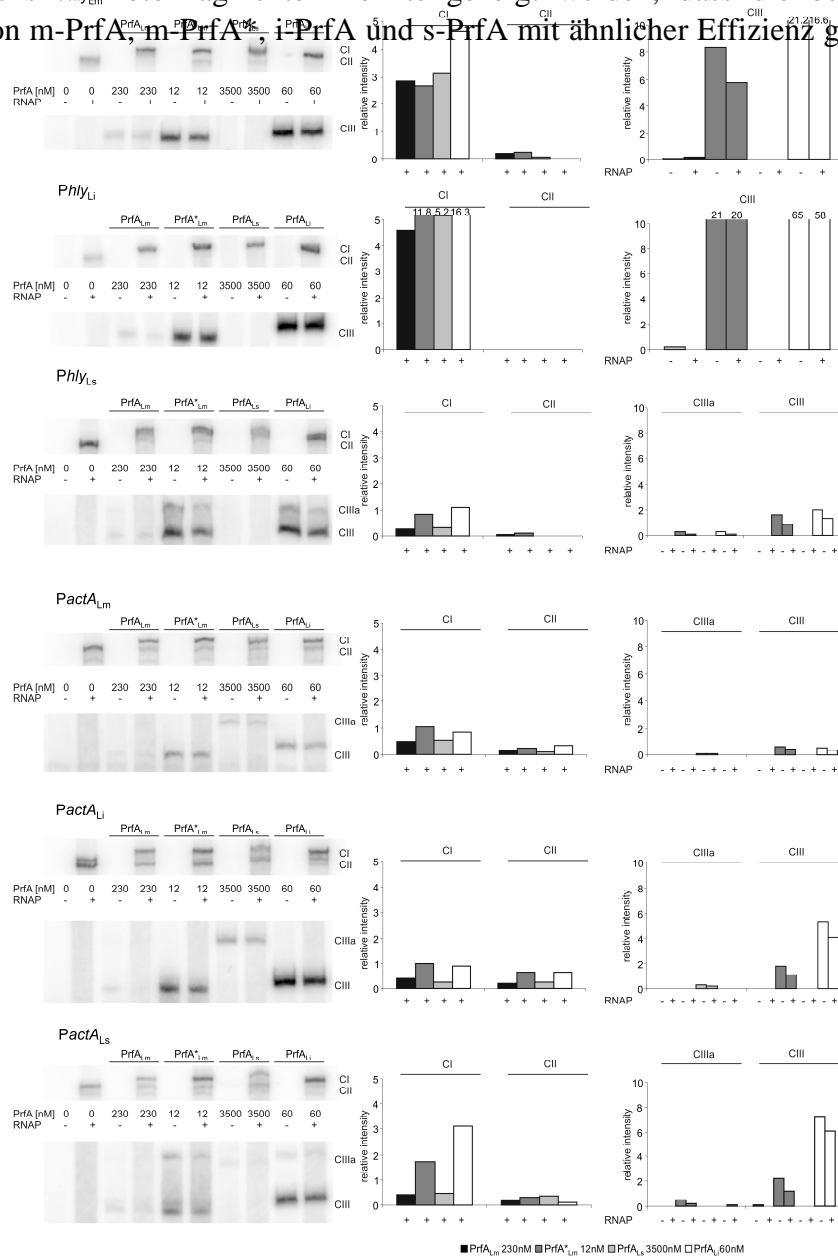
### D.1.5 Bindung von m-PrfA, m-PrfA\*, i-PrfA und s-PrfA an die *hly*- und *actA*- Promotoren von *L. monocytogenes*, *L. ivanovii* und *L. seeligeri*

In Abbildung 20 ist zu erkennen, dass signifikante Unterschiede in der Promotorsequenz der *actA*- und *hly*- Gene der drei Listerien-Spezies existieren. Daher wurde getestet, ob die PrfA-Proteine von *L. monocytogenes*, *L. ivanovii* und *L. seeligeri* besser an ihre spezifischen PrfA-Promotoren adaptiert sind als an die der anderen Spezies. Dazu wurden die in D.1.2 ermittelten optimalen Konzentrationen der PrfA-Proteine, 1,5 nM RNAP und je 5 nM DNA verwendet. Die Promotor-DNAs wurden wie folgt bezeichnet: m-*Phly*, i-*Phly*, s-*Phly* und m-*PactA*, i-*PactA*, s-*PactA*.

Abbildung 25 zeigt, dass die Bindungseffizienz der verschiedenen PrfA-Proteine, zu erkennen an der Stärke des gebildeten CIII-Komplexes, an allen sechs Promotoren ähnlich stark erscheint. Die Bindung von i-PrfA und m-PrfA\* ist am effizientesten, und die Bindung von i-PrfA fast gleich stark wie die von m-PrfA\*. Auffällig ist, dass bei der verwendeten hohen

Konzentration von s-PrfA (und manchmal auch bei i-PrfA und m-PrfA\*) an einigen Promotoren ein im Gel langsamer wandernder Komplex beobachtet werden konnte, der als CIIa bezeichnet wurde. Ebenso wandert der CIII-Komplex von i-PrfA an allen Promotoren etwas langsamer im Gel als die von m-PrfA und m-PrfA\*.

An allen sechs Promotorfragmenten konnte gezeigt werden, dass die beobachteten CI-Komplexe von m-PrfA, m-PrfA\*, i-PrfA und s-PrfA mit ähnlicher Effizienz gebildet wurden,



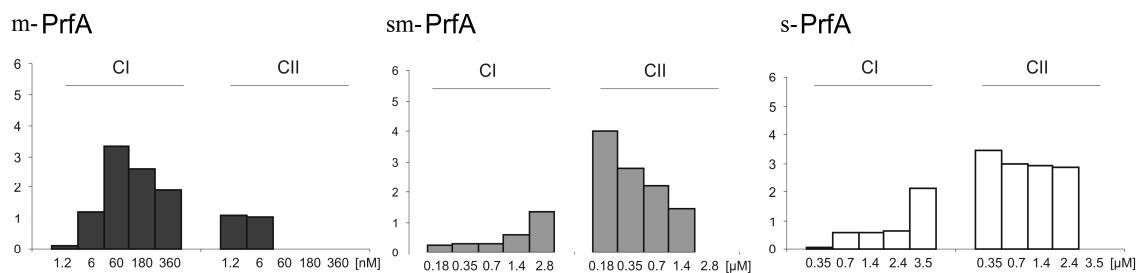
**Abbildung 25** Bestimmung der Bindungsaffinität der PrfA-Proteine an die PrfA-abhängigen *hly* und *actA* Promotoren von *L. monocytogenes*, *L. ivanovii* und *L. seeligeri* mittels Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA). Der EMSA wurde durchgeführt mit aufgereinigtem PrfA aus *L. monocytogenes* (230 nM m-PrfA, 12 nM m-PrfA\*), *L. seeligeri* (3,5 µM s-PrfA) und *L. ivanovii* (60 nM i-PrfA), 5 nM Promotor DNA und 1,5 nM RNAP. CI (Komplex aus DNA, RNAP und PrfA), CII (Komplex aus DNA und RNAP) und CIII (Komplex aus DNA und PrfA) wurden mit dem ImageMaster™ Total Lab (Amersham) quantifiziert und in den Grafiken auf der rechten Seite angegeben. In Spur zwei ist jeweils eine Kontrolle aus DNA und RNAP zu sehen, deren CII-Bandenstärke als 1 gesetzt wurde, um alle anderen Werte darauf zu normalisieren.

wobei die starken Unterschiede in der eingesetzten Proteinmenge zu beachten sind. Vor allem s-PrfA bildet mit einer fast 15 fach erhöht eingesetzten PrfA-Menge nur einen genauso guten CI-Komplex wie m-PrfA.

### D.1.6 Untersuchung der Bindungseigenschaften des Hybrids sm-PrfA

Der große Unterschied der Bindungsaffinität von s-PrfA zu m-PrfA könnte auf einen Aminosäureaustausch im C-Terminus (AS 200-237) von s-PrfA zurückzuführen sein, da in der restlichen Proteinsequenz nur vereinzelt Unterschiede zu der Aminosäuresequenz von m-PrfA und i-PrfA zu finden sind (siehe ClustalW Alignment in Abbildung 19). Zudem wurde die C-terminale Region von PrfA schon früher als kritisch für die Funktion von PrfA beschrieben (Herler *et al.*, 2001). Um herauszufinden, ob diese 38 Aminosäuren für die verringerte Bindung von s-PrfA an PrfA-abhängige Promotor-DNA verantwortlich sind, wurde von Norman Mauder ein hybrides Protein aus s-PrfA und m-PrfA (sm-PrfA) kloniert und aufgereinigt. Dieses besteht bis auf die 38 C-terminalen Aminosäuren aus m-PrfA aus der Aminosäuresequenz von s-PrfA.

In Gelretardationsexperimenten wurde nun die Bindungsaffinität von m-PrfA, sm-PrfA und s-PrfA an die *hly* Promotor DNA von *L. monocytogenes* untersucht. Die Bindung von sm-PrfA ist fast doppelt so stark, wie die von s-PrfA, und es erfolgt schon eine CI-Komplexbildung bei geringerer PrfA-Konzentration. Diese Werte reichen aber bei weitem noch nicht an die Bindungsstärke von m-PrfA heran (Abbildung 26).



**Abbildung 26** Bestimmung der Bindungsaffinität verschiedener PrfA-Proteinen an den PrfA-abhängigen *hly* Promotor von *L. monocytogenes* mittels Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA). Der EMSA wurde durchgeführt mit aufgereinigtem PrfA aus *L. monocytogenes*, *L. seeligeri* und dem Hybrid-PrfA, 5 nM Promotor DNA und 1,5 nM RNAP. CI (Komplex aus DNA, RNAP und PrfA), CII (Komplex aus DNA und RNAP) und CIII (Komplex aus DNA und PrfA) wurden mit dem ImageMaster™ Total Lab (Amersham) quantifiziert und in den Grafiken angegeben.

## D.2 PrfA-Aktivität von *Listeria monocytogenes* in verschiedenen Kulturmedien

Wie schon beschrieben, kann die Expression von *prfA* transkriptionell und posttranskriptionell reguliert werden (Hamon *et al.*, 2006). Zusätzlich haben offensichtlich die Kulturbedingungen einen Einfluss auf die Aktivität von PrfA. Eine eher geringe PrfA-Aktivität ist im Vollmedium BHI (brain-heart infusion), in tryptic soy broth (TSB) mit Cellobiose als Hauptkohlenstoffquelle und in definierten Medien in Anwesenheit leicht fermentierbarer Phosphoenolpyruvat-Phosphotransferase System (PTS) transportierter Zucker zu beobachten (Gilbreth *et al.*, 2004; Milenbachs *et al.*, 1997; Park and Kroll, 1993). In Anwesenheit der nicht-PTS-abhängigen Kohlenstoffquelle Glycerin ist die PrfA-Aktivität wesentlich höher (Joseph *et al.*, 2008; Mertins *et al.*, 2007). Während der Replikation in Säugetier-Wirtszellen wurde ebenfalls eine hohe PrfA-Aktivität beobachtet (Renzoni *et al.*, 1999).

Die Feststellung, dass hoch aktives PrfA\* nicht mehr von Umweltbedingungen beeinflusst wird (Mueller and Freitag, 2005; Ripio *et al.*, 1997; Shetron-Rama *et al.*, 2003; Vega *et al.*, 2004b; Wong and Freitag, 2004) und die hohe strukturelle Ähnlichkeit von PrfA und Crp aus *E. coli* (Lampidis *et al.*, 1994) führten zu der Annahme, dass wildtypisches PrfA von spezifischen Komponenten aktiviert werden könnte, ähnlich Crp, das von cAMP aktiviert wird (Eiting *et al.*, 2005). Die Suche nach einer solchen Komponente in *L. monocytogenes* ist aber bisher ohne Erfolg geblieben.

Andererseits haben die in D.1 gezeigten PrfA-Bindungs- und ebenfalls durchgeführte *in vitro* Transkriptionsstudien (Ecke *et al.*, 2006; Lalic-Mülthaler *et al.*, 2001; Luo *et al.*, 2004) gezeigt, dass gereinigtes PrfA fähig ist an PrfA-abhängige Promotoren zu binden und die Transkription ohne die Zugabe eines zusätzlichen Faktors fast genauso effizient zu starten wie gereinigtes PrfA\*. Diese Daten und Untersuchungen von Ermaloeva *et al.* (2004) lassen wiederum auf einen *in vivo* auf PrfA negativ einwirkenden Faktor schließen.

Um die PrfA-beeinflussenden Kulturbedingungen und Komponenten weiter zu charakterisieren, wurden der *L. monocytogenes* Wildtyp EGD (trägt eine autoregulierte Kopie von *prfA* im Genom) und die das *prfA*- bzw. *prfA*\*- Gen auf einem in hoher Kopienzahl vorliegenden pERL3-Plasmid tragende *prfA*-Deletionsmutante EGD $\Delta$ *prfA* in verschiedenen Medien untersucht. Die Gene *prfA* und *prfA*\* werden auf dem Plasmid unter Kontrolle der beiden konstitutiven Promotoren PprfA1 und PprfA2 auf konstant hohem Niveau exprimiert. Erwartungsgemäß sollte der PrfA\*-produzierende Stamm eine wesentlich höhere PrfA-Aktivität aufzeigen, da die beiden PrfA-produzierenden Stämme abhängig vom Wachstumsmedium reguliert werden sollten.

### D.2.1 Wachstum von *L. monocytogenes* EGD, EGD $\Delta$ *prfA*pPrfA und EGD $\Delta$ *prfA*pPrfA\* in verschiedenen Kulturmedien

Als Kulturmedien für die folgenden Versuche wurden BHI (brain-heart infusion), Luria-Bertani (LB) und ein definiertes Minimalmedium (MM, (Premaratne *et al.*, 1991)) ausgewählt.

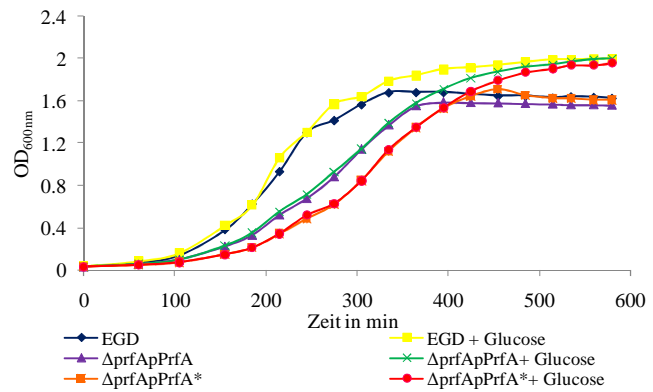


Abbildung 27 bis Abbildung 29 zeigen, dass *L. monocytogenes* EGD in BHI gut wächst, wohingegen ein Wachstum in LB ohne Zugabe einer Kohlenstoffquelle nur bis zu einer  $OD_{600nm}$  von 0,6 erfolgt. In einem auf Aminosäuren basierenden MM ohne eine Kohlenstoffquelle konnte kein Wachstum detektiert werden (Daten nicht gezeigt).

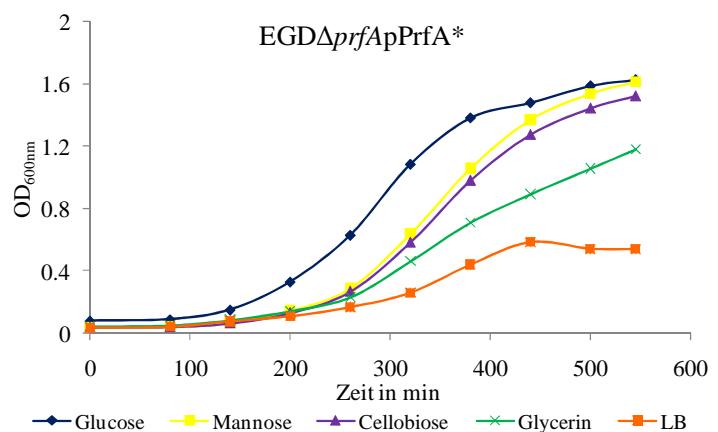
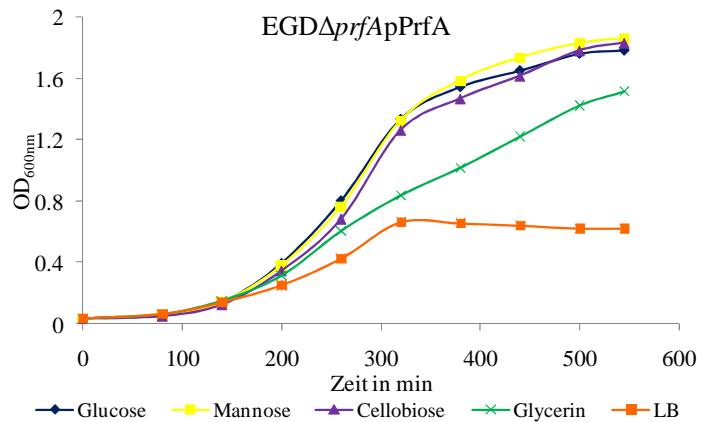
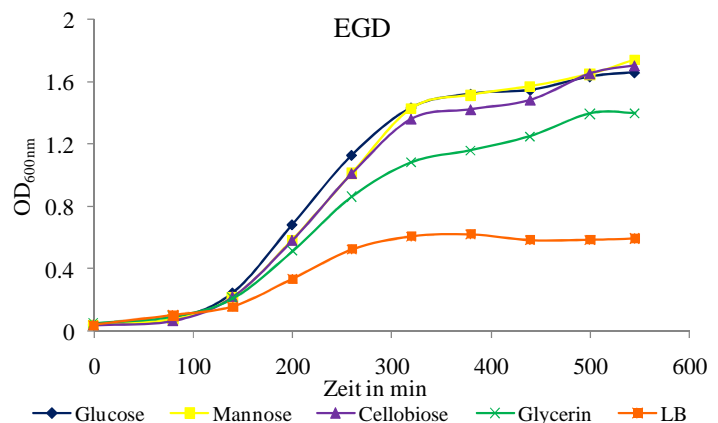
*L. monocytogenes* EGD wächst in BHI (Abbildung 27) in der logarithmischen Phase mit einer Generationszeit von 40 min, wobei die Zugabe von je 50 mM der Kohlenstoffquellen Glucose, Mannose, Cellobiose oder Glycerin die Wachstumsgeschwindigkeit nicht beeinflusst, aber zu einer stationären Phase mit erhöhter OD führt. Abbildung 27 zeigt jeweils nur das Wachstum der Stämme in BHI und in BHI mit 50mM Glucose, da die Zugabe von Mannose, Cellobiose und Glycerin das gleiche Wachstum bewirkt wie Glucose.

Die PrfA (\*) überexprimierenden Stämme *EGD $\Delta$ prfApPrfA* und *EGD $\Delta$ prfApPrfA\** wachsen mit einer Generationszeit von rund 50 min in BHI etwas langsamer als der Wildtyp. *EGD $\Delta$ prfApPrfA\** weist eine noch längere Lag-Phase auf als *EGD $\Delta$ prfApPrfA*. Diese Daten stimmen mit früheren Ergebnissen überein (Marr *et al.*, 2006).

Abbildung 28 zeigt, dass das Wachstum von *L. monocytogenes* EGD und der beiden PrfA(\*)-überexprimierenden Stämme in LB ohne zusätzliche Kohlenstoffquelle nie eine  $OD_{600nm}$  von 0,6 überschreitet. Die Zelldichte konnte aber durch die Zugabe von 50 mM Glucose, Mannose, Cellobiose oder Glycerin erhöht werden und die Stämme erreichten in der stationären Phase eine



**Abbildung 27** Wachstum von EGD, *EGD $\Delta$ prfApPrfA* und *EGD $\Delta$ prfApPrfA\** in BHI mit und ohne Zugabe von 50mM Glucose



**Abbildung 28** Wachstum von EGD, *EGD $\Delta$ prfApPrfA* und *EGD $\Delta$ prfApPrfA\** in LB mit und ohne Zugabe von 50mM Glucose, Mannose, Cellobiose oder Glycerin

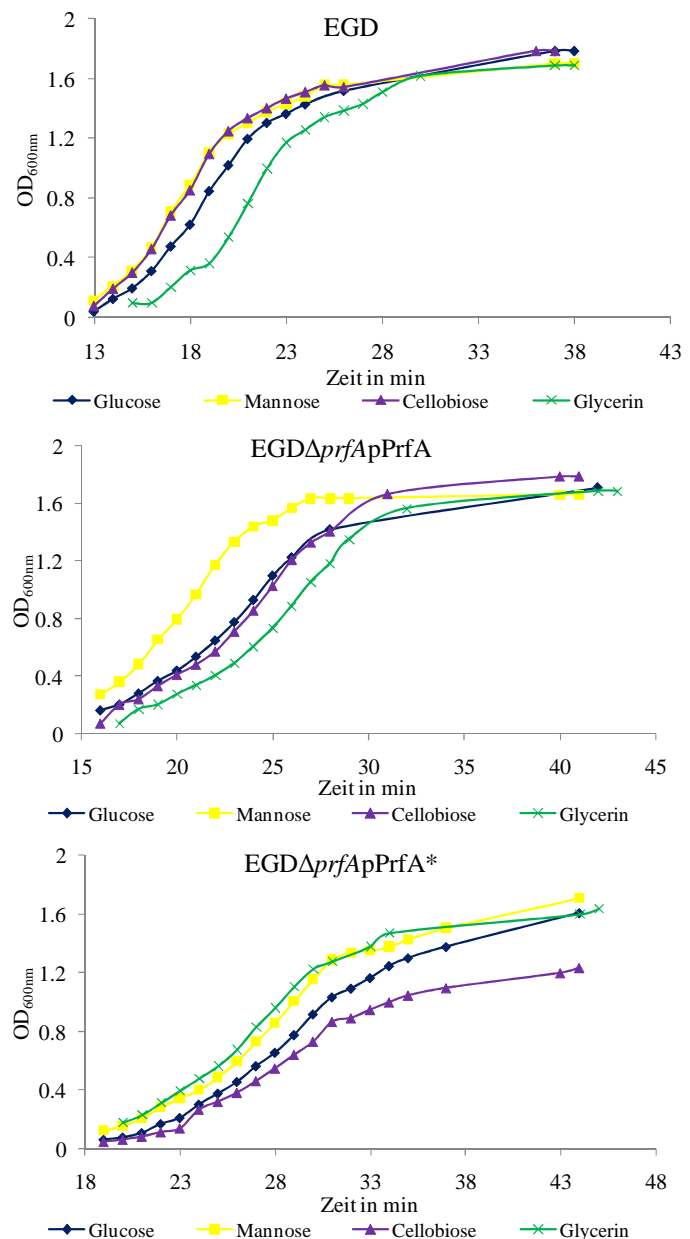
OD<sub>600nm</sub> von 1,8, die der stationären Phase in BHI entspricht. Nur Glycerin konnte als Kohlenstoffquelle nie zu einer so hohen stationären Phase führen.

Die Generationszeit von EGD in LB ohne Kohlenstoffquelle liegt bei 70 min. Die Zugabe von 50 mM Glycerin verringert diese auf 50 min und mit 50 mM Glucose, Mannose oder Cellobiose repliziert EGD in LB wie in BHI mit einer Generationszeit von 40 min. EGD $\Delta$ *prfApPrfA* hat im Vergleich dazu eine jeweils um 10 min verlangsamte Generationszeit, und bei EGD $\Delta$ *prfApPrfA*\* erhöht sich die Generationszeit noch mehr. EGD $\Delta$ *prfApPrfA*\* verdoppelt seine Bakterienzahl in LB ohne Kohlenstoffquelle in 90 min, Glycerin verkürzt diese auf rund 80 min, und in den drei Zuckern dauert die Verdopplung etwa 60 min.

Um den Einfluss der schon in den Medien selbst enthaltenen Kohlenstoffquellen auszuschließen wurde das Wachstum der drei Stämme in definiertem Minimalmedium (MM) (Premaratne *et al.*, 1991) untersucht (Abbildung 29). In reinem Minimalmedium (ohne Zugabe einer Kohlenstoffquelle) ist *L. monocytogenes* nicht in der Lage zu replizieren (Daten nicht gezeigt). Durch die Zugabe von 50 mM Glucose, Mannose, Cellobiose oder Glycerin kann nach einer verlängerten Lag-Phase ein gutes Wachstum beobachtet werden. EGD repliziert mit den über PTS aufgenommenen Zuckern (Mertins *et al.*, 2007) Glucose, Mannose oder Cellobiose als Kohlenstoffquelle nach etwa 100 min, also einer deutlich langsameren Generationszeit als in BHI oder LB. Glycerin als einzige Kohlenstoffquelle verlängert die Generationszeit auf 110 min.

Verglichen mit dem Wildtyp sind die Generationszeiten von EGD $\Delta$ *prfApPrfA* und EGD $\Delta$ *prfApPrfA*\* in allen vier Kohlenstoffquellen deutlich verlängert.

Die Generationszeiten beider Stämme sind in Glucose-haltigem MM bei etwa 220 min angesiedelt. In Mannose benötigt die Verdopplung rund 200 min, 235 min in Cellobiose, und 210 min mit Glycerin als einziger Kohlenstoffquelle.

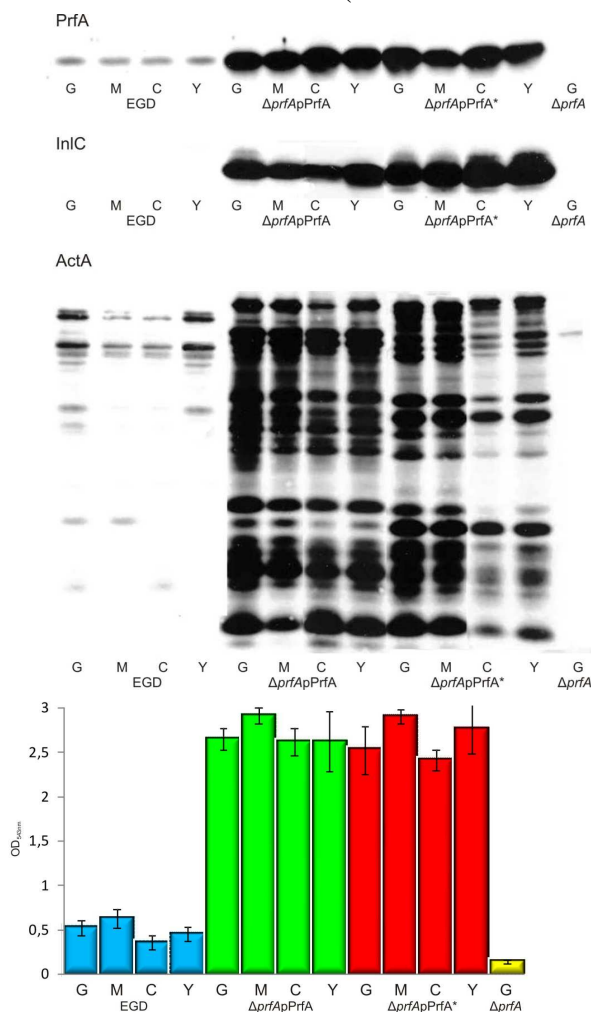


**Abbildung 29** Wachstum von EGD, EGD $\Delta$ *prfApPrfA* und EGD $\Delta$ *prfApPrfA*\* in MM mit Zugabe von 50mM Glucose, Mannose, Cellobiose oder Glycerin

Beim Betrachten dieser Generationszeiten und Lag-Phasen während des Wachstums von EGD, EGD $\Delta$ prfApPrfA und EGD $\Delta$ prfApPrfA\* ist immer auch zu beachten, dass die zwei PrfA(\*)-überexprimierenden Stämme zusätzlich unter Erythromycin Druck standen. Dieser Umstand verringert aber nicht die Wachstumsrate dieser Stämme, sondern verlängert nur die Lag-Phase. Eine EGD $\Delta$ prfA Mutante mit dem pERL3-Plasmid unter Erythromycinzugabe weist in BHI dieselbe Wachstumsrate auf wie der Wildtyp, aber eine um rund 10 min verlängerte Lag-Phase (Ecke, 2004). Dieser Stamm wurde in dieser Arbeit ebenfalls auf das Wachstum in LB und MM untersucht und zeigte eine ähnliche Verzögerung der Lag-Phase wie in BHI, aber keine verlangsamte Generationszeit (Daten nicht gezeigt).

## D.2.2 PrfA-Aktivität von *L. monocytogenes* EGD, EGD $\Delta$ prfApPrfA und EGD $\Delta$ prfApPrfA\* in BHI Medium

Die PrfA-Aktivität wurde durch Western Blot Analysen mit  $\alpha$ -PrfA,  $\alpha$ -InlC und  $\alpha$ -ActA Antikörpern, sowie im Hämolysetest detektiert. Sie hängt bei in BHI gewachsenem *L. monocytogenes* EGD stark von der PrfA-Menge ab und wird kaum von einer zusätzlichen Kohlenstoffquelle beeinflusst. Wie in Abbildung 30 und Abbildung 31 zu sehen ist, wird vom Wildtyp in BHI nur wenig PrfA produziert. Die Aktivität des von EGD in BHI produzierten PrfA's ist zudem sehr gering, da kein InlC zu detektieren ist, ActA nur in geringen Mengen und die hämolytische Aktivität ist auch sehr gering. Die Zugabe von Cellobiose ins Medium reduziert dies noch weiter, wohingegen Glucose, Mannose und Glycerin keinen Einfluss auf die PrfA-Aktivität haben (Daten in BHI ohne Kohlenstoffquelle sind nicht gezeigt).



**Abbildung 30** Nachweis der PrfA-, InlC- und ActA-Expression im Western Blot. Der Wildtyp EGD und die PrfA-überexprimierenden Stämme EGD $\Delta$ prfApPrfA und EGD $\Delta$ prfApPrfA\* wurden in BHI mit Zugabe von 50 mM Glucose (G), Mannose (M), Cellobiose (C) oder Glycerin (Y) bis zu einer OD<sub>600nm</sub> von 0,8 gezogen. Gleiche Mengen Protein (5  $\mu$ g) wurden auf ein 12%-iges SDS-Gel aufgetragen und mit  $\alpha$ -PrfA,  $\alpha$ -InlC und  $\alpha$ -ActA Antikörpern immungefärbt. Proben von EGD $\Delta$ prfA gewachsen in BHI mit 50 mM Glucose wurden als Negativkontrolle aufgetragen.

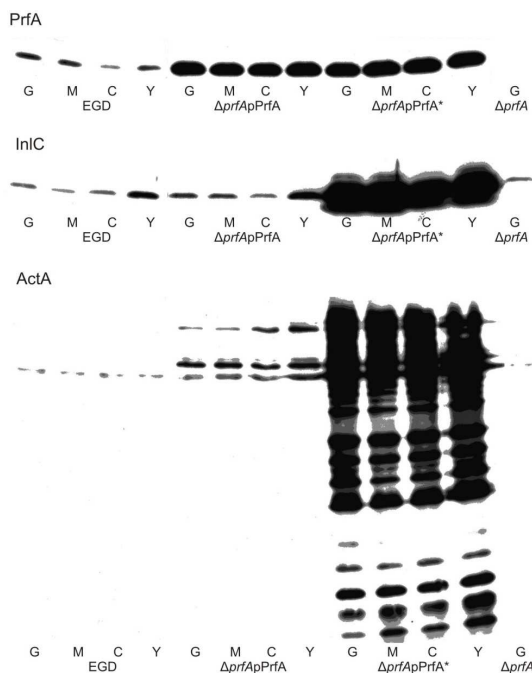
**Abbildung 31** Nachweis der hämolytischen Aktivität. Der Wildtyp EGD und die PrfA überexprimierenden Stämme EGD $\Delta$ prfApPrfA und EGD $\Delta$ prfApPrfA\* wurden in BHI mit Zugabe von 50 mM Glucose (G), Mannose (M), Cellobiose (C) oder Glycerin (Y) bis zu einer OD<sub>600nm</sub> von 0,8 gezogen. Die hämolytische Aktivität wurde mit 50  $\mu$ l Kulturüberstand bei OD<sub>543nm</sub> gemessen. Proben von EGD $\Delta$ prfA gewachsen in BHI mit 50 mM Glucose wurden als Negativkontrolle verwendet.

Die PrfA überexprimierenden Stämme  $EGD\Delta prfApPrfA$  und  $EGD\Delta prfApPrfA^*$  produzieren mindestens zehnmal so viel PrfA-Protein wie der Wildtyp. An den Proteinenmengen der PrfA-abhängigen Gene *inlC*, *hly* und *actA* kann man sehen, dass sich nicht nur die Menge, sondern auch die PrfA-Aktivität von  $EGD\Delta prfApPrfA$  und  $EGD\Delta prfApPrfA^*$  ähneln. Interessanterweise verringert die Zugabe von Cellobiose in das Vollmedium BHI im Gegensatz zum Wildtyp weder die PrfA-Menge, noch die Aktivität in beiden überexprimierenden Stämmen. Die ActA-Expression von  $EGD\Delta prfApPrfA^*$  in BHI mit Cellobiose und Glycerin erscheint zwar in dem dargestellten Blot verringert, dieses Ergebnis ist aber auf Blots anderer Experimente nicht erkennbar und somit ein experimentelles Artefakt.

### D.2.3 PrfA-Aktivität von *L. monocytogenes* EGD, $EGD\Delta prfApPrfA$ und $EGD\Delta prfApPrfA^*$ in LB Medium

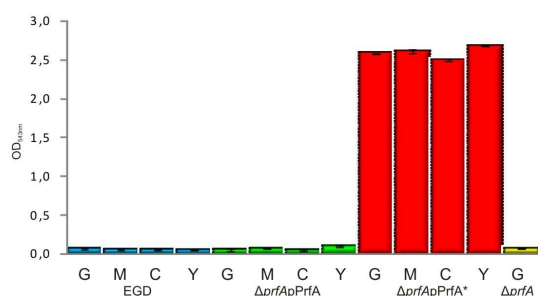
Die PrfA-Aktivität von *L. monocytogenes* ist in LB Medium sehr stark inhibiert, sogar wenn große Mengen an PrfA produziert werden.

Wie in Abbildung 32 und Abbildung 33 zu erkennen ist, exprimiert der Wildtyp EGD in LB versetzt mit 50 mM der PTS-Zucker Glucose, Mannose oder Cellobiose nur eine sehr geringe PrfA-Menge und auch eine Aktivierung der Gene *inlC*, *hly* und *actA* ist kaum messbar. Die Zugabe von 50 mM Glycerin hat eine schwache Auswirkung auf die produzierte Menge an InlC, führt aber zu keiner Erhöhung der Menge an PrfA, LLO (Listeriolysin) und ActA.



**Abbildung 32** Nachweis der PrfA-, InlC -und ActA-Expression im Western Blot. Der Wildtyp EGD und die PrfA-überexprimierenden Stämme  $EGD\Delta prfApPrfA$  und  $EGD\Delta prfApPrfA^*$  wurden in LB mit Zugabe von 50 mM Glucose (G), Mannose (M), Cellobiose (C) oder Glycerin (Y) bis zu einer  $OD_{600nm}$  von 0,8 gezogen.

Gleiche Mengen Protein (5  $\mu$ g) wurden auf ein 12%-iges SDS-Gel aufgetragen und mit  $\alpha$ -PrfA,  $\alpha$ -InlC und  $\alpha$ -ActA Antikörpern immungefärbt. Proben von  $EGD\Delta prfA$  gewachsen in LB mit 50 mM Glucose wurden als Negativkontrolle aufgetragen.



**Abbildung 33** Nachweis der hämolytischen Aktivität. Der Wildtyp EGD und die PrfA-überexprimierenden Stämme  $EGD\Delta prfApPrfA$  und  $EGD\Delta prfApPrfA^*$  wurden in LB mit Zugabe von 50 mM Glucose (G), Mannose (M), Cellobiose (C) oder Glycerin (Y) bis zu einer  $OD_{600nm}$  von 0,8 gezogen. Die hämolytische Aktivität wurde mit 50  $\mu$ l Kulturüberstand bei  $OD_{543nm}$  gemessen.

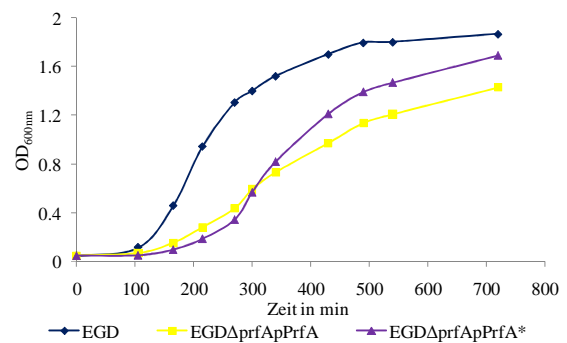
Proben von  $EGD\Delta prfA$  gewachsen in LB mit 50 mM Glucose wurden als Negativkontrolle verwendet.

Gleiche Mengen an PrfA- und PrfA\*-Protein wurden mit den Stämmen EGD $\Delta$ prfApPrfA und EGD $\Delta$ prfApPrfA\* unter den oben genannten Wachstumsbedingungen beobachtet. Die PrfA\*-Aktivität von EGD $\Delta$ prfApPrfA\* ist in LB mit 50 mM Glucose, Mannose, Cellobiose und Glycerin gleich hoch und wird wie in BHI nicht von den verschiedenen Zuckern beeinflusst. EGD $\Delta$ prfApPrfA bleibt jedoch in der PrfA-Aktivität trotz hoher PrfA-Menge mit allen PTS-Zuckern auf dem Level des Wildtyps und zeigt kaum Expression von InlC, ActA und LLO. Nur nach Zugabe von 50 mM Glycerin konnte eine geringe Erhöhung der PrfA-Aktivität beobachtet werden.

#### D.2.4 Auswirkung des Amberlite XAD4 auf *L. monocytogenes* EGD, EGD $\Delta$ prfApPrfA und EGD $\Delta$ prfApPrfA\* in LB

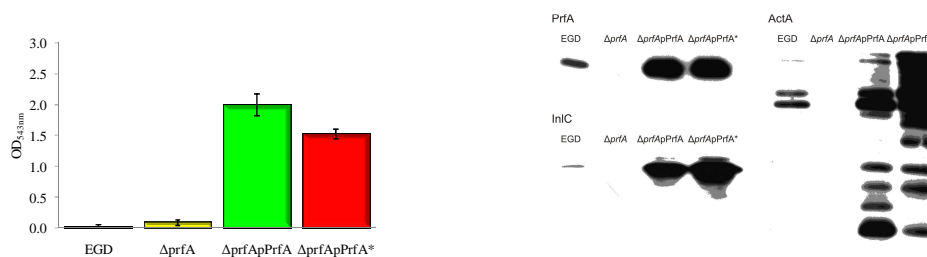
Wie schon bekannt ist stimulieren Aktivkohle und das Amberlite XAD4 die Aktivität von PrfA (Ermolaeva *et al.*, 1999; Rauch, 2003). Aus diesem Grund wurde die Auswirkung von 1% XAD4 auf die untersuchten Stämme in LB Medium versetzt mit 50 mM Glucose untersucht und gezeigt, welchen Einfluss die Substanz auf die PrfA-Aktivität bei großen und geringen Mengen an gebildetem PrfA hat.

Abbildung 34 zeigt, dass das Wachstum von EGD durch die Zugabe von 1% XAD4 ins Medium kaum beeinflusst wird, und die Generationszeit beträgt etwa 45 min. Bei EGD $\Delta$ prfApPrfA und EGD $\Delta$ prfApPrfA\* zeigt sich dagegen ein starker Einfluss. Die Generationszeit von EGD $\Delta$ prfApPrfA\* wird auf etwa 100 min verlangsamt, die von EGD $\Delta$ prfApPrfA verlängert sich sehr stark auf gut 200 min.



**Abbildung 34** Wachstum von EGD, EGD $\Delta$ prfApPrfA und EGD $\Delta$ prfApPrfA\* in LB mit 50mM Glucose und 1 % XAD4

Die Menge an gebildetem PrfA verändert sich durch die Zugabe von 1 % XAD4 bei allen Stämmen nicht (Abbildung 35), aber die Aktivität. Die PrfA-Aktivität in EGD $\Delta$ prfApPrfA\* wird nicht weiter beeinflusst, da die etwas geringer wirkende hämolytische Aktivität im Rahmen der Exaktheit von Hämolyse-Tests nicht entscheidend ist. ActA und InlC werden ähnlich stark gebildet wie ohne XAD4. Der Wildtyp bildet nach Wachstum in XAD4-haltigem LB Medium mit 50 mM Glucose etwas mehr InlC und ActA, als ohne das Amberlite. Vor allem bei EGD $\Delta$ prfApPrfA ist ein starker Unterschied zu erkennen. Nach Wachstum in 1 % XAD4-haltigem LB erhöht sich die PrfA-Aktivität von praktisch nicht vorhanden auf gleiches Niveau wie EGD $\Delta$ prfApPrfA\* (Vergleich Abbildungen 32, 33, 35).

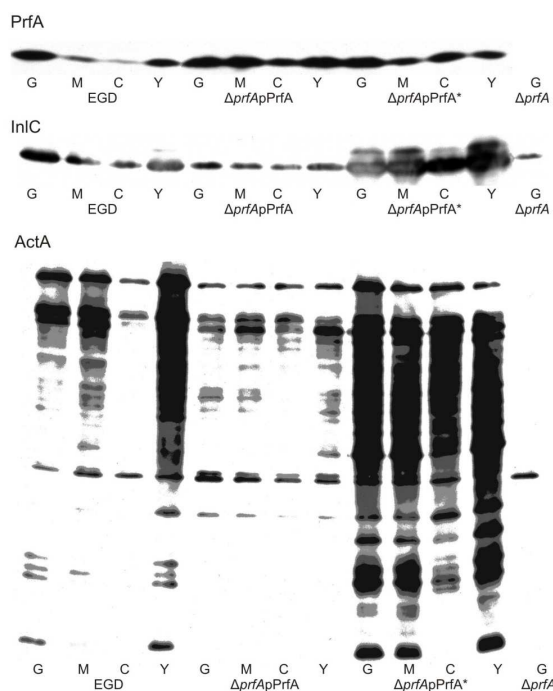


**Abbildung 35** Nachweis der hämolytischen Aktivität und der PrfA-, InlC- und ActA-Expression im Western Blot. Der Wildtyp EGD und die PrfA überexprimierenden Stämme EGD $\Delta$ prfApPrfA und EGD $\Delta$ prfApPrfA\* wurden in LB mit Zugabe von 50 mM Glucose und 1 % XAD4 bis zu einer OD<sub>600nm</sub> von 0,8 gezogen und anschließend präpariert. Proben von EGD $\Delta$ prfA dienen als Negativkontrolle.

## D.2.5 PrfA-Aktivität von *L. monocytogenes* EGD, EGD $\Delta$ *prfApPrfA* und EGD $\Delta$ *prfApPrfA*\* in MM

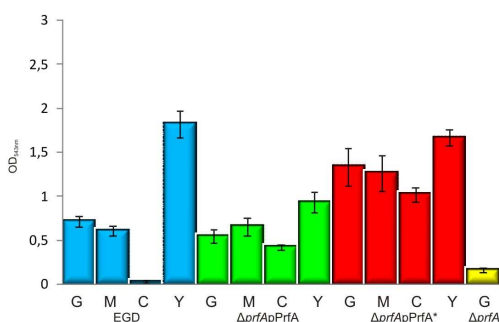
Schließlich wurde noch die PrfA-Aktivität der untersuchten Stämme in definiertem Minimalmedium (Premaratne *et al.*, 1991), versetzt mit 50 mM Glucose, Mannose, Cellobiose oder Glycerin untersucht. Beim Wildtyp ist die Menge an PrfA und auch die PrfA-Aktivität in Cellobiose-haltigem MM sehr gering. Wird jedoch Glucose, Mannose oder Glycerin als Kohlenstoffquelle verwendet, so steigen die PrfA-Proteinmenge und die PrfA-Aktivität beträchtlich an. Die ActA-Menge und die hämolytische Aktivität von EGD gleicht in Glycerin-haltigem MM sogar der von EGD $\Delta$ *prfApPrfA*\*.

Die Menge an PrfA- und PrfA\*-Protein in den Stämmen EGD $\Delta$ *prfApPrfA* und EGD $\Delta$ *prfApPrfA*\* ist wie erwartet hoch. EGD $\Delta$ *prfApPrfA*\* zeigt die vermutet starke PrfA-Aktivität. Jedoch führt in MM die hohe zelluläre PrfA-Proteinkonzentration von EGD $\Delta$ *prfApPrfA* nicht zu der erwarteten hohen PrfA-Aktivität, sondern in allen Kohlenstoffquellen zu einer geringen PrfA-Aktivität. Dies ist sichtbar an der niedrigen Expression von InlC, ActA und der geringen hämolytischen Aktivität im Vergleich zu EGD $\Delta$ *prfApPrfA*\*. Interessanterweise hemmt Cellobiose als einzige Kohlenstoffquelle die PrfA-Menge und -Aktivität in EGD $\Delta$ *prfApPrfA* nicht so stark wie im Wildtyp, sondern EGD $\Delta$ *prfApPrfA* zeigt in allen vier Kohlenstoffquellen eine ähnlich niedrige PrfA-Aktivität und -Menge.



**Abbildung 36** Nachweis der PrfA-, InlC- und ActA-Expression im Western Blot. Der Wildtyp EGD und die PrfA überexprimierenden Stämme EGD $\Delta$ *prfApPrfA* und EGD $\Delta$ *prfApPrfA*\* wurden in MM mit Zugabe von 50 mM Glucose (G), Mannose (M), Cellobiose (C) oder Glycerin (Y) bis zu einer OD<sub>600nm</sub> von 0,8 gezogen.

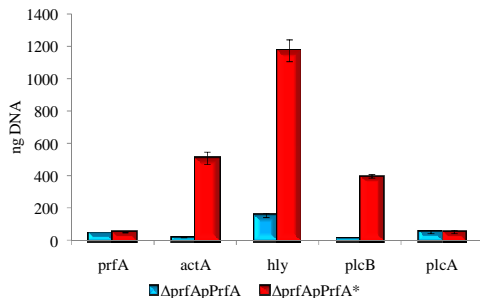
Gleiche Mengen Protein (5  $\mu$ g) wurden auf ein 12%-iges SDS-Gel aufgetragen und mit  $\alpha$ -PrfA,  $\alpha$ -InlC und  $\alpha$ -ActA Antikörpern immungefärbt. Proben von EGD $\Delta$ *prfA* gewachsen in MM mit 50 mM Glucose wurden als Negativkontrolle mit aufgetragen.



**Abbildung 37** Nachweis der hämolytischen Aktivität. Der Wildtyp EGD und die PrfA überexprimierenden Stämme EGD $\Delta$ *prfApPrfA* und EGD $\Delta$ *prfApPrfA*\* wurden in MM mit Zugabe von 50 mM Glucose (G), Mannose (M), Cellobiose (C) oder Glycerin (Y) bis zu einer OD<sub>600nm</sub> von 0,8 gezogen. Die hämolytische Aktivität wurde mit 50  $\mu$ l Kulturüberstand bei OD<sub>543nm</sub> gemessen.

Proben von EGD $\Delta$ *prfA* gewachsen in MM mit 50 mM Glucose wurden als Negativkontrolle verwendet.

In einer quantitativen Real-Time-PCR Analyse der Stämme  $EGD\Delta prfApPrfA$  und  $EGD\Delta prfApPrfA^*$  (Abbildung 38) konnten zudem die gleichen Mengen an *prfA*- und *plcA*-RNA, jedoch unterschiedliche Mengen an RNA der PrfA-abhängigen Gene *actA*, *hly* und *plcB* nachgewiesen werden. Es ist also auf RNA- und Proteinebene zu erkennen, dass von  $EGD\Delta prfApPrfA$  und  $EGD\Delta prfApPrfA^*$  zwar gleiche Mengen an PrfA gebildet werden, dieses aber unterschiedlich aktiv ist.

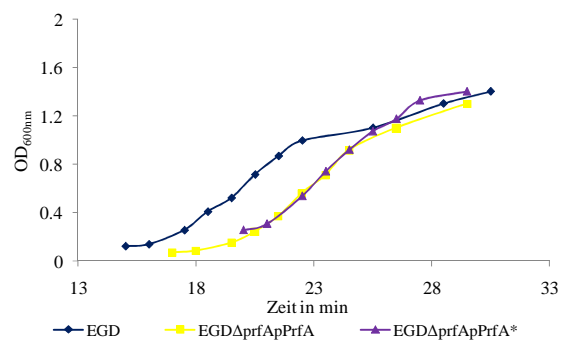


**Abbildung 38** Real-Time-PCR mit Angabe der relativen Transkriptmenge auf cDNA-Ebene von *prfA* und den PrfA-abhängigen Genen *actA*, *hly*, *plcB*, *plcA* der Stämme  $EGD\Delta prfApPrfA$  und  $EGD\Delta prfApPrfA^*$ . Die RNA wurde nach Wachstum in MM mit 50 mM Glucose bis zu einer  $OD_{600nm}$  von 0,8 isoliert.

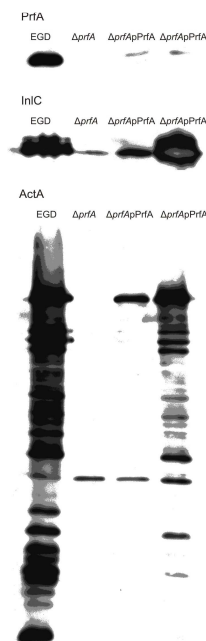
## D.2.6 Auswirkung des Amberlite XAD4 auf *L. monocytogenes* in MM

Die Zugabe von 1 % XAD4 hat in MM mit Glucose keinen Verstärkungseffekt der PrfA-Aktivität wie man es bei LB sehen kann. Beim Wildtyp EGD hat die Zugabe von XAD4 in das MM eine leichte Erhöhung der PrfA-Aktivität zur Folge. Bei den PrfA- bzw. PrfA\*-überexprimierenden Stämmen  $EGD\Delta prfApPrfA$  und  $EGD\Delta prfApPrfA^*$  ist eher ein gegenteiliger Effekt zu beobachten. Interessanterweise korreliert dies mit den Beobachtungen zum Wachstum (Abbildung 39), denn nach Zugabe von XAD4 wird die Generationszeit von EGD auf etwa 130 min verlangsamt. Bei den beiden PrfA(\*) überexprimierenden Stämmen verringert sich die Generationszeit stark auf nur etwa 170 min.

Im Wildtyp EGD wird nach Wachstum in MM mit 50 mM Glucose und 1 % XAD4 mehr PrfA gebildet als ohne Zugabe von XAD4. Dadurch erhöht sich auch sehr stark die Menge an gebildetem ActA, InlC und die hämolytische Aktivität. Auf die PrfA-Menge und -Aktivität von  $EGD\Delta prfApPrfA$  und  $EGD\Delta prfApPrfA^*$  hat die Zugabe von 1 % XAD in Glucose-haltiges Minimalmedium keinen Einfluss. Vergleicht man die Abbildung 37 und Abbildung 40 scheint die Aktivität und PrfA-Menge in beiden

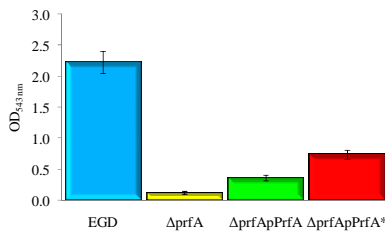


**Abbildung 39** Wachstum von EGD,  $EGD\Delta prfApPrfA$  und  $EGD\Delta prfApPrfA^*$  in MM mit 50mM Glucose und 1 % XAD4



**Abbildung 40** Nachweis der PrfA-, InlC- und ActA-Expression im Western Blot. Der Wildtyp EGD und die PrfA-überexprimierenden Stämme  $EGD\Delta prfApPrfA$  und  $EGD\Delta prfApPrfA^*$  wurden in MM mit Zugabe von 50 mM Glucose und 1 % XAD4 bis zu einer  $OD_{600nm}$  von 0,8 gezogen und anschließend präpariert. 5  $\mu$ g Protein wurden auf einem 12%-igem SDS-Page aufgetragen. Proben von  $EGD\Delta prfA$  dienen als Negativkontrolle.

Stämmen geringer zu sein. Dies ist aber nicht der Fall, da die geringere Bandenstärke, aufgrund der starken Exposition der Wildtyp-Banden, an einer kürzeren Entwicklungszeit liegt. Das Gleiche ist bei der hämolytischen Aktivität zu erkennen. Da der Wildtyp EGD so stark hämolytisch ist, wurden die Mengen für die Versuchsdurchführung so angepasst, dass EGD auch noch messbar ist.



**Abbildung 41** Nachweis der hämolytischen Aktivität Der Wildtyp EGD und die PrfA-überxprimierenden Stämme EGDΔprfAΔprfA und EGDΔprfAΔprfA\* wurden in MM mit Zugabe von 50 mM Glucose und 1 % XAD4 bis zu einer OD<sub>600nm</sub> von 0,8 gezogen. Proben von EGDΔprfA dienten als Negativkontrolle.

## D.2.7 Expression PTS-abhängiger Gene in *L. monocytogenes* EGD nach Wachstum in verschiedenen Kulturmedien

Die Arbeit von S. Mertins (Mertins *et al.*, 2007) hat darauf hingedeutet, dass die PrfA Aktivität mit der Expression von Phosphoenolpyruvat-Phosphotransferasesystemen (PTS) zusammenhängt. PTS sind zuständig für die Aufnahme von Kohlenstoffquellen. Um ein Expressionsmuster der PTS-Gene, sowie *prfA* und den PrfA-abhängigen Genen zu erhalten, wurden cDNA Microarrays mit RNA Proben von EGD gewachsen in BHI, LB und MM (jeweils mit 50 mM Glucose versetzt) bis zu einer OD<sub>600nm</sub> von 0,8 durchgeführt. Die für diese Untersuchung verwendeten Microarrays waren extra für diese Arbeit entwickelte, mit Epoxidharz beschichtete Objektträger, auf welche ein spezifisches Oligonukleotid für *prfA* und die PrfA-kontrollierten Gene und zwei Oligonukleotide für jedes annotierte PTS-Gen gespottet wurden (Glaser *et al.*, 2001).

Der Vergleich der Transkriptome (Tabelle 3 und Anhang Tabelle 13) zeigt eine deutlich höhere Expression von *prfA* und den PrfA-kontrollierten Genen in BHI gewachsenem *L. monocytogenes* EGD als in LB gewachsenem EGD. An den Verhältniswerten ist auch zu erkennen, dass *prfA* und die PrfA-abhängigen Gene in MM im Vergleich zu LB und BHI am stärksten exprimiert werden. Diese Daten korrelieren mit den Befunden der Western Blots und Hämolysetests in D.2.2, D.2.3 und D.2.5.

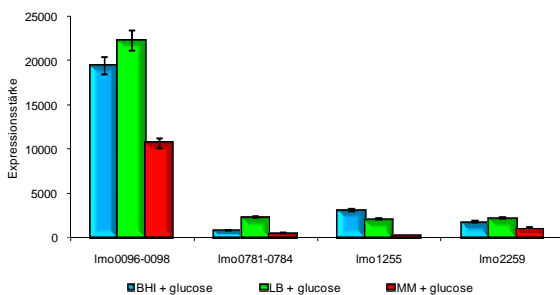
**Tabelle 3 Vergleichende Expressionsanalyse** der Gene codierend für *prfA* und die PrfA-abhängigen Virulenzgene in *L. monocytogenes* EGD nach Wachstum in BHI und LB (BHI/LB), in BHI und MM (BHI/MM) und in MM und LB (MM/LB) bis zu einer OD<sub>600nm</sub> von 0,8. Alle Medien waren mit 50 mM Glucose versetzt.

Genname	BHI-LB	BHI-MM	MM-LB	Annotation nach <a href="http://genolist.pasteur.fr/ListiList">http://genolist.pasteur.fr/ListiList</a>
lmo0200	4.88	0.37	20.71	<i>prfA</i> - listeriolysin positive regulatory protein
lmo0201	25.53	0.39	82.89	<i>plcA</i> - phosphatidylinositol-specific phospholipase c
lmo0202	50.77	0.61	76.12	<i>hly</i> - listeriolysin O precursor
lmo0203	7.89	0.39	22.90	<i>mpl</i> - Zinc metalloproteinase precursor
lmo0204	38.05	0.28	132.22	<i>actA</i> - actin-assembly inducing protein precursor
lmo0205	63.43	0.27	202.75	<i>plcB</i> - phospholipase C
lmo0433	6.41	0.47	39.38	<i>inlA</i> - InternalinA
lmo0434	5.49	0.35	19.75	<i>inlB</i> - InternalinB
lmo0838	4.61	0.34	10.46	<i>uhpT</i> - highly similar to hexose phosphate transport protein
lmo1786	3.40	0.38	8.60	<i>inlC</i> - Internalin C



Bei den Transkripten der PTS-Permeasen-Gene (Tabelle 13) zeigen sich zwischen BHI und LB die deutlichsten Unterschiede bei den Mannose-spezifischen PTS<sup>Man</sup>(Imo0781-0784) und PTS<sup>Man</sup>(Imo2000-2002) und dem Fructose-spezifischen Imo2335. Die Gene dieser PTS-Permeasen sind in LB stärker angeschaltet als in BHI. Der offensichtlichste Unterschied zwischen allen drei Medien ist, dass in MM PTS<sup>Man</sup>(Imo0096-0098), PTS<sup>Man</sup>(Imo0781-0784) und Imo1255 deutlich schwächer exprimiert werden als in BHI und LB.

Abgesehen von den Verhältniswerten ergeben sich aus den Microarraydaten auch Expressionsstärken für die untersuchten Gene (Abbildung 42). Die auf Transkriptionsebene am stärksten exprimierten PTS-Gene sind PTS<sup>Man</sup>(Imo0096-0098) gefolgt von PTS<sup>Man</sup>(Imo0781-0784) und den PTS-Komponenten codiert von Imo2259 und Imo1255. Alle anderen PTS-Permeasen sind in Gegenwart von Glucose nur schwach exprimiert. Das für die RNA Polymerase-Untereinheit B codierende Gen *rpoB* wurde als Kontrolle auf den Microarrays eingesetzt und wurde in allen drei Medien fast gleich stark exprimiert.



**Abbildung 42** Expressionsstärke verschiedener PTS Gene: Relative Transkriptmenge, der hauptsächlich exprimierten PTS-Permeasen in *L. monocytogenes* EGD nach Wachstum in BHI, LB und MM (jeweils versetzt mit 50 mM Glucose) bis zu einer OD<sub>600nm</sub> von 0,8. Die angegebene relative Transkriptmenge repräsentiert die Spotintensität auf dem Microarray normalisiert auf die Intensität von *rpoB*, welches stabil exprimiert wird (Milohanac *et al.*, 2003; Sue *et al.*, 2004).

## D.2.8 Expression PTS-abhängiger Gene in *L. monocytogenes* EGDΔ*prfApPrfA* und EGDΔ*prfApPrfA*\*

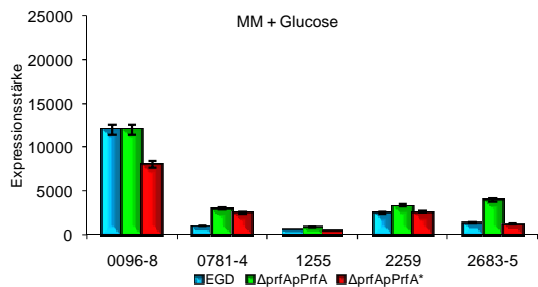
Wie unter D.2.1E.2.1 gezeigt, ist die Wachstumsrate der zwei PrfA(\*) überexprimierenden Stämme *L. monocytogenes* EGDΔ*prfApPrfA* und EGDΔ*prfApPrfA*\* in MM gegenüber dem Wildtyp EGD deutlich verringert. Außerdem konnte schon gezeigt werden, dass die Glucoseaufnahmerate bei diesen zwei Stämmen im Vergleich zum Wildtyp deutlich absinkt (Marr *et al.*, 2006).

Um zu testen, ob die hohe Konzentration an PrfA oder PrfA\* die Expression der PTS-Gene beeinflusst, wurden die PTS-Gene sowie *prfA* und die PrfA-abhängigen Gene von EGDΔ*prfApPrfA* beziehungsweise EGDΔ*prfApPrfA*\* mit denen von EGD verglichen. Dies geschah nach Wachstum in MM mit 50 mM Glucose, Cellobiose oder Glycerin bis zu einer OD<sub>600nm</sub> von 0,8. Die Transkriptomdaten in Tabelle 14 zeigen, dass die Expression der meisten PTS-Gene von EGDΔ*prfApPrfA* in MM mit 50 mM Glucose oder Cellobiose im Vergleich zum Wildtyp unverändert ist. In Anwesenheit hoher zellulärer Konzentrationen an PrfA\* ist die Expression dieser Gene im Allgemeinen leicht verringert. Mit Glycerin als einziger Kohlenstoffquelle sind mehr stark differentiell regulierte PTS-Gene zu finden als in Cellobiose oder Glucose.

Der auffälligste Unterschied zwischen EGDΔ*prfApPrfA* bzw. EGDΔ*prfApPrfA*\* und dem Wildtyp EGD ist die Hochregulation (Faktor zwei bis drei) von PTS<sup>Man</sup>(Imo0781-0784) in beiden Stämmen und mit allen drei Kohlenstoffquellen. Dies kann man auch deutlich in der Expressionsstärke in Abbildung 43 erkennen. In Glucose ist eine vierfache Hochregulation von PTS<sup>Lac</sup>(Imo2683-2685) in EGDΔ*prfApPrfA* verglichen mit dem Wildtyp EGD zu

erkennen. Die Gene für PTS<sup>Man</sup>(lmo0096-0098) sind in allen drei Stämmen in Glucose am stärksten exprimiert, aber ihre Expression ist in EGD $\Delta$ prfApPrfA (und besonders in EGD $\Delta$ prfApPrfA\*) verglichen mit EGD leicht herunterreguliert (Ratio von 0,6 bis 0,8).

In Abbildung 43 ist zu erkennen, dass nach Wachstum in MM mit 50 mM Cellobiose als einziger Kohlenstoffquelle die Gene für PTS<sup>Lac</sup>(lmo2683-2685) die am stärksten exprimierten PTS-Gene sind. Die Anwesenheit großer Mengen an PrfA oder PrfA\* führt hier ebenfalls zu einer leicht verringerten Genexpression. In MM mit Glycerin als einziger Kohlenstoffquelle sind vor allem PTS<sup>Lac</sup>(lmo2683-2685), PTS<sup>Man</sup>(lmo0781-0784) und Lmo2259 angeschaltet. Wobei in Glycerin generell viel mehr PTS-Gene exprimiert werden als in den anderen Zuckern, da die Katabolitrepression (CCR) in Glycerin nicht aktiv ist und so die unter CCR-Kontrolle stehenden Gene exprimiert werden.



**Abbildung 43** Expressionsstärke verschiedener PTS-Gene: Relative Transkriptmenge, der hauptsächlich exprimierten PTS-Permeasen in *L. monocytogenes* EGD, EGD $\Delta$ prfApPrfA und EGD $\Delta$ prfApPrfA\* nach Wachstum in MM mit 50 mM Glucose, Cellobiose oder Glycerin bis zu einer OD<sub>600nm</sub> von 0,8. Die angegebene relative Transkriptmenge repräsentiert die Spotintensität auf dem Microarray normalisiert zu der Intensität von *rpoB*, welches stabil exprimiert wird (Milohanic *et al.*, 2003; Sue *et al.*, 2004).

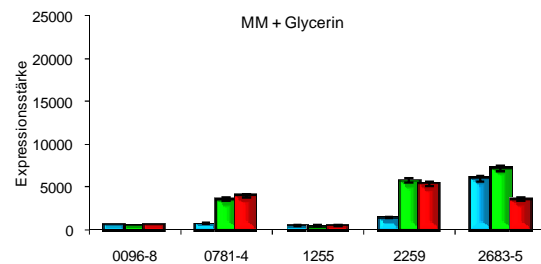
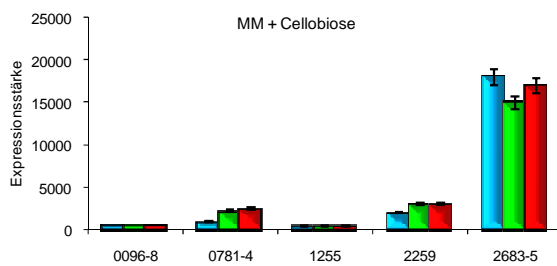
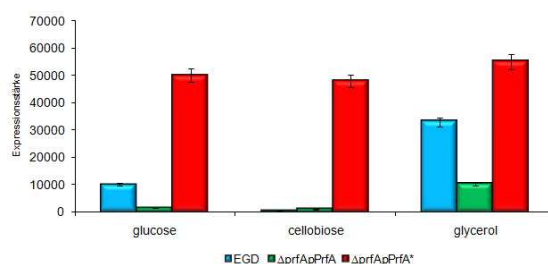


Abbildung 44 und Tabelle 4 zeigen wie erwartet, dass alle PrfA-abhängigen Gene im Stamm EGD $\Delta$ prfApPrfA\* unabhängig von der verwendeten Kohlenstoffquelle im Vergleich zum Wildtyp in der Transkription erhöht sind. Die hohe zelluläre Konzentration an PrfA-Protein vom Stamm EGD $\Delta$ prfApPrfA steht dagegen im Zusammenhang mit einer geringeren Expression der PrfA-abhängigen Gene verglichen mit dem Wildtyp EGD.

EGD zeigt die höchste Expression von *prfA* und den PrfA-abhängigen Virulenzgenen in Glucose- und Glycerin-haltigem MM. Interessanterweise ist EGD $\Delta$ prfApPrfA\* in Glucose und Glycerin wesentlich aktiver als der Wildtyp, obwohl viel weniger *prfA* gebildet wird. Cellobiose als Kohlenstoffquelle hemmt im Wildtyp die PrfA Aktivität fast komplett. An der Skala in Abbildung 44 kann man erkennen, dass *prfA* und die PrfA-abhängigen Virulenzgene auf einem viel höheren Level exprimiert werden als die PTS-Gene (Abbildung 43).



**Abbildung 44** Expressionsstärke der PrfA-abhängigen Gene am Beispiel *actA*. Relative Transkriptmenge in *L. monocytogenes* EGD, EGD $\Delta$ prfApPrfA und EGD $\Delta$ prfApPrfA\* nach Wachstum in MM mit 50 mM Glucose, Cellobiose oder Glycerin bis zu einer OD<sub>600nm</sub> von 0,8. Die angegebene relative Transkriptmenge repräsentiert die Spotintensität auf dem Microarray normalisiert zu der Intensität von *rpoB*, welches stabil exprimiert wird (Milohanic *et al.*, 2003; Sue *et al.*, 2004).

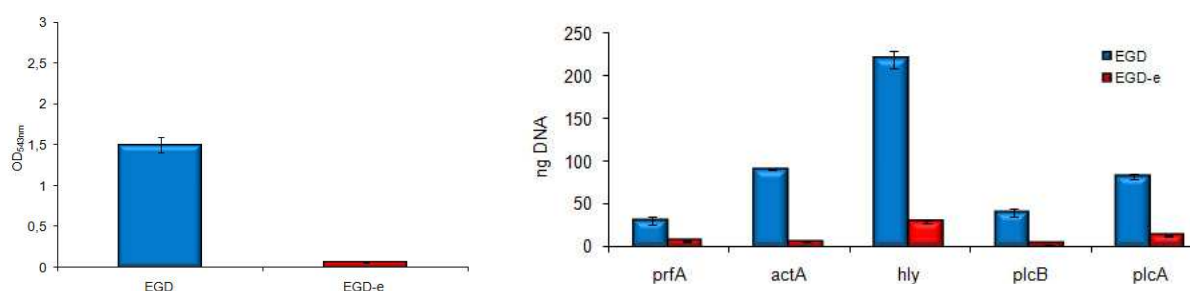
**Tabelle 4** Vergleichende Expressionsanalyse der Gene codierend für *prfA* und die PrfA-abhängigen Virulenzgene in *L. monocytogenes* EGD $\Delta$ *prfA*PrfA (PrfA) und EGD $\Delta$ *prfA*PrfA\* (PrfA\*) verglichen mit EGD nach Wachstum in MM mit 50 mM Glucose (G), Cellobiose (C) oder Glycerin (Y) bis zu einer OD<sub>600nm</sub> von 0,8. Die Funktion der Gene ist in Tabelle 3 beschrieben.

Genname	PrfA/EGD G	PrfA*/EGD G	PrfA/EGD C	PrfA*/EGD C	PrfA/EGD Y	PrfA*/EGD Y
<b>lmo0200</b>	0.65	0.62	15.72	17.84	0.87	0.49
<b>lmo0201</b>	0.15	0.11	2.42	3.46	0.20	0.07
<b>lmo0202</b>	0.23	2.02	2.14	27.67	0.68	1.29
<b>lmo0203</b>	0.34	6.48	1.87	55.95	0.72	3.24
<b>lmo0204</b>	0.11	4.82	1.15	83.96	0.40	1.64
<b>lmo0205</b>	0.11	3.08	0.96	47.37	0.38	1.43
<b>lmo0433</b>	0.19	2.86	0.55	5.28	0.42	2.21
<b>lmo0434</b>	0.14	1.65	0.46	3.94	0.28	2.27
<b>lmo0838</b>	0.13	8.58	2.00	6.73	0.33	9.27
<b>lmo1786</b>	0.17	7.79	0.58	14.07	0.34	9.17

### D.2.9 Die PrfA-Aktivität in *L. monocytogenes* EGD ist signifikant höher als in *L. monocytogenes* EGD-e

Für die bisherigen Ergebnisse wurde der original Laborstamm *L. monocytogenes* EGD verwendet. Sequenziert (Glaser *et al.*, 2001) und auch für zukünftige Versuche verwendet wurde aber *L. monocytogenes* EGD-e. Die Sequenz von *prfA* wurde in beiden Stämmen nachgeprüft und ist identisch (Daten nicht gezeigt). Trotzdem ist die von S. Mertins (Mertins *et al.*, 2007) veröffentlichte Expression von *prfA* und den PrfA-abhängigen Genen in EGD-e geringer als die in dieser Arbeit für EGD festgestellte *prfA*-Expression. Zu einer ähnlichen Beobachtung kamen auch schon Brehm und Mitarbeiter (Brehm *et al.*, 1999).

Die Daten wurden mittels Transkriptomanalysen von Gesamtgenom-Microarrays und Real-Time RT-PCR beider Stämme nach Wachstum in MM mit 50 mM Glucose bis zu einer OD<sub>600nm</sub> von 0,8 erstellt. Im Anhang in Tabelle 15 bis Tabelle 17 sind die Transkriptomdaten für die PTS-Gene, *prfA* und die PrfA-abhängigen Virulenzgene, sowie die hoch- bzw. herunterregulierten Gene in beiden Stämmen aufgeführt.



**Abbildung 45** Hämolyse und Real-Time-PCR Daten von *L. monocytogenes* EGD und EGD-e nach Wachstum in MM mit 50 mM Glucose bis zu einer OD<sub>600nm</sub> von 0,8. Für den Test der hämolytischen Aktivität wurden 50  $\mu$ l Kulturüberstand verwendet. Die Real-Time-PCR Daten entsprechen der relativen Transkriptmenge auf cDNA-Ebene von *prfA* und den PrfA-abhängigen Genen *actA*, *hly*, *plcB* und *plcA*.

Die Menge an *prfA* und den PrfA-abhängigen Genprodukten ist in EGD im Vergleich zu EGD-e um das 5-10 fache erhöht (Tabelle 5). Dies ist auch in den Daten der Real-Time-PCR und des Hämolysetests (Abbildung 45) zu erkennen.

**Tabelle 5** Vergleichende Transkriptomanalyse der Gene codierend für *prfA*, die PrfA-abhängigen Virulenzgene und einiger PTS-Komponenten in *L. monocytogenes* EGD und EGD-e nach Wachstum in MM mit 50 mM Glucose bis zu einer OD<sub>600nm</sub> von 0,8.

Genname	EGD-EGDe	Annotation nach <a href="http://genolist.pasteur.fr/ListiList/">http://genolist.pasteur.fr/ListiList/</a>
<b>lmo0200</b>	4.13	<i>prfA</i> - listeriolysin positive regulatory protein
<b>lmo0201</b>	5.20	<i>plcA</i> - phosphatidylinositol-specific phospholipase c
<b>lmo0202</b>	5.63	<i>hly</i> - listeriolysin O precursor
<b>lmo0203</b>	5.93	<i>mpl</i> - Zinc metalloproteinase precursor
<b>lmo0204</b>	4.82	<i>actA</i> - actin-assembly inducing protein precursor
<b>lmo0205</b>	10.38	<i>plcB</i> - phospholipase C
<b>lmo0433</b>	2.73	<i>inlA</i> - InternalinA
<b>lmo0434</b>	2.34	<i>inlB</i> - InternalinB
<b>lmo0838</b>	2.05	<i>uhpT</i> - highly similar to hexose phosphate transport protein
<b>lmo1786</b>	1.54	<i>inlC</i> - Internalin C
<b>lmo0781</b>	0.51	similar to mannose-specific phosphotransferase system (PTS) component IID
<b>lmo0782</b>	0.27	similar to mannose-specific phosphotransferase system (PTS) component IIC
<b>lmo0783</b>	0.10	similar to mannose-specific phosphotransferase system (PTS) component IIB
<b>lmo0784</b>	0.17	similar to mannose-specific phosphotransferase system (PTS) component IIA
<b>lmo2683</b>	0.17	similar to cellobiose phosphotransferase enzyme IIB component
<b>lmo2684</b>	0.67	similar to cellobiose phosphotransferase enzyme IIC component
<b>lmo2685</b>	n.a.	similar to cellobiose phosphotransferase enzyme IIA component

Bei den PTS-Permeasen sind die größten Unterschiede in einer geringeren Expression von PTS<sup>Man</sup>(lmo0781-0784) und PTS<sup>Lac</sup>(lmo2683-2685) in EGD verglichen mit EGD-e zu finden. Zudem findet sich noch eine große Zahl an anderen Genen, die in EGD verglichen mit EGD-e runterreguliert sind. Darunter einige Gene für verschiedene ABC-Transporter und für die Stressantwort.

### D.3 Listerielle Phosphotransferasesysteme

Das Phosphotransferasesystem (PTS) wurde in *E. coli* als System entdeckt, welches Phosphoenolpyruvat (PEP) nutzt um Hexosen wie Glucose und Mannose in die bakterielle Zelle zu transportieren (Kundig *et al.*, 1964). Das PTS spielt neben der Zuckeraufnahme eine Rolle in vielen Aspekten der bakteriellen Physiologie (Barabote and Saier, 2005). Listerien codieren für alle sieben bekannten PTS-Familien, 86 Gene codieren für 29 komplette und einige unvollständige PTS-Permeasen (Tabelle 18). *L. monocytogenes* EGD-e weist mit 3,2% unter allen bislang sequenzierten Bakterien den höchsten Prozentsatz an genetischem Material in PTS auf. Zusätzlich zu den Zucker-PTS besitzt *L. monocytogenes* auch noch ein für Dihydroxyaceton (DHA) spezifisches PTS (Barabote and Saier, 2005; Glaser *et al.*, 2001). Trotz der großen Anzahl an PTS-Genen besitzt *L. monocytogenes* kein vollständiges PtsG, welches homolog zu *E. coli* ist. Lediglich ein dem EIIA<sup>Glc</sup> (codiert von *crr*) homologes Protein konnte in *L. monocytogenes* gefunden werden, codiert von Imo1017. Zur Identifizierung der in die Glucoseaufnahme involvierten PTS und um einen möglichen Zusammenhang mit der Regulation der PrfA-Aktivität zu untersuchen wurden die folgenden PTS-Permeasen anhand von Deletionsmutanten näher untersucht: In Tabelle 6 sind die in dieser Arbeit näher betrachteten von *L. monocytogenes* EGD-e codierten Glucose- und Beta-Glucosid-spezifischen PTS, Mannose-spezifischen PTS und Cellobiose-spezifischen PTS aufgeführt.

**Tabelle 6** Glucose- und Beta-Glucosid-spezifische (PTS<sup>Glc</sup>), Mannose-spezifische (PTS<sup>Man</sup>) und Cellobiose-spezifische PTS (PTS<sup>Lac</sup>) codiert von *L. monocytogenes* EGD-e, die in dieser Arbeit betrachtet wurden.

PTS	Annotation nach <a href="http://genolist.pasteur.fr/ListiList/">http://genolist.pasteur.fr/ListiList/</a>
<b>PTS<sup>Glc</sup></b>	
<b>Imo0027</b>	similar to PTS system, beta-glucosides specific enzyme IIABC
<b>Imo0738</b>	similar to phosphotransferase system (PTS) beta-glucoside-specific enzyme IIABC component
<b>Imo1017</b>	similar to phosphotransferase system glucose-specific enzyme IIA
<b>Imo1035</b>	similar to phosphotransferase system (PTS) beta-glucoside-specific enzyme IIABC
<b>Imo1255</b>	similar to PTS system trehalose specific enzyme IIBC
<b>Imo2772</b>	similar to beta-glucoside-specific enzyme IIABC
<b>Imo2787</b>	beta-glucoside-specific phosphotransferase enzyme II ABC component
<b>PTS<sup>Man</sup></b>	
<b>Imo0021-0024</b>	similar to PTS system, fructose-specific IIA, B, C and D component
<b>Imo0096-0098</b>	similar to PTS system mannose-specific, factor IIAB, C and D
<b>Imo0781-0784</b>	similar to mannose-specific phosphotransferase system (PTS) component IID, C, B and A
<b>Imo1997</b>	similar to PTS mannose-specific enzyme IIA component
<b>Imo2000-2002</b>	similar to PTS mannose-specific enzyme IID, C and B component
<b>PTS<sup>Lac</sup></b>	
<b>Imo1719/1720</b>	similar to phosphotransferase system (PTS) lichenan-specific enzyme IIA and B component
<b>Imo2259</b>	similar to phosphotransferase system (PTS) beta-glucoside-specific enzyme IIA
<b>Imo2683-2685</b>	similar to cellobiose phosphotransferase enzyme IIB, C and A component
<b>Imo2708</b>	similar to PTS system, cellobiose-specific enzyme IIC

### D.3.1 PTS-Aktivität in EGD-e nach Wachstum in verschiedenen Kohlenstoffquellen

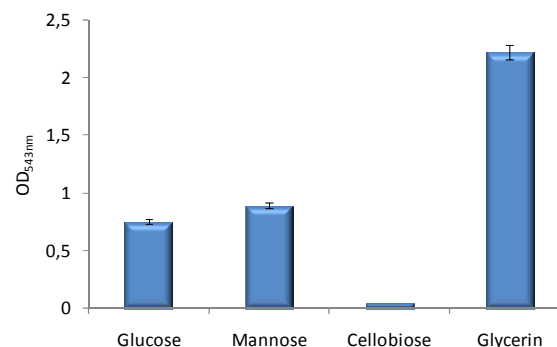
In D.2.7 wurde zunächst nur das Expressionsmuster von EGD nach Wachstum in BHI, LB und MM mit jeweils 50 mM Glucose untersucht. Diese Daten geben das PTS-Expressionsmuster von EGD, jedoch nicht von EGD-e in den verschiedenen Medien wieder und keine Hinweise darauf, welche PTS von welchen Zuckern angesprochen werden.

Um die Expression der verschiedenen PTS in Glucose, Mannose, Cellobiose und Glycerin aufzuzeigen, wurde der Wildtyp EGD-e in MM versetzt mit je 50 mM der angegebenen Kohlenstoffquellen bis zu einer  $OD_{600nm}$  von 0,8 kultiviert und Proben für Hämolysetest und RNA-Isolierung abgenommen. Von der RNA wurde cDNA hergestellt und Real Time Analysen mit Genen für putative PTS-Permeasen für Glucose, Mannose und Cellobiose durchgeführt (nach Suche in <http://genolist.pasteur.fr/ListiList/> und Blast-Analysen mit den Angaben von Barabote und Saier (2005)). Gene die in Glycerin verstärkt exprimiert werden gelten als katabolitreprimiert und werden bei Aufnahme von Glucose oder Cellobiose nicht oder nur wenig angeschaltet.

#### D.3.1.1 Hämolytische Aktivität von EGD-e

Die hämolytische Aktivität von EGD-e ist nach Wachstum in Glucose- und Mannosehaltigem Minimalmedium fast gleich hoch. 50 mM Cellobiose im Medium verringern die PrfA-Aktivität, die daraus resultierende Menge an LLO und die Hämolyse auf ein Minimum und Glycerin als einzige Kohlenstoffquelle verstärkt die PrfA abhängige Expression von LLO.

Vergleicht man EGD aus Abbildung 45 mit der LLO-Expression von EGD-e in Abbildung 46 so scheint die Expression fast gleich stark. Dies ist jedoch ein Artefakt der Probenisolierung an verschiedenen Tagen und der Durchführung des Hämolysetests mit unterschiedlichem Blut. Abbildung 45 gibt den tatsächlichen Unterschied zwischen den zwei Stämmen wieder, da für den Versuch beide Stämme am gleichen Tag isoliert und im Hämolysetest mit derselben Blutsuspension untersucht wurden.

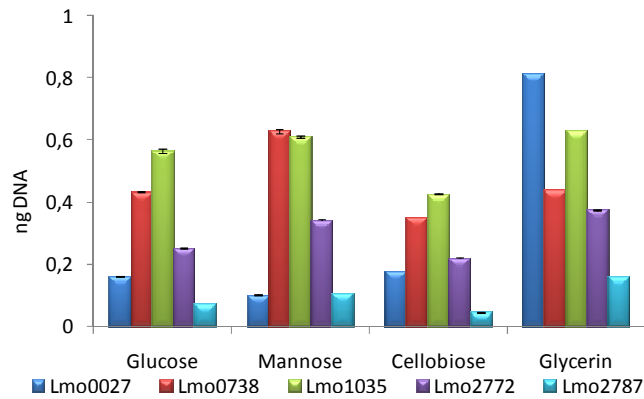


**Abbildung 46** Hämolytische Aktivität von EGD-e nach Wachstum in MM + 50 mM Glucose, Mannose, Cellobiose und Glycerin bis  $OD_{600nm} = 0,8$

#### D.3.1.2 Expression der Beta-Glucosid-spezifischen PTS in EGD-e

Transkriptomdaten von EGD (siehe Anhang) haben gezeigt, dass die  $PTS^{Glc}$  so schwach exprimiert werden, dass die Spots von lmo2772 und lmo2787 unter der Nachweisgrenze liegen. Die Spots der anderen drei  $PTS^{Glc}$  konnten zwar nachgewiesen werden, aber waren nur sehr schwach (Daten nicht gezeigt).

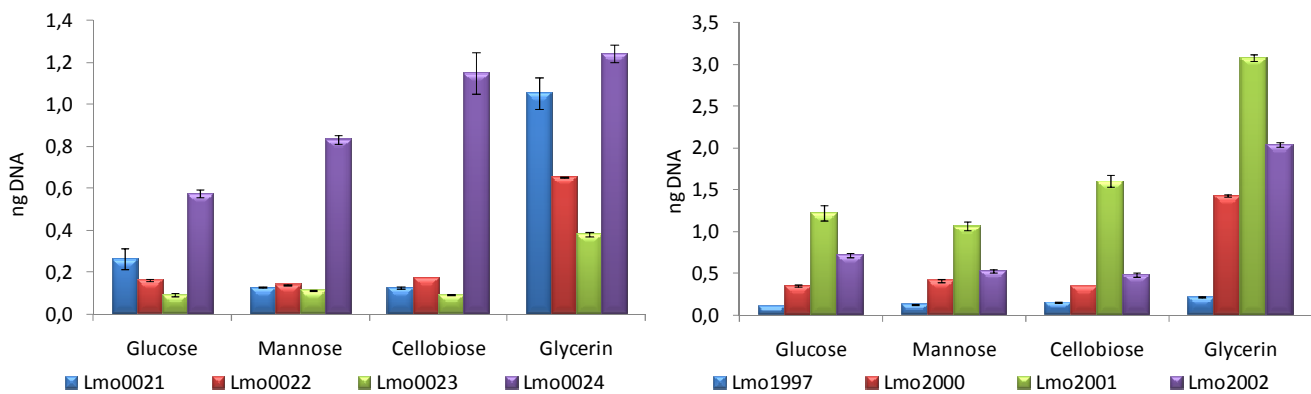
Abbildung 47 zeigt die Transkriptmenge der fünf Beta-Glucosid-PTS in EGD-e nach Wachstum in MM mit verschiedenen Kohlenstoffquellen. Die Daten geben mit maximal 0,8 ng gebildeter cDNA ein sehr schwaches Expressionsmuster aller fünf Gene wieder. Die Art der Kohlenstoffquelle scheint auf die Transkriptmenge keinerlei Auswirkung zu haben. Lediglich lmo0027 wird in Glycerin verstärkt exprimiert, was darauf hin deutet, dass lmo0027 unter Katabolitrepresion steht.



**Abbildung 47** Expressionsstärke der Gene codierend für PTS<sup>Glc</sup>. Angegeben ist die gebildete Transkriptmenge in ng cDNA von *L. monocytogenes* EGD-e nach Wachstum in MM mit 50 mM Glucose, Mannose, Cellobiose oder Glycerin bis zu einer OD<sub>600nm</sub> von 0,8.

### D.3.1.3 Expression der Mannose-spezifischen PTS in EGD-e

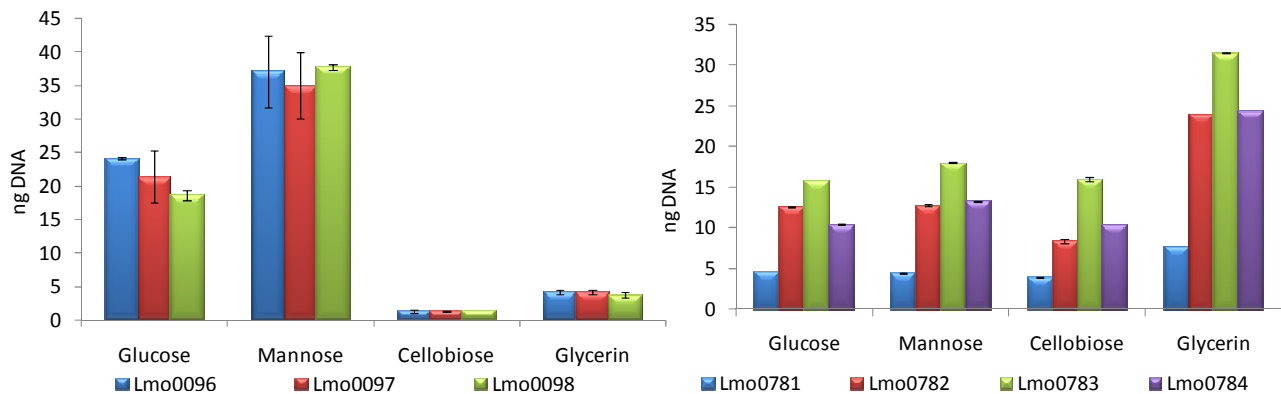
Suche in <http://genolist.pasteur.fr/ListiList/> und Blast-Analysen mit den Angaben von Barabote und Saier (2005) ergaben, dass *L. monocytogenes* Gene für vier putative PTS<sup>Man</sup>-Permeasen besitzt. Die vier EII Untereinheiten der PTS<sup>Man</sup>-Permeasen werden von lmo0021-



**Abbildung 48** Expressionsstärke der Gene codierend für zwei putative PTS<sup>Man</sup>. Angegeben ist die gebildete Transkriptmenge in ng cDNA in *L. monocytogenes* EGD-e nach Wachstum in MM mit 50 mM Glucose, Mannose, Cellobiose oder Glycerin bis zu einer OD<sub>600nm</sub> von 0,8.

0024, lmo0096-0098, lmo0781-0784 und von lmo1997/lmo2000-2002 codiert, wobei lmo0096 für ein zusammenhängendes EIIAB codiert.

Die Daten der Real Time Analysen zeigen, dass die Gene lmo0021-0024 und lmo1997/lmo2000-2002 ähnlich den PTS<sup>Glc</sup> nur sehr schwach exprimiert werden und im Wildtyp nicht auf Mannose oder Glucose als Kohlenstoffquelle ansprechen (Abbildung 48). Die Gene dieser zwei PTS<sup>Man</sup> scheinen jedoch unter Katabolitrepresion zu stehen, da sie in Glycerin eine verstärkte Transkriptmenge aufweisen.

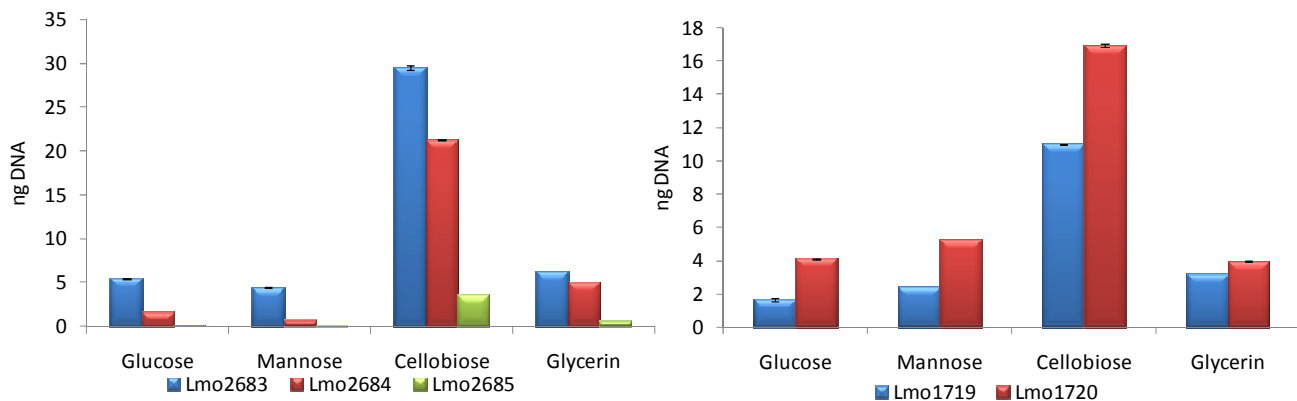


**Abbildung 49** Expressionsstärke der Gene codierend für zwei putative PTS<sup>Man</sup>. Angegeben ist die gebildete Transkriptmenge in ng cDNA in *L. monocytogenes* EGD-e nach Wachstum in MM mit 50 mM Glucose, Mannose, Cellobiose oder Glycerin bis zu einer OD<sub>600nm</sub> von 0,8.

Abbildung 49 zeigt die Real Time Daten der zwei im Wildtyp EGD-e stark exprimierten putativen PTS<sup>Man</sup>. Beide werden 10- bis 20-mal stärker transkribiert als die in Abbildung 48 gezeigten PTS<sup>Man</sup>. Das PTS<sup>Man</sup>(lmo0781-0784) ist konstitutiv in allen drei PTS-Zuckern angeschaltet, wird jedoch in Glycerin noch stärker exprimiert und steht somit offenbar unter Katabolitrepression. Die Gene lmo0096-0098 codieren wiederum ganz offensichtlich für die wichtigste Mannose-spezifische PTS-Permease zur Mannose- und Glucoseaufnahme, da die Gene in Glycerin- und Cellobiose-haltigem MM nur sehr schwach transkribiert werden, aber in Glucose und vor allem Mannose stark angeschaltet werden.

#### D.3.1.4 Expression einiger Cellobiose-spezifischer PTS in EGD-e

In den Transkriptomdaten von EGD und den PrfA-überexprimierenden Stämmen (D.2) sind einige nach <http://genolist.pasteur.fr/ListiList/> Cellobiose-spezifische PTS als stark exprimiert



**Abbildung 50** Expressionsstärke der Gene codierend für zwei putative PTS<sup>Lac</sup>. Angegeben ist die gebildete Transkriptmenge in ng cDNA in *L. monocytogenes* EGD-e nach Wachstum in MM mit 50 mM Glucose, Mannose, Cellobiose oder Glycerin bis zu einer OD<sub>600nm</sub> von 0,8.

aufgefallen. Das von lmo2683-2685 codierte putative PTS<sup>Lac</sup> wird vor allem in Cellobiose-haltigem MM sehr stark exprimiert (Abbildung 50), ähnlich PTS<sup>Man</sup>(lmo0096-0098) in Glucose- und Mannose-haltigem MM. Die vergleichsweise geringe Expression von lmo2685 ist vermutlich auf den Abbau der mRNA zurück zu führen, denn lmo2683-2685 wird polycistronisch exprimiert, lmo2685 liegt am 5'-Ende und wird somit als erstes abgebaut. Die Transkriptmenge von lmo1719/1720 liegt in Cellobiose-haltigem MM etwas niedriger als die von lmo2683-2685, ist aber im Vergleich zu den Kohlenstoffquellen Glucose, Mannose und



Glycerin vier bis fünf mal stärker exprimiert. Cellobiose als Kohlenstoffquelle initiiert also die Transkription von lmo1719/1720 und lmo2683-2685.

### D.3.2 Beta-Glucosid spezifische Phosphotransferasesysteme

Die bisherigen Daten legen die Vermutung nahe, dass die Art und/oder der Aufnahmeweg der Kohlenstoffquelle eine starke Auswirkung auf die PrfA-Aktivität haben. Schon Brehm *et al.* fanden 1999 heraus, dass Insertionen in die Gene des *bvr*-Locus eine Auswirkung auf die Expression der Virulenzgene haben. Bisher sind jedoch keine weitergehenden Studien über die sechs von Barabote und Saier 2005 identifizierten Glucose und Beta-Glucosid spezifischen PTS erfolgt. Blast Suche mittels der bekannten Genomsequenz von *L. monocytogenes* (Glaser *et al.*, 2001) und den von Barabote und Saier verwendeten Untersuchungskriterien (<http://www.tcdb.org/>) ergab folgende Daten:

*L. monocytogenes* codiert im Gegensatz zu *E. coli* oder *B. subtilis* und den meisten anderen Bakterien für kein vollständiges PtsG (Gonzy-Treboul *et al.*, 1991; Mertins *et al.*, 2007; Postma *et al.*, 1989), jedoch für ein EIIA<sup>Glc</sup>, codiert von lmo1017. Weiterhin konnte das für ein EIIBC codierende lmo1255 nach den Kriterien von Barabote und Saier (2005) als hoch homolog zu Glucose-spezifischen PTS gelistet werden. Für vollständige PTS<sup>Glc</sup> codieren die Gene lmo0027, lmo0738, lmo1035, lmo2772 und lmo2787 (*bvrB*), wobei im apathogenen Stamm *L. innocua* nur für PTS<sup>Glc</sup> (lin0026) codiert wird, welches homolog zu lmo0027 ist. Die EIIA<sup>Glc</sup> von allen fünf PTS sind hoch homolog zu lmo1017, welches wiederum homolog zur EIIA Komponente des PtsG von *E. coli* ist. Zudem ist lmo1017 zu 47 % mit PtsG aus *B. subtilis* identisch (<http://genolist.pasteur.fr/SubtiList>). Abbildung 51 zeigt ein ClustalW Alignment mit Blosum 62 als Matrix und Tabelle 7 gibt die Ähnlichkeit und den Prozentsatz an identischen Aminosäuren zwischen PtsG aus *E. coli* und den EIIA Proteinen der Beta-Glucosid-spezifischen PTS von *L. monocytogenes* wieder.



**Abbildung 51** ClustalW Analyse von PtsG aus *E. coli* mit den EIIA-Proteinen PTS<sup>Glc</sup> von *L. monocytogenes*. Schwarz markierte Aminosäuren sind identisch, grau markierte sind funktionell ähnliche Aminosäuren.

EIIA von	Identität	Ähnlichkeit
<b>lmo1017</b>	38,4%	57%
<b>lmo0027</b>	29,4%	49,7%
<b>lmo0738</b>	32,2%	53,1%
<b>lmo1035</b>	30,6%	52,6%
<b>lmo2772</b>	33,1%	53,1%
<b>lmo2787</b>	31,1%	48,6%

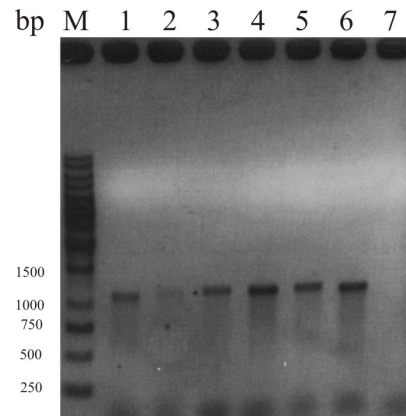
**Tabelle 7** Prozentsatz der Identität und Ähnlichkeit von PtsG aus *E. coli* mit den EIIA-Proteinen der PTS<sup>Glc</sup> von *L. monocytogenes*.

Da die vielen regulatorischen Funktionen von PtsG aus *E. coli* bekannt sind, wurden die genannten PTS-Gene in *L. monocytogenes* untersucht. Dabei war besonders der Einfluss der Deletionen dieser Gene auf die Glucoseaufnahme, sowie die Aufnahme anderer Zucker und ein möglicher Zusammenhang mit der Regulation der PrfA-Aktivität von Interesse.

### D.3.2.1 Herstellung von *L. monocytogenes* Deletionsmutanten

Mittels homologer Rekombination (siehe C.8.12) wurden in-frame Deletionsmutanten der für die putativen PTS<sup>Glc</sup>-Permeasen codierenden Gene lmo0027, lmo0738, lmo1035, lmo2772 und lmo2787 hergestellt. Diese Methode wurde auch für das geblastete mögliche Glucose-PTS EIIBC lmo1255 angewandt. Die Deletion von lmo1017 wurde von Sonja Mertins in ihrer Promotionsarbeit durchgeführt. Durch die Auswahl der Oligonukleotide im Bereich der angrenzenden Gene (z.B. lmo0027-1 und lmo0027-2 siehe C.5.4) wurde der codierende Bereich auf 10-20 Aminosäuren reduziert und exprimiert so keine funktionstüchtige PTS-Permease mehr. Die Deletionsmutanten werden im Folgenden als d0027, d0738, d1035, d2772, d2787, d1255 und d1017 beschrieben.

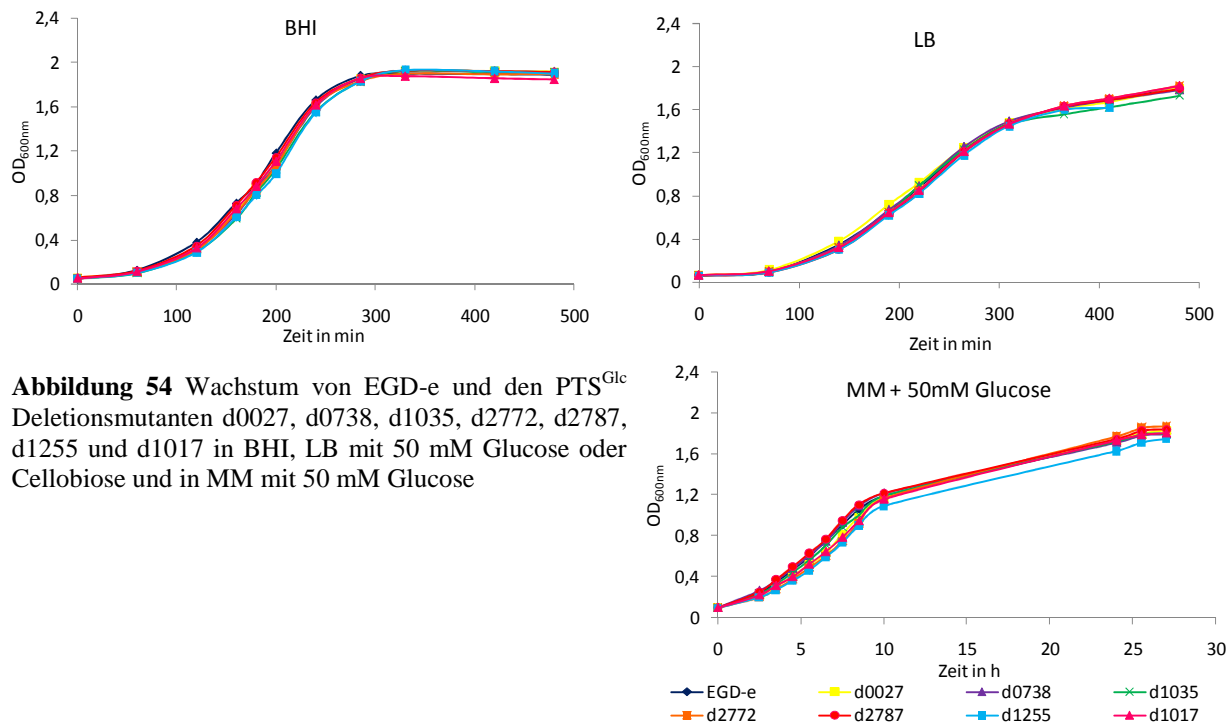
Die Deletionsmutanten wurden mittels PCR (Abbildung 52) und Sequenzierung auf das Fehlen des Gens getestet. Die Oligonucleotide für die PCR wurden so gewählt, dass nach Deletion des Gens ein PCR-Produkt von gut 1000 bp produziert wird.



**Abbildung 52** PCR-Produkte der Deletionsmutanten mit den unter C.5.4 angegebenen Primern für 1) d1255, 2) d0027, 3) d0738, 4) d1035, 5) d2772, 6) d2787 und 7) Nachweis, dass das plsv-Plasmid nicht mehr in *L. monocytogenes* ist.

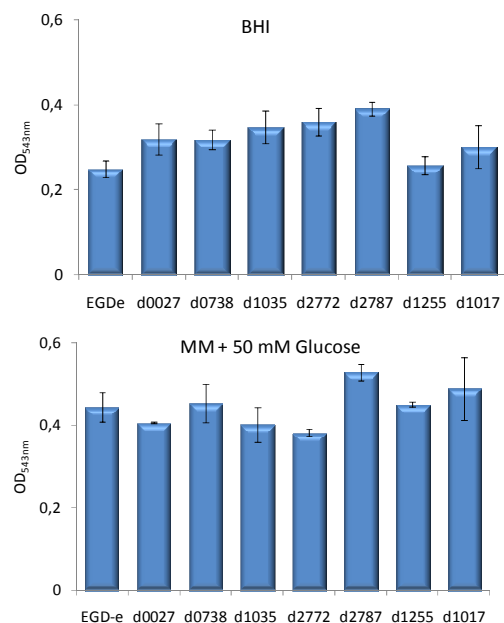
### D.3.2.2 Wachstum und PrfA-Aktivität der PTS<sup>Glc</sup>-Deletionsmutanten in verschiedenen Kulturmedien

Als Kulturmedien für die Versuche wurden BHI (brain-heart infusion), Luria-Bertani (LB) und ein definiertes Minimalmedium (MM, (Premaratne *et al.*, 1991)) ausgewählt. Abbildung 54 zeigt die Wachstumskurven vom Wildtyp EGD-e und den PTS<sup>Glc</sup>-Deletionsmutanten d0027, d0738, d1035, d2772, d2787, d1255 und d1017 in BHI, LB mit Zugabe von 50 mM Glucose oder Cellobiose und in MM mit 50 mM Glucose. In BHI zeigt EGD-e ein Wachstum mit einer Generationszeit von etwa 40 min. Die Einzeldelation der verschiedenen Gene für PTS<sup>Glc</sup>-Permeasen aus dem Wildtyp hat keine Auswirkung auf das Wachstum, und so replizieren die Deletionsmutanten in BHI mit derselben Generationszeit wie EGD-e. Das Wachstum in LB mit 50 mM Glucose oder Cellobiose (die Abbildung ist repräsentativ für beide Zucker) zeigt prinzipiell ein ähnliches Bild wie in BHI. Der Wildtyp reproduziert in LB mit 50 mM Zucker mit einer Generationszeit von 50 min etwas langsamer als in BHI und erreicht die stationäre Phase zu einem späteren Zeitpunkt als in BHI. Die Deletionsmutanten zeigen keinen Unterschied im Wachstum zum Wildtyp. In MM mit 50 mM Glucose wächst EGD-e wie schon in D.2.1 mit EGD gezeigt am langsamsten und benötigt etwa 140 min für einen Replikationszyklus. Von den Deletionsmutanten scheint nur d1255 etwas langsamer als der Wildtyp zu wachsen, was aber im Rahmen der starken Schwankungen des Wachstums in MM nicht signifikant ist.



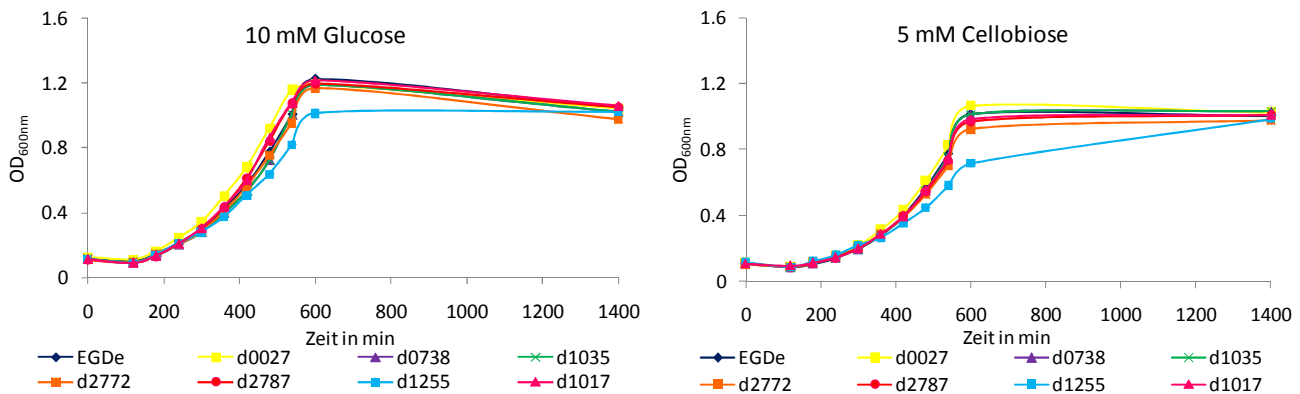
**Abbildung 54** Wachstum von EGD-e und den PTS<sup>Glc</sup> Deletionsmutanten d0027, d0738, d1035, d2772, d2787, d1255 und d1017 in BHI, LB mit 50 mM Glucose oder Cellobiose und in MM mit 50 mM Glucose

Frühere Daten von uns und anderen Arbeitsgruppen (Brehm *et al.*, 1999; Eisenreich *et al.*, 2006; Mertins *et al.*, 2007) deuteten immer wieder darauf hin, dass die Art und die Aufnahme der Kohlenstoffquelle eine Auswirkung auf die PrfA-Aktivität haben könnten. Daher wurden mit den Deletionsmutanten nach Wachstum in BHI und MM versetzt mit 50 mM Glucose bis OD<sub>600nm</sub> von 1,0 Tests der hämolytischen Aktivität durchgeführt. Die hämolytische Aktivität in LB ist nicht detektierbar, da LB wie in D.2.3 gezeigt die PrfA-Aktivität stark reprimiert. Abbildung 53 zeigt die gemessenen Werte der hämolytischen Aktivität. In BHI zeigen die PTS<sup>Glc</sup>-Deletionsmutanten eine leichte Erhöhung in der hämolytischen Aktivität gegenüber EGD-e, wobei die von d2787 am stärksten ist. Die Erhöhung von d1017 und d2787 wurden schon vorher beschrieben (Brehm *et al.*, 1999; Mertins, 2008). Dennoch sind diese Erhöhungen der PrfA-Aktivität so gering, dass nicht eindeutig zu klären ist, ob die Ursache die Deletion der PTS-Gene ist, oder natürliche Schwankungen im Hämolysetest. d1255 ist der einzige Stamm, der keine Erhöhung der PrfA-Aktivität aufweist. Bei den Proben aus MM mit 50 mM Glucose zeigen nur d2787 und d1017 eine leichte Erhöhung der hämolytischen Aktivität gegenüber EGD-e. Alle anderen Stämme zeigen eine dem Wildtyp ähnliche oder sogar leicht verringerte Hämolyse.



**Abbildung 53** Hämolytische Aktivität von EGD-e, d0027, d0738, d1035, d2772, d2787, d1255 und d1017 nach Wachstum in BHI und MM mit 50 mM Glucose bis OD<sub>600nm</sub> von 1,0

Für den Wildtyp EGD-e und eine PTS-Deletionsmutante wurde das Wachstum abhängig von der Glucosekonzentration getestet (D.3.3.2). Dabei wurde festgestellt, dass sich für die Untersuchung der Glucoseaufnahme 10 mM Glucose im Medium besser eignen, da bei höheren Konzentrationen das Wachstum nicht beeinflusst wird. Aus diesem Grund wurden die PTS<sup>Glc</sup>-Deletionsmutanten auf ihr Verhalten in Minimalmedium auch mit der geringeren Zuckerkonzentration getestet. Abbildung 55 zeigt die Wachstumskurven von EGD-e und den PTS<sup>Glc</sup>-Mutanten in Minimalmedium mit 10 mM Glucose oder 5 mM Cellobiose. Mit Cellobiose wurde eine geringere Konzentration gewählt, da ein Cellobiose Molekül aus zwei beta-glykosidisch verbundenen Einheiten Glucose besteht.



**Abbildung 55** Wachstum von EGD-e und den PTS<sup>Glc</sup> Deletionsmutanten d0027, d0738, d1035, d2772, d2787, d1255 und d1017 in MM mit 10 mM Glucose oder 5 mM Cellobiose.

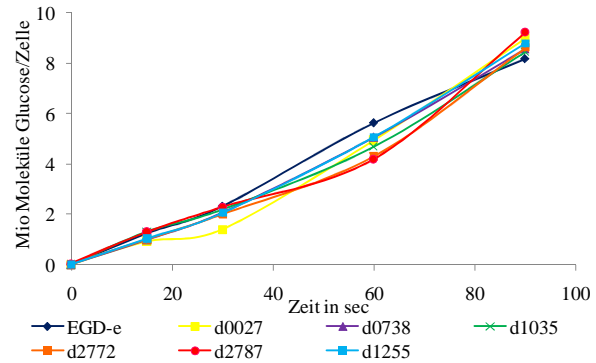
Das Wachstum der Deletionsmutanten d0027, d0738, d1035, d2772, d2787 und d1017 unterscheidet sich in beiden untersuchten Medien nicht vom Wildtyp. Die Wachstumskurve verläuft ähnlich der in 50 mM Glucose, es gibt jedoch zwei Unterschiede: erstens wird die stationäre Phase schon bei einer OD<sub>600nm</sub> von 1,1 in 5 mM Cellobiose und 1,2 in 10 mM Glucose erreicht, zweitens zeigt die Deletion von lmo1255 sowohl in Glucose als auch in Cellobiose eine Verringerung des Wachstums. Die Generationszeit in MM mit 10 mM Glucose verlängert sich von rund 115 min im Wildtyp und den anderen Deletionsmutanten auf 140 min bei d1255. Diese Generationszeiten sind kürzer als in MM mit 50 mM Glucose, werden aber nach einer deutlich längeren Lag-Phase erreicht. Das heißt, dass das Wachstum in 10 mM Glucose im Vergleich zu 50 mM trotzdem verlangsamt ist. Bei Wachstum in 5 mM Cellobiose verlängert sich die Generationszeit von etwa 125 min beim Wildtyp auf fast 160 min in der d1255 Mutante. Im Hämolysetest (Daten nicht gezeigt) sind keine weiteren Auffälligkeiten zu erkennen, und die Daten ähneln denen aus MM mit 50 mM Glucose (Abbildung 53). Nur die hämolytische Aktivität von d1255 verringert sich leicht.

### D.3.2.3 <sup>14</sup>C-Glucose-Aufnahme der PTS<sup>Glc</sup>-Deletionsmutanten

Um die Geschwindigkeit der Glucoseaufnahme vom Wildtyp und den PTS<sup>Glc</sup>-Deletionsmutanten zu bestimmen wurde die Methode der <sup>14</sup>C-Glucoseaufnahme verwendet. Dazu wurden die Stämme in LB mit 50 mM Glucose bis OD<sub>600nm</sub> von 0,4 und 1,0 vermehrt und die Proben wie unter C.10.4 angegeben behandelt. Nach Zugabe von <sup>14</sup>C-markierter Glucose in einem 2 mM Gemisch von <sup>14</sup>C- und <sup>12</sup>C-Glucose wurde 90 Sekunden lang alle 15 Sekunden die Gesamtmenge der aufgenommenen <sup>14</sup>C markierten Glucose gemessen.

Abbildung 56 zeigt repräsentativ das Resultat der Messungen nach Wachstum bis zu einer  $OD_{600nm}$  von 1,0 da sich die Ergebnisse der Messungen bei den zwei ODs nur in der Menge der aufgenommenen Glucosemoleküle und nicht in der Geschwindigkeit zwischen den Stämmen unterscheiden.

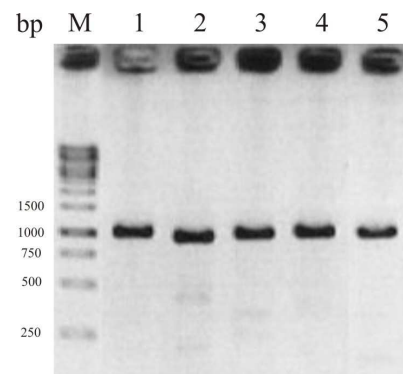
Es ist deutlich erkennbar, dass sich die Deletion der  $PTS^{Glc}$  und von *Imo1255* nicht auf die Glucoseaufnahme auswirkt, da alle Stämme mit der gleichen Geschwindigkeit Glucose aufnehmen wie der Wildtyp EGD-e.



**Abbildung 56**  $^{14}C$ -Glucoseaufnahme von EGD-e und den  $PTS^{Glc}$  Deletionsmutanten d0027, d0738, d1035, d2772, d2787 und d1255.

### D.3.3 Mannose-spezifische Phosphotransferasesysteme

Es ist bekannt, dass auch Mannose-spezifische PTS für die Glucoseaufnahme in Listerien von Bedeutung sein könnten (Dalet *et al.*, 2001). Zur genaueren Untersuchung dieser PTS-Permeasen wurden von den vier putativen  $PTS^{Man}$  (*Imo0021-0024*, *Imo0096-0098*, *Imo0781-0784* und *Imo1997/Imo2000-2002*) in *L. monocytogenes* EGD-e Deletionsmutanten hergestellt. Mittels homologer Rekombination (siehe C.8.12) wurden in-frame Deletionsmutanten der kompletten PTS-Permeasen erzeugt und die Deletionsmutanten im Folgenden als d0021-4, d0096-8, d0781-4 und d1997/2000-2 beschrieben. Zudem wurde eine Deletionsmutante von allen vier  $PTS^{Man}$  hergestellt und als ManPTS bezeichnet. Durch die Auswahl der Oligonukleotide im Bereich der angrenzenden Gene (z.B. *Imo0021-1* und *Imo0024-2* siehe C.5.4) wurde der codierende Bereich auf 10-20 Aminosäuren reduziert und exprimiert so keine funktionstüchtige PTS-Permeasen mehr. Die Deletionsmutanten wurden mittels PCR (Abbildung 57) und Sequenzierung auf Fehlen der PTS-Gene getestet. Die Oligonucleotide für die PCR wurden so gewählt, dass nach Deletion des Gens ein PCR-Produkt von gut 1000 bp produziert wird.

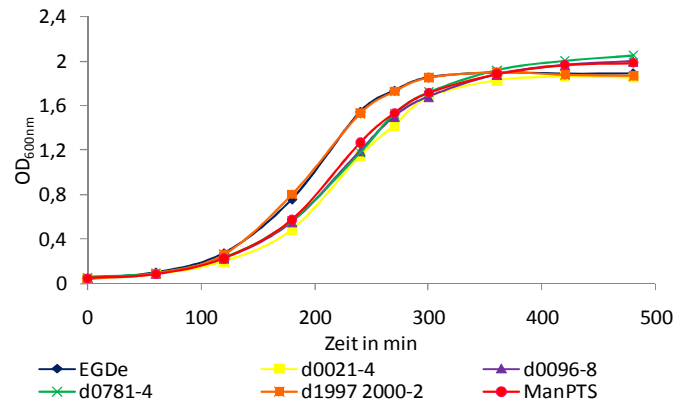


**Abbildung 57** PCR-Produkte der  $PTS^{Man}$  Deletionsmutanten mit den unter C.5.4 angegebenen Primern für 1) d0021-4, 2) d0096-8, 3) d0781-4, 4) d1997, 5) d2000-2.

#### D.3.3.1 Wachstum und PrfA-Aktivität der $PTS^{Man}$ -Deletionsmutanten in verschiedenen Kulturmedien

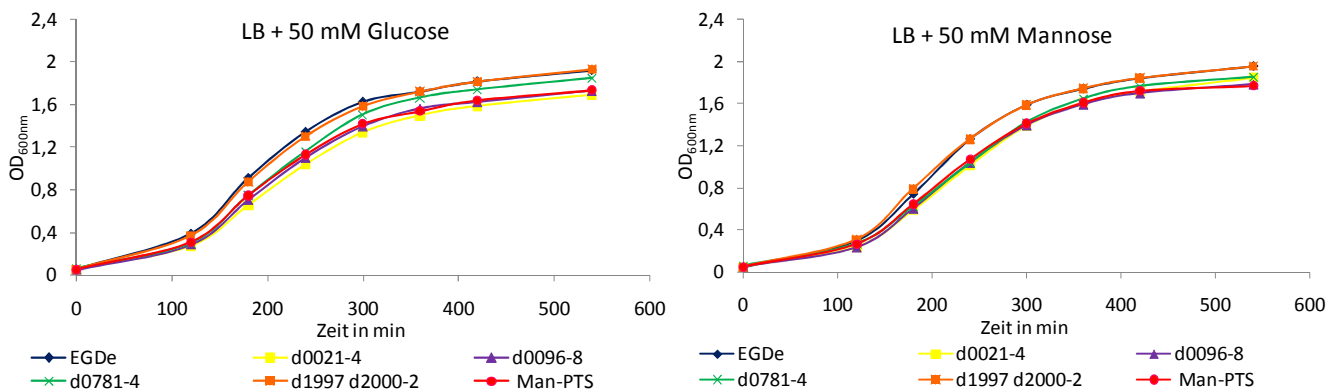
In den Kulturmedien BHI (brain-heart infusion), LB (Luria Bertani) und dem nach Premaratne *et al.* definierten Minimalmedium (MM) supplementiert mit 50 mM Glucose oder Mannose wurden Wachstumskurven vom Wildtyp EGD-e und den  $PTS^{Man}$ -Deletionsmutanten d0021-4, d0096-8, d0781-4, d1997/2000-2 und der Deletionsmutante aller vier  $PTS^{Man}$ -Permeasen (ManPTS) hergestellt. Bei einer  $OD_{600nm}$  von 0,8 wurden Proben der Gesamtzellsuspension abgenommen und die hämolytische Aktivität nach dem Protokoll C.12 gemessen.

In BHI (Abbildung 58) wächst die Deletionsmutante d1997/2000-2 mit einer Generationszeit um 40 min wie der Wildtyp und zeigt keinerlei Wachstumshemmung durch die Deletion dieser  $\text{PTS}^{\text{Man}}$ -Permease. Die Deletionen von lmo0021-0024, lmo0096-0098 und lmo0781-0784 verlängern die Generationszeit auf etwa 46 min und zeigen zudem eine längere Lag-Phase. Die Deletion aller vier  $\text{PTS}^{\text{Man}}$  in der ManPTS Mutante erhöht die Generationszeit nicht weiter und bleibt bei 46 min.



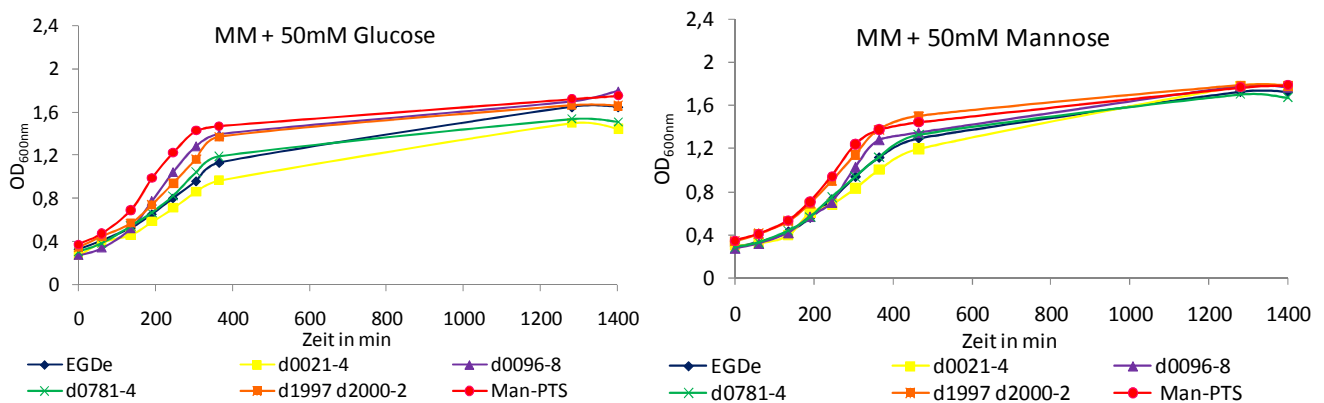
**Abbildung 58** Wachstum von EGD-e und den  $\text{PTS}^{\text{Man}}$ -Deletionsmutanten d0021-4, d0096-8, d0781-4, d1997/2000-2 und ManPTS in BHI

In LB als Kulturmedium mit 50 mM Glucose versetzt zeigen die Stämme ein ähnliches Wachstum der Mutanten wie in BHI. Der Hauptunterschied liegt vor allem darin, dass in der logarithmischen Wachstumsphase alle Stämme mit einer Generationszeit von 46 min wachsen. Das in Abbildung 59 zu erkennende verringerte Wachstum von d0021-4, d0096-8, d0781-4 und ManPTS basiert also nur auf einer verlängerten Lag-Phase. Auffällig ist zudem, dass d0781-4 in der Mitte der logarithmischen Phase plötzlich schneller wächst. In LB mit 50 mM Mannose als zusätzliche Kohlenstoffquelle zeigt sich ein ähnliches Bild. Die Generationszeit fast aller Stämme liegt um 45 min. Nur die Deletion von lmo0781-0784 hat eine stärkere Auswirkung auf das Wachstum in LB mit Mannose, da sich die Generationszeit in diesem Stamm auf 49 min erhöht und das in Glucose auffällig verstärkte Wachstum nicht auftritt.



**Abbildung 59** Wachstum von EGD-e und den  $\text{PTS}^{\text{Man}}$ -Deletionsmutanten d0021-4, d0096-8, d0781-4, d1997/2000-2 und ManPTS in LB mit 50 mM Glucose und Mannose

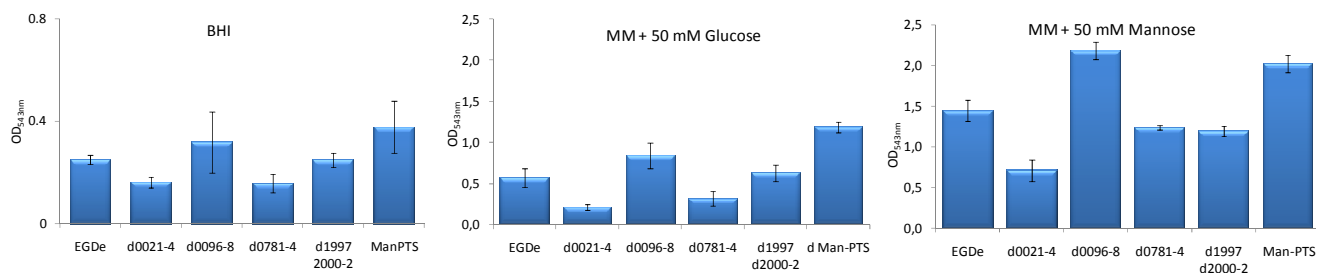
Das Wachstum in Minimalmedium wurde nach einem Shift aus BHI bei einer  $\text{OD}_{600\text{nm}}$  von 0,3 bis 0,4 durchgeführt, um die lange Lag-Phase das Wachstum zu umgehen. Im MM können die Bakterien nur die zugegebene Kohlenstoffquelle verwenden, da im Grundmedium keine verwertbare Kohlenstoffquelle vorhanden ist. Abbildung 60 zeigt das Wachstum der  $\text{PTS}^{\text{Man}}$ -Deletionsmutanten in MM mit 50 mM Glucose oder 50 mM Mannose als einziger Kohlenstoffquelle.



**Abbildung 60** Wachstum von EGD-e und den PTS<sup>Man</sup>-Deletionsmutanten d0021-4, d0096-8, d0781-4, d1997/2000-2 und ManPTS in MM mit 50 mM Glucose und Mannose

Bei Wachstum mit 50 mM Glucose und auch mit 50 mM Mannose als einziger Kohlenstoffquelle ist d0021-4 die am langsamsten wachsende Mutante und hat bei der Shift-Methode eine Generationszeit von etwa 150 min. Der Wildtyp und alle anderen Mutanten wachsen mit einer Generationszeit um 140 min. Dies erscheint angesichts der in D.2.1E.2.1 festgestellten Generationszeit von 100 min bei EGD sehr langsam. Zudem zeigen die Deletionsmutanten der putativen Glucose aufnehmenden PTS<sup>Man</sup>(Imo0096-0098) und PTS<sup>Man</sup>(Imo0781-0784) und vor allem ManPTS im Vergleich zum Wildtyp eine sehr lange Generationszeit. Die BHI-Shift-Methode ist daher weniger geeignet für ein Wachstum in MM.

Von allen untersuchten Stämmen wurden in BHI und MM bei einer OD<sub>600nm</sub> von 0,8 Proben abgenommen und die hämolytische Aktivität gemessen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 61 dargestellt.

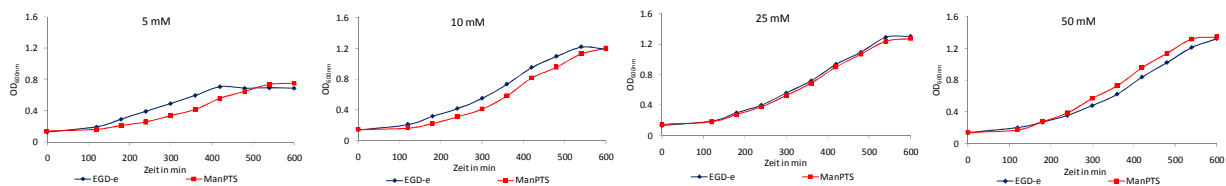


**Abbildung 61** Hämolytische Aktivität von EGD-e und den PTS<sup>Man</sup>-Deletionsmutanten d0021-4, d0096-8, d0781-4, d1997/2000-2 und ManPTS nach Wachstum in BHI und MM mit 50 mM Glucose oder Mannose bis OD<sub>600nm</sub> von 0,8.

In BHI erhöht sich die Aktivität von PrfA und somit die Menge an LLO in den Mutanten d0096-8, d1997/2000-2 und ManPTS leicht gegenüber dem Wildtyp EGD-e. Die Deletion von Imo0021-0024 und Imo0781-0784 verringert dagegen die PrfA-Aktivität leicht. Nach Wachstum in MM mit 50 mM Glucose ergibt sich für d0021-4 und d0781-4 ebenfalls eine verringerte hämolytische Aktivität im Vergleich zu EGD-e. Die Mutante d1997/2000-2 verhält sich wie der Wildtyp und d0096-8 und ManPTS zeigen eine leicht erhöhte PrfA-Aktivität. Das Bild ist in MM mit 50 mM Mannose fast gleich. Hier verändert sich nur die hämolytische Aktivität von d0781-4 im Vergleich zum Glucose-haltigem MM, denn die hämolytische Aktivität entspricht hier wieder den Werten des Wildtyps und ist nicht verringert.

### D.3.3.2 Bestimmung der optimalen Glucosekonzentration im Medium

Die üblicherweise im Labor verwendete Glucosekonzentration im Minimalmedium könnte für die Untersuchung der wichtigsten Glucose-aufnehmenden PTS zu hoch sein. Schon 1998 wurde von Cline *et al.* (Cline *et al.*, 1998) die Glucosekonzentration im Blutplasma mit etwa 10 mM und im Muskel mit zirka 1 mM gemessen. Die verwendete Menge von 50 mM unterscheidet sich also stark von der im Wirt für *L. monocytogenes* zur Verfügung stehenden Glucosemenge. Um die für Versuche optimale Konzentration an Glucose im MM zu bestimmen wurde das Wachstum von EGD-e und der ManPTS-Deletionsmutante in MM mit 5, 10, 25 und 50 mM Glucose untersucht.

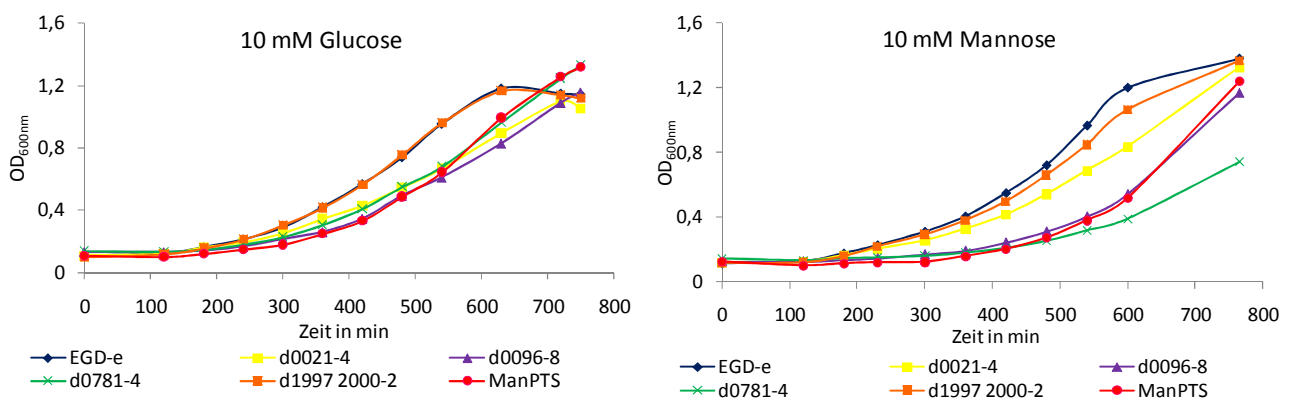


**Abbildung 62** Wachstum von EGD-e und der PTS<sup>Man</sup>-Deletionsmutante ManPTS in MM mit 5, 10, 25 und 50 mM Glucose.

Abbildung 62 zeigt, dass die Deletionsmutante ManPTS in MM mit 50 mM Glucose sich sogar schneller vermehrt als EGD-e und mit 25 mM gleich gut. Sind nur noch 10 mM Glucose im Medium verlangsamt sich das Wachstum von ManPTS im Vergleich zu EGD-e und das Wachstumsmaximum der Stämme sinkt von OD<sub>600nm</sub> von 1,6 auf 1,2. Mit nur 5 mM Glucose im Medium wächst ManPTS deutlich langsamer als der Wildtyp. Beide Stämme erreichen jedoch nur noch ein Wachstumsmaximum OD<sub>600nm</sub> von 0,8. Nach den Daten von Cline und um auch eine ausreichende logarithmische Phase zu erreichen wurde für die folgenden Versuche mit 10 mM Glucose im Medium gearbeitet. Proben wurden mit der neuen Zuckerkonzentration bei OD<sub>600nm</sub> von 0,6 abgenommen.

### D.3.3.3 Verhalten der PTS<sup>Man</sup>-Deletionsmutanten in MM mit 10 mM Zucker

Mit dem Wildtyp EGD-e, den PTS<sup>Man</sup>-Einzeldelentionsmutanten (d0021-4, d0098-8, d0781-4, d1997/2000-2) und der Komplettmutante (ManPTS) wurden nun Wachstumskurven in Minimalmedium mit 10 mM Glucose und Mannose durchgeführt. Die Stämme wurden in BHI über Nacht kultiviert, anschließend zentrifugiert, einmal mit Minimalmedium gewaschen, in das MM überführt und auf eine OD<sub>600nm</sub> von mindestens 0,1 eingestellt. Nach



**Abbildung 63** Wachstum von EGD-e und den PTS<sup>Man</sup>-Deletionsmutanten d0021-4, d0096-8, d0781-4, d1997/2000-2 und ManPTS in MM mit 10 mM Glucose und Mannose.

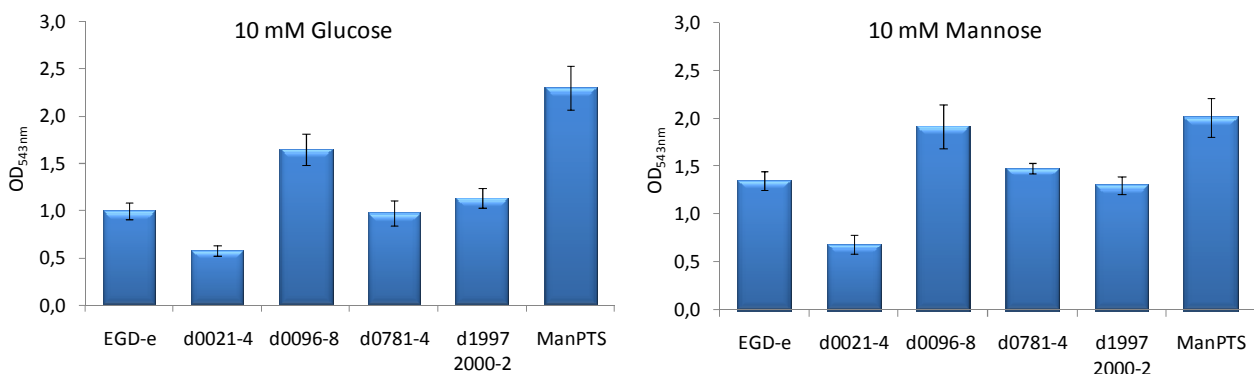


zwei Stunden wurde der erste Messwert genommen. Dies gewährleistete eine gleiche Behandlung aller Stämme und für MM gut reproduzierbare Wachstumskurven. Zur Messung der hämolytischen Aktivität wurden bei  $OD_{600nm}$  von 0,6 Proben abgenommen.

Abbildung 63 zeigt die erhaltenen Wachstumskurven. In Minimalmedium mit 10 mM Glucose wachsen der Wildtyp und d1997/200-2 mit einer Generationszeit um 120 min. Die Deletionsmutanten der PTS-Permeasen codiert von lmo0021-0024 und lmo0781-0784 wachsen mit einer Generationszeit von knapp 150 min, und d0096-8 und ManPTS verdoppeln sich in der logarithmischen Wachstumsphase in rund 180 min. Auffällig ist zudem die erhöhte stationäre Phase der Deletionsmutanten im Vergleich zum Wildtyp und zu d1997/2000-2. Daneben wird deutlich, dass die Deletionsmutanten (außer d1997/2000-2) verglichen mit dem Wildtyp eine längere Lag-Phase aufweisen. In MM mit 10 mM Mannose hat der Wildtyp eine Generationszeit von rund 145 min, gefolgt von d1997/2002 und ManPTS mit etwa 155 min. Letztere wächst nach einer sehr langen Lag-Phase deutlich schneller als d0096-8, welche wie d0021-4 eine Generationszeit von etwa 170 min aufweist. Der Unterschied zwischen diesen zwei Stämmen ist die deutlich längere Lag-Phase von d0096-8. Die in 10 mM Mannose am langsamsten wachsende Mutante ist d0781-4 mit einer sehr langen Lag-Phase und mit einer Generationszeit von rund 190 min in der logarithmischen Phase.

Die Daten in Minimalmedium mit 10 mM Zucker zeigen im Vergleich zu den Daten mit 50 mM (D.3.3.1) deutlicher, dass die Deletion bestimmter  $PTS^{Man}$ -Permeasen eine Auswirkung auf die Glucose- oder Mannoseaufnahme haben. Auf das Wachstum in Minimalmedium mit 5 mM Cellobiose haben die Deletionen keinen Einfluss. Das Wachstum ähnelt dem in BHI, das heißt außer d1997/2000-2 wachsen alle Mutanten etwas langsamer als der Wildtyp (Daten nicht gezeigt).

Die Daten der Hämolysetests (Abbildung 64) von EGD-e und den  $PTS^{Man}$ -Deletionsmutanten nach Wachstum in MM mit 10 mM Glucose oder Mannose zeigen ein ähnliches Bild wie mit 50 mM Zucker (Abbildung 61). Von den aus Glucose bei einer  $OD_{600nm}$  von 0,6 gewonnenen

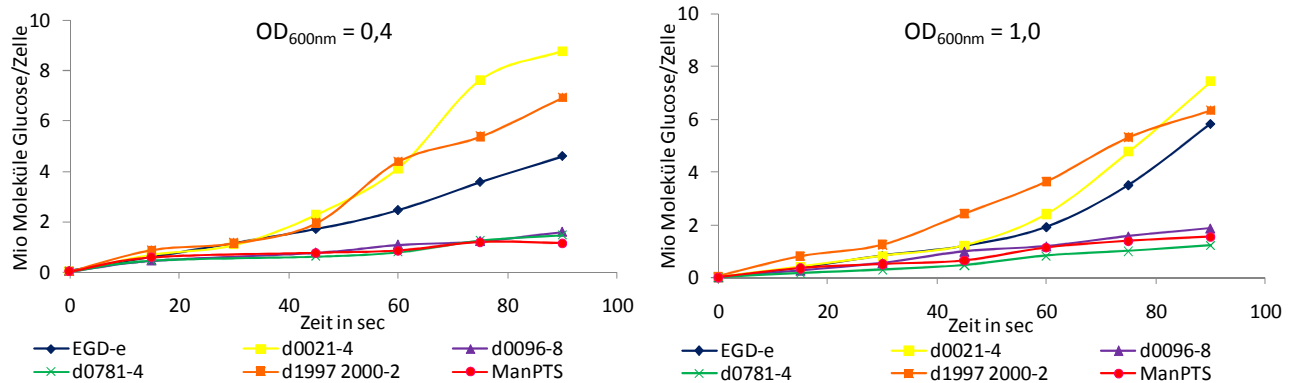


**Abbildung 64** Hämolytische Aktivität von EGD-e und den  $PTS^{Man}$ -Deletionsmutanten d0021-4, d0096-8, d0781-4, d1997/2000-2 und ManPTS nach Wachstum in MM mit 10 mM Glucose und Mannose bis  $OD_{600nm}$  von 0,6.

Proben hat d0021-4 die geringste PrfA-Aktivität im Vergleich zu EGD-e, d0781-4 und d1997/2000-2 verhalten sich wie der Wildtyp und d0096-8 sowie ManPTS zeigen die stärkste hämolytische Aktivität. Nach Wachstum in MM mit 10 mM Mannose ergibt sich fast das gleiche Bild. Die PrfA-Aktivität nach Wachstum in MM mit 5 mM Cellobiose ist beim Wildtyp und bei den meisten Mutanten auf ein Minimum reprimiert. Nur d0096-8 und ManPTS zeigen eine leichte Hämolyse (Daten nicht gezeigt).

### D.3.3.4 $^{14}\text{C}$ -Glucoseaufnahme der $\text{PTS}^{\text{Man}}$ -Deletionsmutanten

Für die Messung der Geschwindigkeit der Glucoseaufnahme vom Wildtyp und den  $\text{PTS}^{\text{Man}}$ -Deletionsmutanten wurde die Methode der  $^{14}\text{C}$ -Glucoseaufnahme verwendet. Dazu wurden die Stämme in LB mit 50 mM Glucose bis  $\text{OD}_{600\text{nm}}$  von 0,4 und 1,0 vermehrt und die Proben wie unter C.10.4 angegeben behandelt. Nach Zugabe von  $^{14}\text{C}$ -markierter Glucose in einem 2



**Abbildung 65**  $^{14}\text{C}$ -Glucoseaufnahme von EGD-e und den  $\text{PTS}^{\text{Man}}$  Deletionsmutanten d0021-4, d0096-8, d0781-4, d1997/2000-2 und ManPTS.

mM Mix mit normaler  $^{12}\text{C}$ -Glucose wurde 90 Sekunden lang alle 15 Sekunden die Gesamtmenge der aufgenommenen  $^{14}\text{C}$ -markierten Glucose gemessen. Abbildung 65 zeigt die erhaltenen Daten für die Geschwindigkeit der Glucoseaufnahme. Legt man über die Messwerte eine Trendlinie mit Schnittpunkt Null, lässt sich die Steigung berechnen. Tabelle 8 zeigt die Daten der Steigungen und wie schon beim Betrachten der Abbildung deutlich wird nimmt d0021-4 Glucose mit einer Steigung von 0,0856 bzw. 0,0614 am schnellsten auf, gefolgt von d1997/2000-2 und dem Wildtyp EGD-e. Mit deutlichem Abstand folgen die Deletionsmutanten d0096-8, d0781-4 und ManPTS, wobei auffällt, dass sich die Glucoseaufnahmegeschwindigkeit von d0781-4 im Gegensatz zu den zwei anderen Deletionsmutanten von  $\text{OD}_{600\text{nm}}$  0,4 zu 1,0 nicht verbessert und mit einer Steigung von 0,013 nur sehr gering ist.

	Steigungen 0,4	Steigungen 1,0
EGD-e	0.0468	0.0482
d0021-4	0.0856	0.0614
d0096-8	0.0175	0.0207
d0781-4	0.0155	0.013
d1997/2000-2	0.0696	0.0658
ManPTS	0.0146	0.0176

**Tabelle 8** Steigung von EGD-e und den  $\text{PTS}^{\text{Man}}$ -Deletionsmutanten d0021-4, d0096-8, d0781-4, d1997/2000-2 und ManPTS während Messung der  $^{14}\text{C}$ -Glucoseaufnahme bei  $\text{OD}_{600\text{nm}}$  von 0,4 und 1,0.

### D.3.3.5 Expressionsmuster der auffälligen $\text{PTS}^{\text{Man}}$ -Deletionsmutanten

Die Real Time Daten aus D.3.1.3 und frühere Untersuchungen von Dalet *et al.* (2001) legten die Vermutung nahe, dass vor allem das  $\text{PTS}^{\text{Man}}$ (Imo0096-0098) wichtig für die Glucoseaufnahme sein könnte. Die Deletion dieser  $\text{PTS}$ -Permease zeigte aber nur eine geringe Wachstumsverzögerung in Form einer verlängerten Lag-Phase (D.3.3.3). Die Generationszeit dieser Mutante und der Deletionsmutante aller  $\text{PTS}^{\text{Man}}$  (ManPTS) wich kaum vom Wildtyp ab. Trotzdem zeigte sich eine Auswirkung auf die hämolytische Aktivität in diesen Stämmen im Vergleich zum Wildtyp. Von den im Wachstum nur leicht auffälligen Mutanten zeigten in der  $^{14}\text{C}$ -Glucoseaufnahme vor allem d0096-8, d0781-4 und die ManPTS-Deletionsmutante eine stark verminderte Glucoseaufnahme (D.3.3.4).

Mit speziell hergestellten  $\text{PTS}$ -Microarrays wurde die Expression aller  $\text{PTS}$ -Gene und die der PrfA-abhängigen Virulenzgene in den Deletionsmutanten d0096-8, d0781-4 und ManPTS im

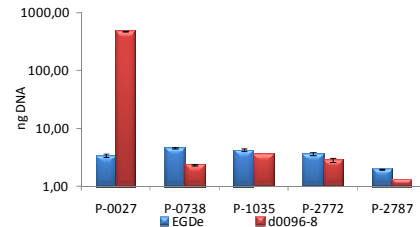
Vergleich zum Wildtyp aufgezeigt. Die Stämme wurden dafür in MM mit 10 mM Glucose bis zu einer OD<sub>600nm</sub> von 0,6 gezogen, RNA isoliert und nach C.18 weiterbehandelt. Bei der Auswertung der Microarrays wurde *rpoB* als Kontrolle verwendet und die Werte für diesen Spot auf 1,0 normalisiert.

**Tabelle 9** Vergleichende Expressionsanalyse der Gene codierend für *prfA*, die PrfA-abhängigen Virulenzgene und einiger PTS-Gene in *L. monocytogenes* EGD-e d0096-8, d0781-4 und ManPTS im Vergleich zum Wildtyp EGD-e nach Wachstum in MM mit 10 mM Glucose versetzt, n.a. steht für unter diesen Bedingungen nicht detektierbare Gene

Gen-name	d0096-8/ EGD-e	d0781-4/ EGD-e	ManPTS/ EGD-e	Annotation nach <a href="http://genolist.pasteur.fr/ListiList/">http://genolist.pasteur.fr/ListiList/</a>
<b>lmo0200</b>	1.33	1.09	1.26	<i>prfA</i> - listeriolysin positive regulatory protein
<b>lmo0201</b>	1.45	1.01	1.24	<i>plcA</i> - phosphatidylinositol-specific phospholipase c
<b>lmo0202</b>	1.62	1.32	1.38	<i>hly</i> - listeriolysin O precursor
<b>lmo0203</b>	1.14	0.88	2.86	<i>mpl</i> - Zinc metalloproteinase precursor
<b>lmo0204</b>	1.43	1.19	1.77	<i>actA</i> - actin-assembly inducing protein precursor
<b>lmo0205</b>	1.48	1.17	1.93	<i>plcB</i> - phospholipase C
<b>lmo0433</b>	1.49	1.16	1.60	<i>inlA</i> - InternalinA
<b>lmo0434</b>	1.58	1.33	2.57	<i>inlB</i> - InternalinB
<b>lmo0838</b>	4.32	3.69	8.51	<i>uhpT</i> - highly similar to hexose phosphate transport protein
<b>lmo1786</b>	1.77	1.03	4.86	<i>inlC</i> - Internalin C
<b>lmo0027</b>	59.42	50.35	41.26	similar to PTS system, beta-glucosides specific enzyme IIBC
<b>lmo0096</b>	0.01	0.01	0.05	similar to PTS system mannose-specific, factor IIB
<b>lmo0097</b>	0.01	0.02	0.05	similar to PTS system mannose-specific, factor IIC
<b>lmo0098</b>	0.00	0.02	0.04	similar to PTS system mannose-specific, factor IID
<b>lmo0426</b>	3.72	2.35	2.33	similar to PTS fructose-specific enzyme IIA component
<b>lmo0427</b>	3.78	2.74	2.54	similar to PTS fructose-specific enzyme IIB component
<b>lmo0428</b>	4.29	2.59	2.83	similar to PTS fructose-specific enzyme IIC component
<b>lmo0781</b>	2.47	0.04	0.16	similar to mannose-specific phosphotransferase system (PTS) component IID
<b>lmo0782</b>	2.65	0.01	0.05	similar to mannose-specific phosphotransferase system (PTS) component IIC
<b>lmo0783</b>	2.16	0.01	0.04	similar to mannose-specific phosphotransferase system (PTS) component IIB
<b>lmo0784</b>	1.85	0.01	0.06	similar to mannose-specific phosphotransferase system (PTS) component IIA
<b>lmo1997</b>	2.73	n.a.	n.a.	similar to PTS mannose-specific enzyme IIA component
<b>lmo2000</b>	3.31	3.48	n.a.	similar to PTS mannose-specific enzyme IID component
<b>lmo2001</b>	2.97	3.40	n.a.	similar to PTS mannose-specific enzyme IIC component
<b>lmo2002</b>	2.84	2.26	n.a.	similar to PTS mannose-specific enzyme IIB component
<b>lmo2797</b>	4.76	4.11	2.92	similar to phosphotransferase system mannitol-specific enzyme IIA
<b>lmo2799</b>	8.99	n.a.	3.67	similar to phosphotransferase system mannitol-specific enzyme IIBC

Die Daten in Tabelle 9 und im Anhang Tabelle 19 zeigen, dass die Transkriptmenge von *prfA* in den Deletionsmutanten d0096-8, d0781-4 und ManPTS kaum verschieden zum Wildtyp ist. In den zwei Einzelmutanten ist nur der Hexose-Phosphat-Transporter (*uhpT*) hochreguliert, wobei alle PrfA-abhängigen Gene in d0096-8 im Vergleich zu d0781-4 stärker exprimiert sind. Die höchste Expressionsrate der PrfA-abhängigen Gene weist die ManPTS-Deletionsmutante auf, denn zusätzlich zu *uhpT* sind hier auch noch die Gene *mpl*, *inlB* und *inlC* eindeutig hochreguliert.

Bei den PTS-Genen kann man deutlich die Deletionen erkennen, da die Gene die deletiert sind in den Mutanten im Vergleich zum Wildtyp nicht exprimiert sind. Auffällig ist hierbei, dass in d0781-4 zusätzlich lmo0096-0098 auf Null herunterreguliert ist. PCR-Analysen (Daten nicht gezeigt) haben aber eine Deletion von lmo0096-8 in d0781-4 ausgeschlossen. In d0096-8 sind dagegen die Gene für PTS<sup>Man</sup>(lmo0781-0784) angeschaltet, sowie in beiden Einzel-Deletionsmutanten PTS<sup>Man</sup>(lmo1997/2000-2002). Zusätzlich ist noch ein PTS<sup>Fru</sup>(lmo0426-0428) in allen drei untersuchten Mutanten hochreguliert, sowie eine Mannitol-spezifisches PTS-Permease codiert von lmo2797 und lmo2799. Am auffälligsten ist jedoch in allen drei Deletionsmutanten die starke Hochregulation (40- bis 50-fach) des im Wildtyp kaum exprimierten PTS<sup>Glc</sup>(lmo0027). Die starke Hochregulation von PTS<sup>Glc</sup>(lmo0027) wurde für d0096-8 auch in Real Time Analysen nach Wachstum in MM mit 50 mM Glucose (Abbildung 66), LB und BHI (Daten nicht gezeigt) nachgewiesen.



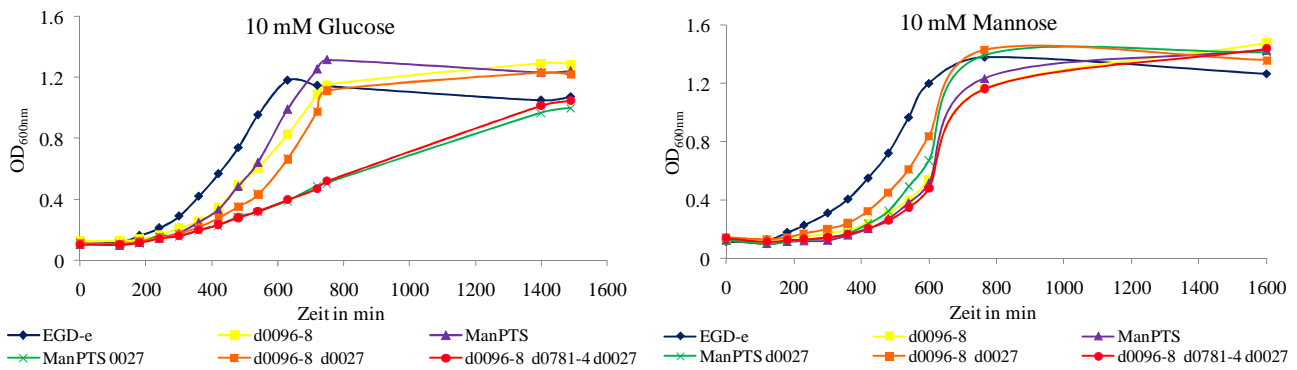
**Abbildung 66** Expressionsstärke der Gene codierend für PTS<sup>Glc</sup>. Angegeben ist die gebildete Transkriptmenge in ng cDNA von *L. monocytogenes* EGD-e und d0096-8 nach Wachstum in MM mit 50 mM Glucose bis zu einer OD<sub>600nm</sub> von 0,8.

### D.3.3.6 Verhalten der PTS<sup>Man</sup>-Deletionsmutanten mit d0027

Das auffälligste Gen im Expressionsmuster der Deletionsmutanten von PTS<sup>Man</sup>(lmo0096-0098), PTS<sup>Man</sup>(lmo0781-0784) und ManPTS war die PTS<sup>Glc</sup>-Permease codiert von lmo0027 (D.3.3.5). Dieses ist in den Deletionsmutanten im Vergleich zum Wildtyp EGD-e stark hochreguliert, obwohl das Gen im Wildtyp fast gar nicht exprimiert ist und auch eine Deletion keine Besonderheiten zeigt (D.3). Jedoch steht lmo0027 offenbar unter Katabolitrepression, da es nach Wachstum in Minimalmedium mit Glycerin als einziger Kohlenstoffquelle eine leichte erhöhte Transkriptmenge nachweisbar ist (Abbildung 47).

lmo0027 wurde nun in den EGD-e Deletionsmutanten von PTS<sup>Man</sup>(lmo0096-0098), einer PTS<sup>Man</sup>(lmo0096-0098) und PTS<sup>Man</sup>(lmo0781-0784) Doppelmutante und ManPTS deletiert. Die Mutanten werden wie folgt bezeichnet: d0096-8 d0027, d0096-8 d0781-4 d0027 und ManPTS d0027. In Wachstumsuntersuchungen, Hämolysetests und Microarrays wurden diese Mutanten charakterisiert.

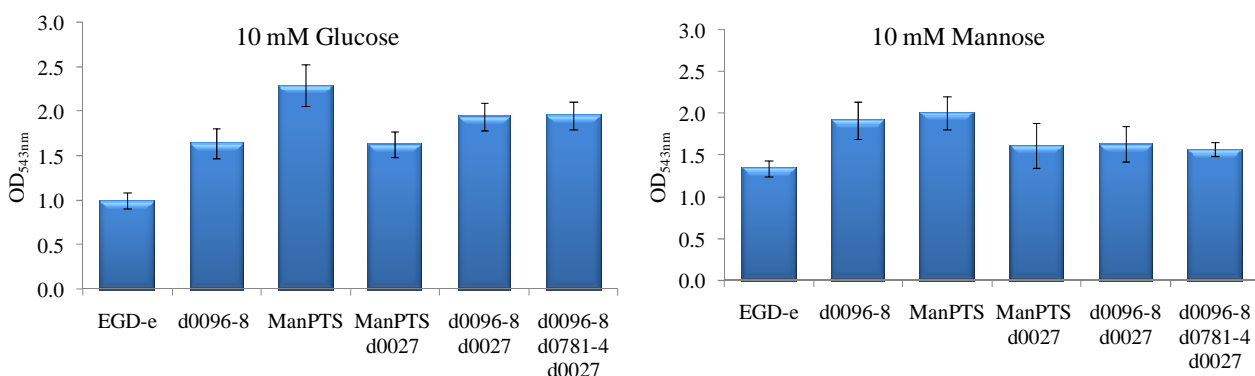
Das Wachstum in BHI (Daten nicht gezeigt) ändert sich durch die Deletion von lmo0027 nicht und ist vergleichbar mit den Daten in Abbildung 58. In Minimalmedium mit 10 mM Glucose (Abbildung 67) zeigen sich deutliche Unterschiede. Durch die Deletion von lmo0027 in d0096-8 verringert sich das Wachstum leicht und die Generationszeit verlängert sich von knapp 180 min auf gut 190 min. Bei den Deletionsmutanten d0096-8 d0781-4 d0027 und ManPTS d0027 ist die Auswirkung wesentlich stärker. Die Generationszeit verlängert sich von 180 min bei ManPTS auf gut 260 min und die Mutanten brauchen eine viel längere Zeit um die stationäre Phase zu erreichen. In Minimalmedium mit 10 mM Mannose ergibt sich dagegen ein ganz anderes Bild. Die Deletion von lmo0027 verändert in keinem Fall die



**Abbildung 67** Wachstum von EGD-e und den PTS Deletionsmutanten d0096-8, d0096-8 d0027, d0096-8 d0781-4 d0027, ManPTS und ManPTS d0027 in MM mit 10 mM Glucose und Mannose

Generationszeit. Das Wachstum in MM mit 10 mM Cellobiose (Daten nicht gezeigt) wird wiederum von allen Deletionen im Vergleich zu EGD-e nicht beeinflusst.

Die Daten der Hämolysetests (Abbildung 68) zeigen, dass die Deletion von lmo0027 bei allen drei Mutanten zu keiner höheren hämolytischen Aktivität führt. Bei ManPTS d0027 nach Wachstum in MM mit 10 mM Glucose und bei allen drei Mutanten nach Wachstum in MM mit 10 mM Mannose sieht es sogar nach einer leichten Verringerung der hämolytischen Aktivität aus. Dies ist aber auch auf die starken Schwankungen der Hämolysetests zurückzuführen. Generell kann man sagen, dass die Deletion von lmo0027 die Hämolyse nach Wachstum in Minimalmedium nicht weiter verstärkt (siehe auch Abbildung 53). Dieses Ergebnis unterscheidet sich auf Grund der verschiedenen verwendeten Methoden von den Microarraydaten in Tabelle 10.



**Abbildung 68** Hämolytische Aktivität von EGD-e und den PTS-Permeasen-Deletionsmutanten d0096-8, d0096-8 d0027, d0096-8 d0781-4 d0027, ManPTS und ManPTS d0027 nach Wachstum in MM mit 10 mM Glucose und Mannose bis  $OD_{600nm}$  von 0,6.

Die Deletionsmutanten ManPTS d0027 und d0096-8 d0781-4 d0027 zeigen eine starke Hemmung des Wachstums in Glucose-haltigem MM, erreichen aber immer noch (wenn auch nach längerer Zeit) die stationäre Phase. Offenbar werden weiterhin andere PTS-Permeasen aktiviert oder sind aktiv um Glucose aufzunehmen. Um einen besseren Einblick in das PTS-Permeasen-Expressionsmuster der Mutanten zu erhalten wurden PTS-Microarrays von d0027, d0096-8 d0027, d0096-8 d0781-4 d0027 und ManPTS d0027 mit cDNA aus RNA isoliert bei  $OD_{600nm}$  von 0,6 hergestellt. Tabelle 10 und Tabelle 20 (Anhang) zeigen die Daten.

**Tabelle 10** Vergleichende Expressionsanalyse der Gene codierend für *prfA*, die PrfA-abhängigen Virulenzgene und einiger PTS-Gene in *L. monocytogenes* EGD-e d0027, d0096-8 d0027, d0096-8 d0781-4 d0027 und ManPTS d0027 im Vergleich zum Wildtyp EGD-e nach Wachstum in MM mit 10 mM Glucose, n.a. steht für unter den Bedingungen nicht detektierbare Gene. Die Genbeschreibung ist Tabelle 13 im Anhang zu entnehmen.

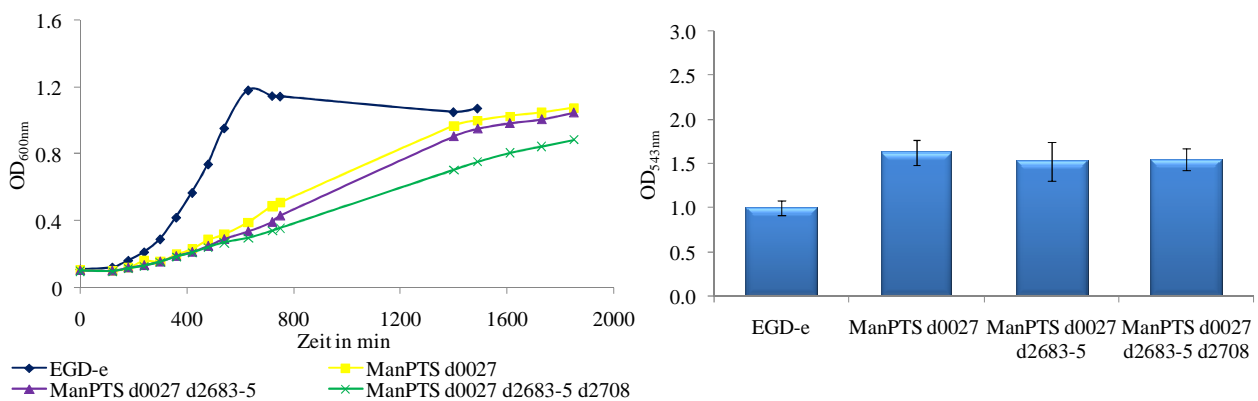
Genname	d0027/ EGD-e	d0096-8 d0027/ EGD-e	d0096-8 d0781-4 d0027/ EGD-e	ManPTS d0027/ EGD-e
<b>lmo0200</b>	1.38	1.64	2.23	3.93
<b>lmo0201</b>	1.30	1.36	2.29	13.56
<b>lmo0202</b>	0.92	1.91	2.07	26.10
<b>lmo0203</b>	1.04	1.45	1.97	8.26
<b>lmo0204</b>	1.03	1.66	2.29	23.09
<b>lmo0205</b>	1.08	1.52	2.29	26.36
<b>lmo0433</b>	0.98	1.56	2.33	1.98
<b>lmo0434</b>	1.29	1.40	1.25	1.38
<b>lmo0838</b>	1.33	5.13	4.60	14.15
<b>lmo1786</b>	1.24	1.17	3.15	7.34
<b>lmo0426</b>	n.a.	3.28	n.a.	3.52
<b>lmo0427</b>	n.a.	3.70	1.65	4.11
<b>lmo0428</b>	0.99	3.29	1.96	5.22
<b>lmo0781</b>	1.23	3.07	0.48	0.09
<b>lmo0782</b>	1.26	3.63	0.09	0.02
<b>lmo0783</b>	1.07	3.69	0.08	0.01
<b>lmo0784</b>	0.90	3.26	0.08	0.03
<b>lmo2683</b>	1.40	0.06	0.90	2.97
<b>lmo2684</b>	1.74	0.27	6.41	16.21
<b>lmo2685</b>	1.59	1.47	6.51	35.94
<b>lmo2708</b>	1.14	1.94	24.46	383.86
<b>lmo2772</b>	n.a.	7.76	6.48	19.87

Das Expressionsmuster der d0027-Deletionsmutante zeigt sich wie erwartet unauffällig. Die Deletion hat keine Auswirkung auf *prfA*, die PrfA-abhängigen Virulenzgene oder andere PTS-Permeasen. Anders verhalten sich die drei anderen untersuchten Deletionsmutanten. Bei d0096-8 d0027 scheint der Verlust von lmo0027 durch eine erhöhte Expression von PTS<sup>Man</sup>(lmo0781-0784) ausgeglichen zu werden (siehe Tabelle 9). Weiterhin fällt auf, dass PTS<sup>Glc</sup>(lmo2772) hochreguliert ist, wobei eine siebenfache Hochregulation im Vergleich zu einer nicht detektierbaren Genexpression weitaus geringer ins Gewicht fällt als die Hochregulation eines stark exprimierten Gens wie lmo0781-0784. In der Dreifachmutante d0096-8 d0781-4 d0027 ist die Expression von *prfA* und der PrfA-regulierten Virulenzgene mindestens zweifach hochreguliert. Zudem führt der Verlust der beiden stark exprimierten PTS<sup>Man</sup>(lmo0096-0098 und lmo0781-0784) zu einer sechsfachen Hochregulation des schon im Wildtyp stark exprimierten Gens codiert von PTS<sup>Lac</sup>(lmo2683-2685). Weiterhin sind die im Wildtyp kaum exprimierten Gene lmo2772 und lmo2708 stark hochreguliert. Prinzipiell dasselbe Bild wie in der Dreifachmutante zeigt sich in ManPTS d0027. Der einzige Unterschied ist, dass alle hochregulierten Gene noch viel stärker hochreguliert sind, wobei besonders PTS<sup>Lac</sup>(lmo2683-2685) und lmo2772 sowie lmo2708 auffallen. Zusätzlich ist wieder das PTS<sup>Fru</sup>(lmo0426-0428) in allen drei untersuchten Mutanten leicht hochreguliert.

### D.3.3.7 Verhalten der Deletionsmutanten ManPTS d0027 d2683-5 und ManPTS d0027 d2683-5 d2708

Abschnitt D.3.3.6 hat gezeigt, dass sich die Dreifachdeletionsmutante d0096-8 d0781-4 d0027 in ihrem Wachstum in Minimalmedium mit 10 mM Glucose ähnlich verhält wie die ManPTS d0027, was darauf hindeutet, dass diese drei PTS-Permeasen die wichtigsten für die Glucoseaufnahme in *L. monocytogenes* EGD-e sind. In dieser Mutante wird jedoch das PTS<sup>Man</sup>(lmo1997/2000-2002) angeschaltet, weswegen es sinnvoller erscheint, mit der ManPTS d0027 weiterzuarbeiten, in der das PTS<sup>Man</sup>(lmo1997/2000-2002) deletiert ist. Ziel dieses Teils der Dissertation ist es, die Glucoseaufnahme in *L. monocytogenes* EGD-e zu klären. Daher wurde zunächst das im Wildtyp schon stark exprimierte und in der ManPTS d0027 Mutante noch stärker angeschaltete PTS<sup>Lac</sup>(lmo2683-2685) deletiert. Die Microarraydaten dieser Mutante (Tabelle 11) zeigten erneut eine starke Hochregulation von lmo2708, einem Cellobiose-spezifischen EIIC, weshalb dann noch die Deletionsmutante ManPTS d0027 d2683-5 d2708 hergestellt wurde.

Abbildung 69 zeigt das Wachstum vom Wildtyp EGD-e, der Deletionsmutante ManPTS d0027 und den neu hergestellten Deletionsmutanten ManPTS d0027 d2683-5 und ManPTS



**Abbildung 69** Wachstum und Hämolyse mit bei OD<sub>600nm</sub> von 0,6 abgenommenen Proben von EGD-e und den Deletionsmutanten ManPTS d0027, ManPTS d0027 d2683-5 und ManPTS d0027 d2683-5 d2708 in MM mit 10 mM Glucose

d0027 d2683-5 d2708 in Minimalmedium versetzt mit 10 mM Glucose. Der Wildtyp hat wie schon in D.3.3.3 beschrieben eine Generationszeit von rund 120 min, und ManPTS d0027 verdoppelt sich in der logarithmischen Phase auf etwa 260 min (siehe D.3.3.6). Das Wachstum der neu hergestellten Mutanten sieht auf den ersten Blick nicht viel langsamer aus als das der ManPTS d0027 Mutante, das liegt aber am langen Zeitrahmen, den die Abbildung abdeckt. ManPTS d0027 d2683-5 benötigt etwa 400 min für eine Verdopplung, und die Generationszeit von ManPTS d0027 d2683-5 d2708 beträgt sogar 550 min. Abbildung 69 zeigt auch den Hämolysetest mit bei OD<sub>600nm</sub> von 0,6 abgenommener Gesamtzellsuspension. Es ist deutlich zu erkennen, dass die Deletion von PTS<sup>Lac</sup>(lmo2683-2685) und lmo2708 in ManPTS d0027 auf die Hämolyse in Glucose haltigem Minimalmedium keine Auswirkung hat. Dieses Ergebnis unterscheidet sich auf Grund der verschiedenen verwendeten Methoden von den Microarraydaten in Tabelle 11.

Das Wachstum in Minimalmedium mit 10 mM Mannose und die hämolytische Aktivität ist durch die Deletion von PTS<sup>Lac</sup>(lmo2683-2685) und lmo2708 in ManPTS d0027 nicht weiter beeinflusst, das heißt die Mutanten replizieren mit etwa der gleichen Generationszeit wie ManPTS d0027 (Daten nicht gezeigt). In Minimalmedium mit 5 mM Cellobiose ist nach Deletion von PTS<sup>Lac</sup>(lmo2683-2685) das Wachstum in geringem Maße reduziert. Die

hämolytische Aktivität erhöht sich jedoch in Cellobiose-haltigem MM nach Deletion von PTS<sup>Lac</sup>(lmo2683-2685) (Daten nicht gezeigt). Die Auswirkungen der Deletion von PTS<sup>Lac</sup>-Permeasen werden in D.3.4 gezeigt. Aus der Wachstumskurve der Deletionsmutante ManPTS d0027 d2683-5 d2708 lässt sich erkennen, dass nach einer langen Lag Phase offenbar wieder andere PTS-Permeasen angeschaltet werden, die die Glucoseaufnahme übernehmen können.

Tabelle 11 und Tabelle 21 im Anhang zeigen die Expressionsdaten der beiden Deletionsmutanten. In ManPTS d0027 d2683-5 sind nach Wachstum in MM mit 10 mM Glucose verschiedene PTS-Permeasen im Vergleich zum Wildtyp EGD-e hochreguliert, z.B. PTS<sup>Fru</sup>(lmo0426-0428) und die beiden Galactitol spezifischen PTS<sup>Gal</sup>(lmo2096-2098) und PTS<sup>Gal</sup>(lmo2665-2667), außerdem ist das PTS<sup>Glc</sup> codiert von lmo2772 angeschaltet. Besonders auffällig ist jedoch das 300-fach hochregulierte EIIC<sup>Lac</sup>(lmo2708), welches für den die Membran durchspannenden Kanal codiert, eigentlich für Cellobiose annotiert und im Wildtyp nicht exprimiert ist.

**Tabelle 11** Vergleichende Expressionanalyse der Gene codierend für *prfA*, die PrfA-abhängigen Virulenzgene und einiger PTS-Gene in *L. monocytogenes* EGD-e dManPTS d0027 d2683-5 und ManPTS d0027 d2683-5 d2708 im Vergleich zum Wildtyp EGD-e nach Wachstum in MM mit 10 mM Glucose, n.a. steht für unter den Bedingungen nicht detektierbare Gene.

Genname	ManPTS d0027 d2683-5/ EGD-e	ManPTS d0027 d2683-5 d2708/ EGD-e	Annotation nach <a href="http://genolist.pasteur.fr/ListiList/">http://genolist.pasteur.fr/ListiList/</a>
<b>lmo0200</b>	2.44	43.57	<i>prfA</i> - listeriolysin positive regulatory protein
<b>lmo0201</b>	4.34	22.38	<i>plcA</i> - phosphatidylinositol-specific phospholipase c
<b>lmo0202</b>	5.04	50.10	<i>hly</i> - listeriolysin O precursor
<b>lmo0203</b>	4.06	13.78	<i>mpl</i> - Zinc metalloproteinase precursor
<b>lmo0204</b>	4.92	28.59	<i>actA</i> - actin-assembly inducing protein precursor
<b>lmo0205</b>	5.81	4.25	<i>plcB</i> - phospholipase C
<b>lmo0433</b>	2.63	0.39	<i>inlA</i> - InternalinA
<b>lmo0434</b>	2.52	0.48	<i>inlB</i> - InternalinB
<b>lmo0838</b>	15.92	5.69	<i>uhpT</i> - highly similar to hexose phosphate transport protein
<b>lmo1786</b>	9.43	2.64	<i>inlC</i> - Internalin C
<b>lmo0169</b>	0.22	0.33	similar to a glucose uptake protein
<b>lmo0176</b>	1.06	0.47	similar to a glucose uptake protein
<b>lmo0426</b>	4.24	3.80	similar to PTS fructose-specific enzyme IIA component
<b>lmo0427</b>	4.91	6.12	similar to PTS fructose-specific enzyme IIB component
<b>lmo0428</b>	6.86	6.49	similar to PTS fructose-specific enzyme IIC component
<b>lmo0738</b>	n.a.	68.82	similar to phosphotransferase system (PTS) beta-glucoside-specific enzyme IIABC component
<b>lmo2096</b>	6.49	32.26	similar to PTS system galactitol-specific enzyme IIC component
<b>lmo2097</b>	9.07	38.86	similar to PTS system galactitol-specific enzyme IIB component
<b>lmo2098</b>	9.24	34.50	similar to PTS system galactitol-specific enzyme IIA component
<b>lmo2665</b>	5.53	7.51	similar to PTS system galactitol-specific enzyme IIC component
<b>lmo2666</b>	5.62	6.61	similar to PTS system galactitol-specific enzyme IIB component
<b>lmo2667</b>	5.07	8.25	similar to PTS system galactitol-specific enzyme IIA



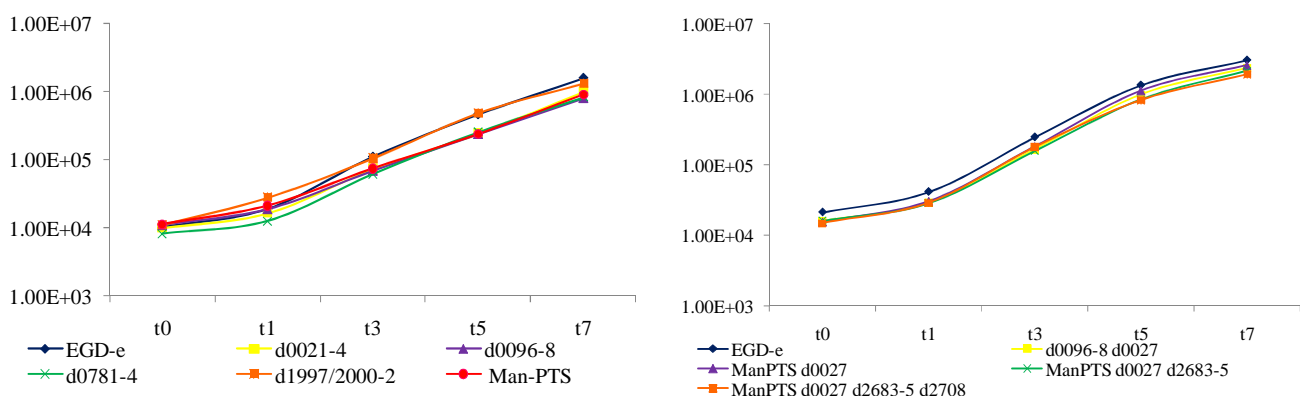
			component
<b>Imo2708</b>	303.96	n.a.	similar to PTS system, cellobiose-specific enzyme IIC
<b>Imo2772</b>	26.54	11.08	similar to beta-glucoside-specific enzyme IIABC

Imo2708 wurde wie zuvor schon beschrieben deletiert und die Deletionsmutante ManPTS d0027 d2683-5 d2708 weist wie in Abbildung 69 zu sehen ist ein stark vermindertes Wachstum in Glucose-haltigem MM auf. Das Genexpressionsmuster zeigt für diese Mutante eine im Vergleich zum Wildtyp starke Aktivierung von *prfA* und den PrfA abhängigen Genen, mit Ausnahme von *inlA* und *inlB*. Zudem ist wie in ManPTS d0027 d2683-5 PTS<sup>Fru</sup>(Imo0426-0428), PTS<sup>Gal</sup>(Imo2665-2667) und PTS<sup>Glc</sup>(Imo2772) angeschaltet. Anders ist, dass nun PTS<sup>Glc</sup>(Imo0738) stark exprimiert wird, sowie die sehr starke Expression von PTS<sup>Gal</sup>(Imo2096-2098). Die putativen Glucose Permeasen Imo0168 und Imo0176 scheinen die fehlenden PTS-Permeasen nicht auszugleichen, da sie gar nicht oder runterreguliert sind.

An diesem Punkt wurde die Deletion der PTS-Permeasen beendet, da die vorhandenen Daten deutlich die wichtigsten PTS-Permeasen für die Glucoseaufnahme in *L. monocytogenes* EGD-e aufzeigen. Es gelang jedoch nicht eine Mutante herzustellen, die keine Glucose mehr aufnimmt, da von den 29 vollständigen PTS und den verschiedenen PTS-Komponenten nach einer langen Lag-Phase immer neue PTS-Permeasen in ihrer Expression angeschaltet werden und - mit zwar geringerer Effizienz - Glucose transportieren können. Es wurden während der Arbeit (Daten nicht gezeigt) auch noch Deletionen von PTS<sup>Fru</sup>(Imo0426-0428), PTS<sup>Lac</sup>(Imo2762/2763) im Wildtyp und der ManPTS-Deletionsmutante hergestellt, aber diese Deletionen zeigten keinen Hinweis darauf, dass eine dieser PTS-Permeasen noch von besonderer Bedeutung für die Glucoseaufnahme sein könnte.

### D.3.3.8 Verhalten der PTS<sup>Man</sup>-Deletionsmutanten *in vivo*

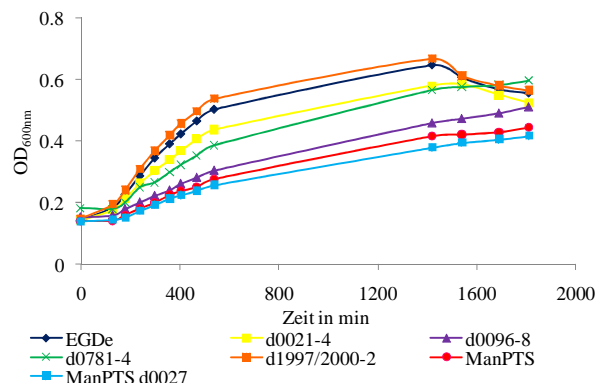
Die hergestellten Mutanten wurden auf ihr Verhalten *in vivo* untersucht. Zum einen um die Auswirkung der teilweise in den Mutanten erhöhten PrfA Aktivität zu sehen und zum anderen um zu sehen, ob Glucose eine wichtige Kohlenstoffquelle in eukaryotischen Zellen darstellt.



**Abbildung 70** J774-Makrophagen Infektionsverlauf über sieben Stunden mit EGD-e und den Deletionsmutanten d0021-4, d0096-8, d0781-4, d1997/2000-2, ManPTS, ManPTS d0027, ManPTS d0027 d2683-5, ManPTS d0027 d2683-5 d2708 und d0098-6 d0027

Der Infektionsverlauf des Wildtyps EGD-e und aller untersuchten Deletionsmutanten ist in Abbildung 70 dargestellt. Außer d1997/2000-2 zeigen alle Deletionsmutanten eine zum Wildtyp leicht verringerte Infektionsrate, wobei diese bei allen untersuchten Deletionsmutanten (d0021-4, d0096-8, d0781-4, ManPTS, ManPTS d0027, ManPTS d0027

d2683-5, ManPTS d0027 d2683-5 d2708 und d0098-6 d0027) etwa gleich ist. Offenbar hat das verringerte Wachstum, aber auch die erhöhte PrfA-Aktivität von zum Beispiel ManPTS d0027 in Glucose haltigem Minimalmedium keine Auswirkung auf die Infektion. Die Daten zeigen aber auch, dass offenbar alle Mutanten (abgesehen von d1997/2000-2) mit einer geringeren Bakterienzahl in die Zellen eindringen als der Wildtyp. Aus diesem Grund wurden d0021-4, d0096-8, d0781-4, d1997/2000-2, ManPTS und ManPTS d0027 auf ihr Wachstum in dem Zellkulturmedium RPMI untersucht (Abbildung 71). In RPMI befindet sich Glucose in einer Konzentration von 10 mM. In der Abbildung ist zu erkennen, dass das Wachstum der Mutanten in etwa dem Wachstum in Minimalmedium entspricht, das heißt d1997/2000-2 wächst wie der Wildtyp und ManPTS d0027 am langsamsten. Da alle Stämme in RPMI schlechter wachsen als in Minimalmedium, erklärt dieser Unterschied zwischen den



**Abbildung 71** Wachstum von EGD-e und den Deletionsmutanten d0021-4, d0096-8, d0781-4, d1997/2000-2, ManPTS und ManPTS d0027 in RPMI Medium.

Deletionsmutanten und dem Wildtyp EGD-e die verringerte Infektionsrate, da die Deletionsmutanten sich in den 45 min der Inkubation in RPMI schlechter vermehren als der Wildtyp. In der Zelle scheinen die Bakterien nicht vorrangig von Glucose zu leben, da die Deletionsmutanten mit einer ähnlichen Geschwindigkeit replizieren wie der Wildtyp.

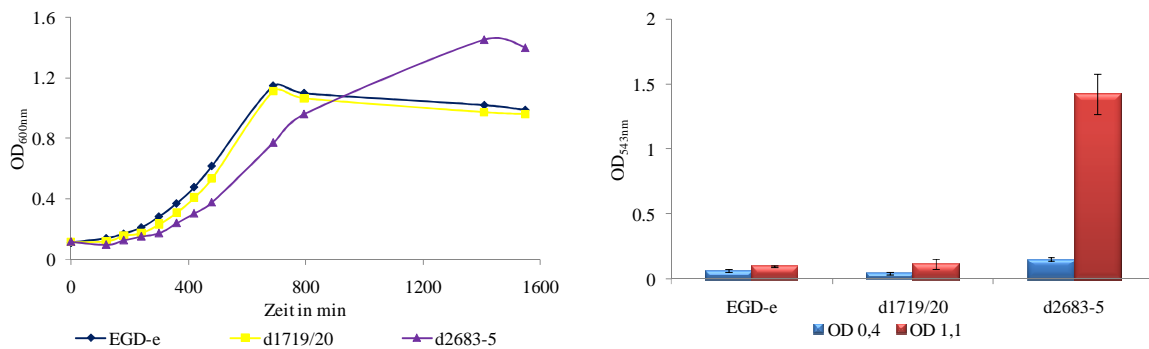
### D.3.4 Cellobiose-spezifische Phosphotransferasesysteme

Blast Untersuchungen mit den Sequenzdaten von <http://genolist.pasteur.fr/ListiList/>, die Ergebnisse von Barabote und Saier (2005) und die in D.3.1.4 erhaltenen Daten weisen darauf hin, dass  $\text{PTS}^{\text{Lac}}$ (Imo2683-2685) die wichtigste Cellobiose-spezifische PTS-Permease in *L. monocytogenes* EGD-e darstellt. Zudem wird das in der Sequenzdatenbank als Lichenanspezifisches PTS annotierte, aber nach Sequenzvergleichen Cellobiose-spezifische  $\text{PTS}^{\text{Lac}}$ (Imo1719/1720) in EGD-e stark exprimiert (D.3.1.4). Die anderen sechs PTS aus der Lactose/Cellobiose-Familie (siehe B.3.3 und Tabelle 18) waren in Expressionsuntersuchen nicht sehr stark exprimiert.

Unter anderem von Milenbachs *et al.* (1997), Brehm *et al.* (1997), Gilbreth *et al.* (2004) und auch in unserer Arbeitsgruppe konnte immer wieder gezeigt werden, dass Cellobiose im Medium einen stark reprimierenden Effekt auf die PrfA Aktivität hat. Daher wurden nun Deletionsmutanten von  $\text{PTS}^{\text{Lac}}$ (Imo2683-2685) und  $\text{PTS}^{\text{Lac}}$ (Imo1719/1720) in *L. monocytogenes* EGD-e hergestellt. Die Deletion wurde wie unter C.8.12 beschrieben durchgeführt und mittels PCR und Sequenzierung überprüft (Daten nicht gezeigt). Im Folgenden werden die Deletionsmutanten als d1719/20 und d2683-5 beschrieben.

### D.3.4.1 Wachstum und PrfA-Aktivität der PTS<sup>Lac</sup>-Deletionsmutanten in MM

Das Wachstum von d1719/20 und d2683-5 unterscheidet sich in BHI nicht von EGD-e (Daten nicht gezeigt), weshalb die Mutanten nun in Minimalmedium mit 5 mM Cellobiose untersucht wurden. Abbildung 72 zeigt das Wachstum der *L. monocytogenes* Deletionsmutanten d1719/20 und d2683-5 und des Wildtyps EGD-e in MM mit 5 mM Cellobiose. EGD-e und d1719/20 replizieren mit einer Generationszeit von etwa 150 min. Die d2683-5



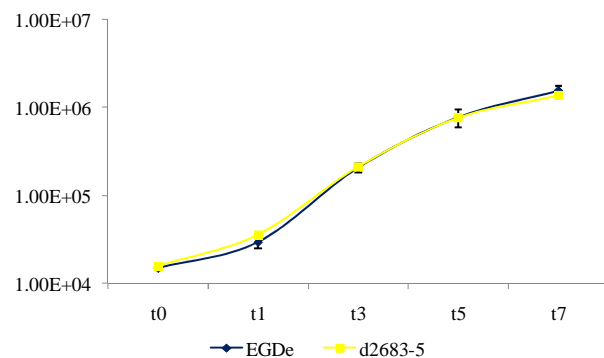
**Abbildung 72** Wachstum und Hämolyse mit bei OD<sub>600nm</sub> = 0,4 und 1,1 abgenommenen Proben von EGD-e und den Deletionsmutanten d1719/20 und d2683-5 in MM mit 5 mM Cellobiose

Deletionsmutante hat eine Generationszeit von rund 180 min und erreicht die stationäre Phase bei einer höheren OD als der Wildtyp, ähnlich den Mannose Deletionsmutanten (siehe D.3.3.1). In Minimalmedium mit 10 mM Glucose zeigt sich zwischen dem Wildtyp und den Deletionsmutanten kein Wachstumsunterschied und keine Veränderung in der hämolytischen Aktivität (Daten nicht gezeigt). Die hämolytische Aktivität von EGD-e nach Wachstum in MM mit 5 mM Cellobiose ist, wie schon zuvor gezeigt, sehr gering (Abbildung 72) und wird durch die Deletion von PTS<sup>Lac</sup> (Imo1719/1720) kaum beeinflusst. Die Deletion von PTS<sup>Lac</sup> (Imo2683-2685) hat dagegen eine starke Auswirkung auf die hämolytische Aktivität von *L. monocytogenes* EGD-e. In der frühen logarithmischen Phase bei einer OD<sub>600nm</sub> von 0,4 hat d2683-5 eine etwa dreifach stärkere hämolytische Aktivität und in der beginnenden stationären Phase (OD<sub>600nm</sub> von 1,1) ist PrfA in d2683-5 etwa 15-mal aktiver als im Wildtyp.

### D.3.4.2 *In vivo* Untersuchung von d2683-5

Die auf Grund des geringeren Wachstums in MM mit 5 mM Cellobiose offenbar in ihrer Cellobioseaufnahme gestörte Mutante d2683-5 wurde *in vivo* in J774 Makrophagen untersucht. Der Versuch soll verdeutlichen, dass Cellobiose in der Wirtszelle keine Rolle für die Infektion von *L. monocytogenes* spielt.

Abbildung 73 zeigt den Infektionsverlauf von EGD-e und der Deletionsmutante d2683-5 über sieben Stunden. Beide Stämme invadieren gleich gut in die Makrophagen und replizieren in diesen auch mit derselben Effizienz. Dies war zu erwarten, da d2683-5 in Glucose-haltigem



**Abbildung 73** J774 Makrophagen Infektionsverlauf über sieben Stunden mit EGD-e und d2683-5.

MM nicht schlechter wächst als der Wildtyp und es zudem unwahrscheinlich ist, dass Cellobiose in der eukaryotischen Zelle eine wichtige Kohlenstoffquelle darstellt.

### D.3.4.3 Expressionsmuster der PTS<sup>Lac</sup>-Deletionsmutanten

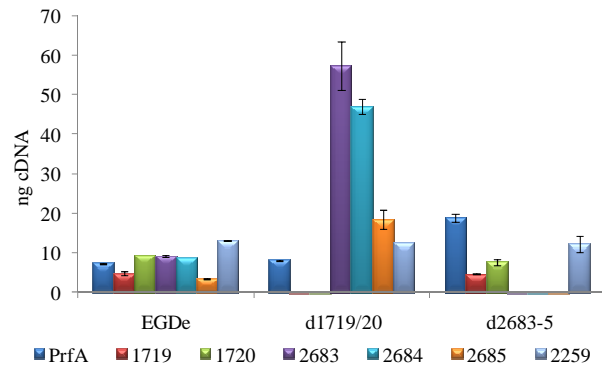
In Real Time Analysen wurde die Expressionsstärke von *prfA* und PTS-Genen (codiert von lmo1719, lmo1720, lmo2683, lmo2684, lmo2685 und lmo2259) in den zwei PTS<sup>Lac</sup>-Deletionsmutanten und dem Wildtyp EGD-e nach Wachstum in glucosehaltigem MM miteinander verglichen (Abbildung 74). Im Wildtyp sind alle Gene, wie schon in D.3.1.4 zu sehen war, etwa gleich stark exprimiert, wobei lmo2685 wieder am schwächsten exprimiert wird. In der d1719/20-Deletionsmutante steigt die Transkriptmenge von lmo2683, lmo2684 und lmo2685 im Vergleich zum Wildtyp bei Wachstum in MM mit 50 mM Glucose 5-6-fach an. Im Gegensatz dazu zeigt die d2683-5-Mutante im Vergleich zum Wildtyp keine Veränderung in den untersuchten Cellobiose-PTS-Genen. Jedoch *prfA* wird mehr als doppelt so stark exprimiert wie im Wildtyp.

Beim Wachstum in MM mit 5 mM Cellobiose zeigte sich nur d2683-5 auffällig, und daher wurde in dieser Mutante die Expression von *prfA*, der PrfA-abhängigen Virulenzgenen und der PTS-Genen mittels PTS-Microarrays bestimmt.

Tabelle 12 und Tabelle 22 im Anhang zeigen die erhaltenen Daten. Im Vergleich zu EGD-e ist in d2683-5 die Expression von *prfA* und den meisten PrfA abhängigen Virulenzgenen zweifach hochreguliert. *uhpT* ist sogar vierfach angeschaltet, *inlA* und *inlC* dagegen gar nicht. Von den PTS-Genen fällt besonders das über 60-fach hochregulierte lmo0027 auf und das gleichzeitig etwa fünffach hochregulierte PTS<sup>Man</sup>(lmo0096-0098). Die Cellobiose-spezifische PTS-Permease codiert von lmo1719/1720 ist dagegen herunterreguliert.

**Tabelle 12** Vergleichende Expressionanalyse der Gene codierend für *prfA*, die PrfA-abhängigen Virulenzgenen und einiger PTS-Genen in *L. monocytogenes* EGD-e d2683-5 im Vergleich zum Wildtyp EGD-e nach Wachstum in MM mit 5 mM Cellobiose bis zu einer OD<sub>600nm</sub> von 0,6.

Genname	d2683-5/ EGD-e	Annotation nach <a href="http://genolist.pasteur.fr/ListiList/">http://genolist.pasteur.fr/ListiList/</a>
<b>lmo0200</b>	2.12	<i>prfA</i> - listeriolysin positive regulatory protein
<b>lmo0201</b>	1.94	<i>plcA</i> - phosphatidylinositol-specific phospholipase c
<b>lmo0202</b>	1.74	<i>hly</i> - listeriolysin O precursor
<b>lmo0203</b>	1.66	<i>mpl</i> - Zinc metalloproteinase precursor
<b>lmo0204</b>	1.82	<i>actA</i> - actin-assembly inducing protein precursor
<b>lmo0205</b>	2.38	<i>plcB</i> - phospholipase C
<b>lmo0433</b>	1.03	<i>inlA</i> - InternalinA
<b>lmo0434</b>	1.73	<i>inlB</i> - InternalinB
<b>lmo0838</b>	4.17	<i>uhpT</i> - highly similar to hexose phosphate transport protein

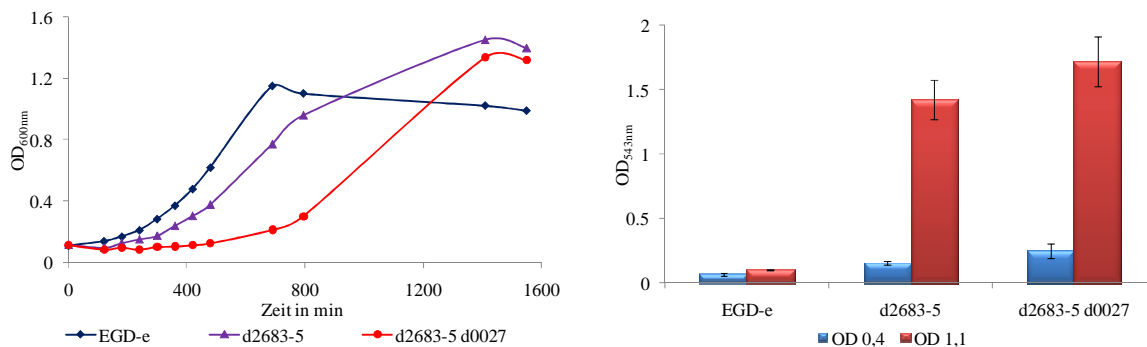


**Abbildung 74** Expressionsstärke der Gene codierend für PrfA und putative PTS<sup>Lac</sup>. Angegeben ist die gebildete Transkriptmenge in ng cDNA in *L. monocytogenes* EGD-e und den Deletionsmutanten d1719/20 und d2683-5 nach Wachstum in MM mit 50 mM Glucose bis zu einer OD<sub>600nm</sub> von 0,8.

Genname	d2683-5/ EGD-e	Annotation nach <a href="http://genolist.pasteur.fr/ListiList/">http://genolist.pasteur.fr/ListiList/</a>
lmo1786	1.37	<i>inlC</i> - Internalin C
lmo0027	61.40	similar to PTS system, beta-glucosides specific enzyme IIABC
lmo0096	5.14	similar to PTS system mannose-specific, factor IIAB
lmo0097	5.87	similar to PTS system mannose-specific, factor IIC
lmo0098	7.23	similar to PTS system mannose-specific, factor IID
lmo1719	0.22	similar to phosphotransferase system (PTS) lichenan-specific enzyme IIA component
lmo1720	0.13	similar to phosphotransferase system (PTS) lichenan-specific enzyme IIB component
lmo2708	2.04	similar to PTS system, cellobiose-specific enzyme IIC

#### D.3.4.4 Verhalten der Deletionsmutante d2683-5 d0027

Nach den in D.3.4.3 erhaltenen Expressionsdaten von d2683-5 scheint in MM mit 5 mM Cellobiose das PTS<sup>Glc</sup>(lmo0027) nach PTS<sup>Lac</sup>(lmo2683-5) die wichtigste Cellobiose-aufnehmende PTS-Permease zu sein. Um dies zu überprüfen wurde eine Doppeldeletionsmutante von PTS<sup>Lac</sup>(lmo2683-5) und PTS<sup>Glc</sup>(lmo0027) hergestellt, im Folgenden als d2683-5 d0027 bezeichnet. Abbildung 75 zeigt das Wachstum von d2683-5, d2683-5 d0027 und EGD-e in MM mit 5 mM Glucose, sowie die hämolytische Aktivität der

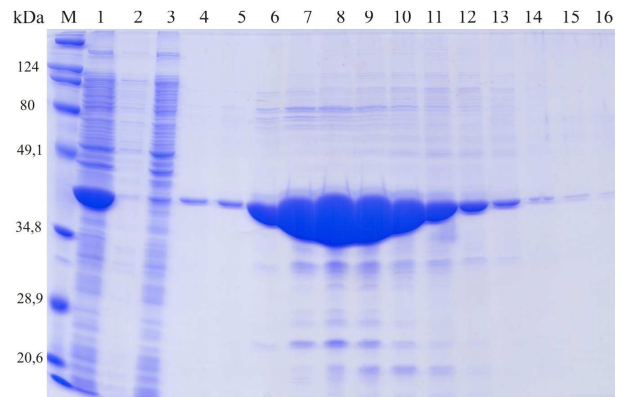


**Abbildung 75** Wachstum und Hämolyse mit bei OD<sub>600nm</sub> von 0,4 und 1,1 abgenommenen Proben von EGD-e und den Deletionsmutanten d2683-5 und d2683-5 d0027 in MM mit 5 mM Cellobiose

Stämme bei OD<sub>600nm</sub> von 0,4 und 1,1, also in der logarithmischen und frühen stationären Phase. Die Generationszeit beim Wachstum in MM mit 5 mM Cellobiose verringert sich bei d2683-5 d0027 im Vergleich zu d2683-5 um 70 min auf 250 min. Die hämolytische Aktivität ist in der Doppelmutante etwas stärker als in d2683-5, vor allem in der frühen Wachstumsphase.

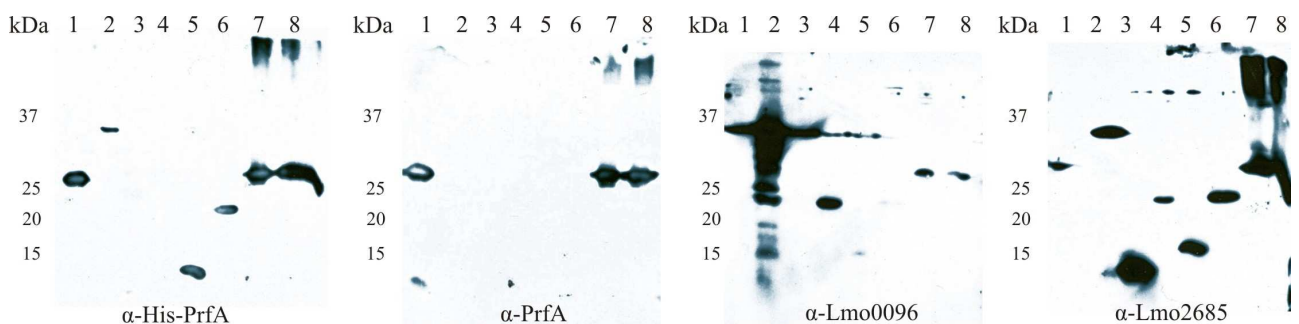
## D.4 Interaktion verschiedener EII Proteine mit PrfA

Die in D.3.3 und D.3.4 gewonnenen Daten lassen eine Interaktion zwischen PrfA und den EII Proteinen vermuten, welche die Aktivität von PrfA reguliert. Um eine direkte Interaktion zu testen, wurden drei EII Proteine anhand der Daten der Deletionsmutanten und putativer PrfA Bindungsstellen ausgewählt, kloniert und isoliert. EIIAB<sup>Man</sup>(Lmo0096) hat in seiner Aminosäuresequenz des EIIB einen möglicherweise phosphorylierbaren Histidinrest (His168), der an PrfA binden könnte. Bei EIIA<sup>Man</sup>(Lmo0783) könnte His14 eine Bindungsstelle darstellen und His75 von EIIA<sup>Cel</sup>(Lmo2685). Die Proteine wurden für die Aufreinigung an HisTRAP<sup>TM</sup>-HP Proteinsäulchen mit einem HisTag kloniert, welcher auf Grund der Lage der putativen Bindungsstelle für Lmo0096 und Lmo2685 N-Terminal und für Lmo0783 C-Terminal kloniert wurde. Abbildung 76 zeigt repräsentativ ein Coomassie-gefärbtes SDS-Gel mit den Proben der Aufreinigung von Lmo0096. Von den gesammelten Fraktionen wurden die in den Spuren 7-10 aufgetragenen vereint und dialysiert. Mit den drei EII Proteinen und den von S. Müller-Altrock aufgereinigten EIIA<sup>Glc</sup>(Lmo1017), EIIA<sup>Cel</sup>(Lmo2259), PrfA<sub>nt</sub>, His-PrfA und His-PrfA\* wurden nun verschiedene Studien durchgeführt.



**Abbildung 76** Coomassiegefärbtes SDS-Gel der Aufreinigung des Lmo0096 Proteins, M Marker, Spur 1 unaufgereinigte Probe, Spur 2 und 3 Durchfluss; Spuren 4-16 Proteinfraktionen gesammelt an der ÄKTaprime.

Mit allen isolierten Proteinen wurde der vorhandene  $\alpha$ -His-PrfA Antikörper auf seine Spezifität getestet (Abbildung 77). Da der Antikörper außer den drei PrfA-Proteinen (His-PrfA, His-PrfA\* und PrfA<sub>nt</sub>) auch noch Lmo0096, Lmo2269 und Lmo1017 sehr gut, sowie



**Abbildung 77** Test der Antikörper  $\alpha$ -His-PrfA,  $\alpha$ -PrfA,  $\alpha$ -Lmo0096 und  $\alpha$ -Lmo2685 auf ihre Proteinspezifität mit PrfA<sub>nt</sub> (Spur1, 27 kDa), Lmo0096 (Spur 2, 35 kDa), Lmo2685 (Spur3, 11 kDa), Lmo0783 (Spur4, 18 kDa), Lmo2259 (Spur5, 13.5 kDa), Lmo1017 (Spur 6, 17.6 kDa), His-PrfA (Spur7, 27 kDa) und His-PrfA\* (Spur 8, 27 kDa).

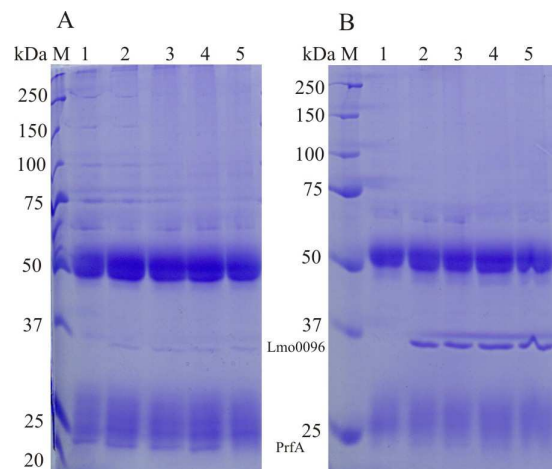
Lmo0783 und Lmo2685 sehr schwach erkennt, war er für verschiedene Interaktionsversuche ungeeignet. Daher wurden für diese Arbeit noch Antikörper gegen PrfA, welches ohne die His<sub>6</sub>-Markierung aufgereinigt wurde, und gegen Lmo0096 und Lmo2685 von der Firma SeqLab hergestellt. Diese wurden dann auch wieder auf ihre Proteinspezifität hin getestet (Abbildung 77). Der Antikörper  $\alpha$ -PrfA erkennt sehr spezifisch die PrfA<sub>nt</sub>, His-PrfA sowie His-PrfA\* und nur ganz schwach Lmo0096. Der gegen das Protein Lmo0096 hergestellte Antikörper reagiert hoch spezifisch mit Lmo0096 und auch gut mit dem homologen Protein Lmo0783. Er erkennt auch schwach die His<sub>6</sub>-markierten His-PrfA und His-PrfA\* sowie

Lmo2259 und Lmo1017. Der  $\alpha$ -Lmo2685 Antikörper ist sehr unspezifisch und erkennt alle acht getesteten Proteine.

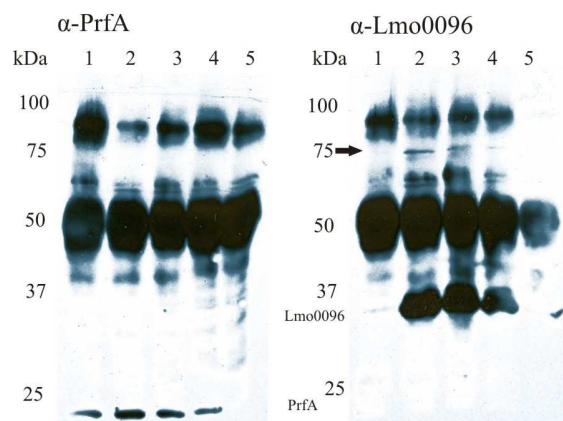
#### D.4.1 Immunpräzipitation

Für die Immunpräzipitation wurden die am selektivsten detektierenden Antikörper  $\alpha$ -PrfA und  $\alpha$ -Lmo0096 für die Bindung an SepharoseA ausgewählt. Im Coomassiegel (Abbildung 78) ist zu erkennen, dass der Antikörper gegen PrfA das Protein Lmo0096 im Vergleich zu PrfA sehr gut detektiert. Er ist daher ungeeignet, Interaktionen zwischen PrfA und Lmo0096 nachzuweisen. Beim Antikörper gegen Lmo0096 konnte keine Bindung von PrfA direkt an den an die Sepharose gekoppelten Antikörper nachgewiesen werden, jedoch eine sehr starke Bindung von Lmo0096. Daher eignet sich  $\alpha$ -Lmo0096 besser für Immunpräzipitationsversuche.

Für die in Abbildung 79 gezeigte Immunpräzipitation wurde  $\alpha$ -Lmo0096 an SepharoseA gekoppelt und mit PrfA (Spur 1), PrfA und Lmo0096 (Spuren 2-4) in gleichem molaren Verhältnis und Lmo0096 (Spur 5) inkubiert. Der Gellauf erfolgte für eine bessere Auftrennung in einem 10%-igen SDS-Gel. Nach dem Blotten wurden die Membranen mit  $\alpha$ -PrfA und  $\alpha$ -Lmo0096 Antikörper behandelt und entwickelt. Mit dem  $\alpha$ -PrfA Antikörper lässt sich eindeutig PrfA in den Spuren 1-4 detektieren. Da in Spur 1 nur PrfA gegeben wurde scheint das Protein direkt an den  $\alpha$ -Lmo0096 Antikörper binden zu können, wobei in Spur zwei und drei eine größere Menge an PrfA gebunden ist. Lmo0096 kann mit dem  $\alpha$ -PrfA Antikörper nicht detektiert werden. Mit dem Antikörper gegen Lmo0096 kann man sehr stark das gut an den Antikörper gekoppelte Lmo0096 detektieren. PrfA ist ganz schwach bei einem lange exponierten Röntgenfilm detektierbar. Zusätzlich befindet sich bei beiden Bildern (mit  $\alpha$ -PrfA nur sehr schlecht sichtbar) knapp unter 75 kDa eine Bande in den Spuren 2-4. Da diese Bande nur in den Spuren detektierbar ist, in denen beide Proteine inkubiert wurden könnte sie ein Produkt der Reaktion von PrfA mit Lmo0096 sein. Die Methode der Immunpräzipitation ist trotz dieses Ergebnisses aber nur bedingt geeignet für einen Interaktionsnachweis, da der an die Sepharose gekoppelte Antikörper mit auf das SDS-Gel aufgetragen wird und bei der ECL-Detektion sehr viele Nebenbanden erzeugt, welche wichtige Proteininteraktionsbanden überdecken können.



**Abbildung 78** Coomassie-Färbung der Immunpräzipitation A:  $\alpha$ -PrfA, B:  $\alpha$ -Lmo0096 nach Lauf in einem 10%-igen SDS-Gel; Spur 1: 5  $\mu$ g PrfA, Spuren 2-4: 5  $\mu$ g PrfA und 6,4  $\mu$ g Lmo0096, Spur 5: 6,4  $\mu$ g Lmo0096.



**Abbildung 79** Western-Blot der Immunpräzipitation mit  $\alpha$ -Lmo0096 nach Lauf in einem 10%-igen SDS-Gel; Antikörper nach dem Blotten:  $\alpha$ -PrfA und  $\alpha$ -Lmo0096; Spur 1: 5  $\mu$ g PrfA, Spuren 2-4: 5  $\mu$ g PrfA und 6,4  $\mu$ g Lmo0096, Spur 5: 6,4  $\mu$ g Lmo0096.

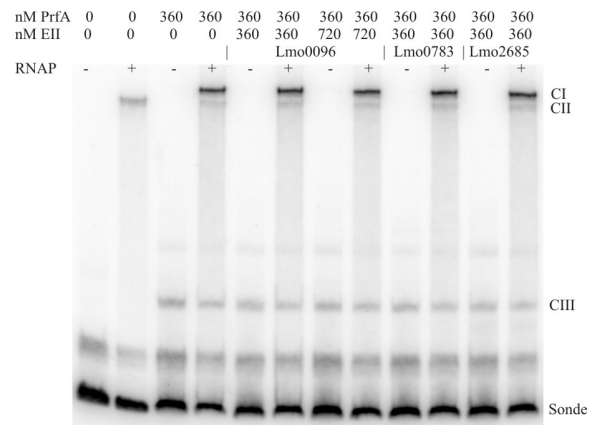
## D.4.2 EMSA

Nachdem die Immunpräzipitation (D.4.1) eine schwache Interaktion von PrfA und den EII Proteinen vermuten lässt und die Untersuchungen an den Deletionsmutanten (D.3.3, D.3.4) eine Auswirkung der Deletion bestimmter PTS-Permeasen auf die PrfA-Aktivität gezeigt hat, wurde nun mit Hilfe von Electromobility Shift Experimenten (EMSA) untersucht, ob die EII-Proteine eine Auswirkung auf die DNA-Bindungseigenschaften von PrfA haben. Hierfür wurden pro Ansatz 360 nM PrfA und 360 nM Lmo0096, Lmo0783, Lmo2685, sowie 720 nM Lmo0096 eingesetzt. Von der *hly*-Promotor-DNA wurden wie unter D.1 angegeben 5 nM, sowie 1,5 nM RNAP eingesetzt. Der *hly*-Promotor von *L. monocytogenes* wurde verwendet, da im Hämolysetest die Deletion der Gene für die PTS-Proteine eine Erhöhung der PrfA-Aktivität zeigten.

Abbildung 80 zeigt das Ergebnis der Bindungsuntersuchungen. Die eingesetzten listeriellen Proteine zeigen keine Auswirkung auf die DNA-Bindungseigenschaften von PrfA am Promotor für das *hly*-Gen, da sich nach Zugabe von Lmo0096, Lmo0783 und Lmo2685 die Expressionsstärke der CI-, CII- und CIII-Komplexe nicht veränderte. Bei Verwendung des *actA*-Promotors (Daten nicht gezeigt) konnte ebenfalls keine Auswirkung der EII-Proteine festgestellt werden.

## D.4.3 *In vitro* Transkription

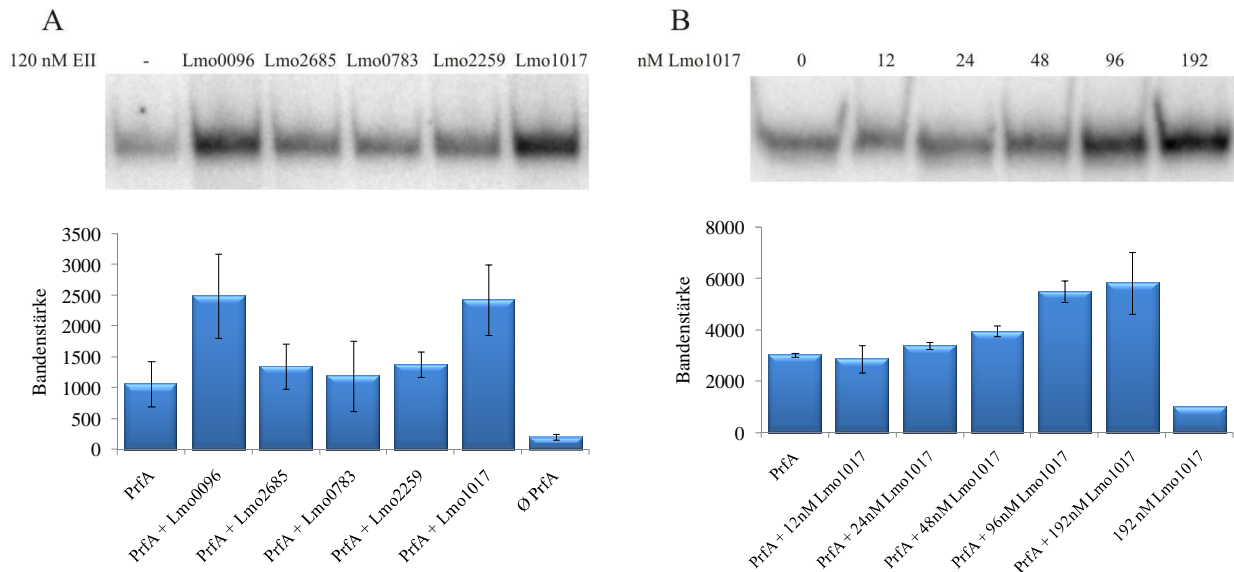
Das DNA-Bindungsexperiment unter D.4.2 konnte keine Auswirkung der untersuchten EII-Proteine auf die DNA-Bindungseigenschaften am *hly*-Promotor von *L. monocytogenes* zeigen. Es ist aber möglich, dass die EII-Proteine die Transkription beeinflussen, indem sie zum Beispiel so an PrfA binden, dass die RNAP nicht oder leichter starten kann. Um dies zu untersuchen wurden *in vitro* Transkriptionsstudien mit PrfA und den vorhandenen EII Proteinen am *uhpT*-Promotor von *L. monocytogenes* durchgeführt. Dieser Promotor wurde ausgewählt, da er in der Vergangenheit gut reproduzierbare Daten lieferte und in den Microarraydaten der PrfA-auffälligen Deletionsmutanten (D.3.3, D.3.4) *uhpT* meist sehr stark hochreguliert wurde. Abbildung 81 A zeigt die Auswirkung von je 120 nM Lmo0096, Lmo2685, Lmo0783, Lmo2259 und Lmo1017 zugegeben zu 12 nM PrfA. Die Abbildung der *in vitro* Transkription ist exemplarisch für mehrere durchgeführte Experimente und die Grafik gibt die Expressionsstärke der Banden aus mehreren Experimenten wieder. Die Zugabe der 10fachen molaren Menge an Lmo0096 und Lmo1017 führt zu einer signifikanten Erhöhung der Transkriptmenge von *uhpT*. Der Student's-T-Test ergab eine Signifikanz zwischen 3 und 4% für beide Proteine an. Die anderen drei Proteine zeigen in den meisten Versuchen keine Auswirkung auf die Transkription. In Abbildung 81 B ist die Konzentrationsabhängigkeit von



**Abbildung 80** Bestimmung der Bindungsaffinität von PrfA mit und ohne Lmo0096, Lmo0783 und Lmo2685 an den PrfA-abhängigen *hly*-Promotor von *L. monocytogenes* mittels Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA). Der EMSA wurde mit den genannten Proteinen, 5 nM Promotor DNA und 1,5 nM RNAP durchgeführt. CI (Komplex aus DNA, RNAP und PrfA), CII (Komplex aus DNA und RNAP) und CIII (Komplex aus DNA und PrfA) wurden angezeigt.



Lmo1017 bei der Aktivierung der *in vitro* Transkription mit PrfA am *uhpT*-Promotor gezeigt. Eine deutliche Aktivierung der Transkription lässt sich erst ab der 8-fachen molaren Menge an Lmo1017 im Vergleich zu PrfA erkennen. Lmo1017 und die anderen EII-Proteine (Daten nicht gezeigt) initiieren die Transkription an *uhpT* ohne PrfA nicht.

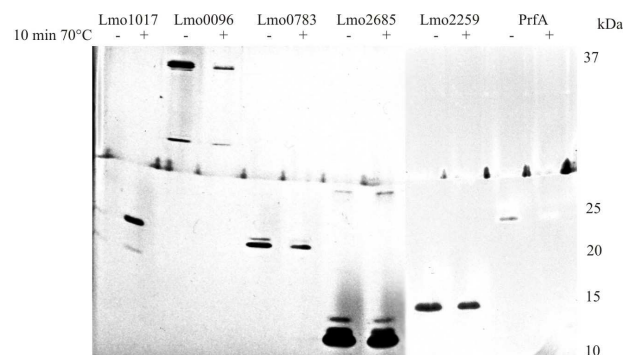


**Abbildung 81** A: Bestimmung der Fähigkeit von 12 nM PrfA mit und ohne 120 nM Lmo0096, Lmo2685, Lmo0783, Lmo2259 oder Lmo1017 am PrfA-abhängigen *uhpT*-Promotor von *L. monocytogenes* die Transkription zu initiieren, B: Konzentrationsabhängigkeit von Lmo1017 bei der Transkriptionsaktivierung. Der Versuch wurde mit 16 nM Promotor DNA und 1,5 nM RNAP durchgeführt. CI (Komplex aus DNA, RNAP und PrfA), CII (Komplex aus DNA und RNAP) und CIII (Komplex aus DNA und PrfA) wurden angegeben. Die Bandenstärke wurde mit ImageMaster<sup>TM</sup> Total Lab (Amersham) quantifiziert und in den Grafiken unter der Abbildung angegeben.

Die Ergebnisse in Abbildung 81 zeigen einen deutlichen Einfluss von Lmo0096 und Lmo1017 auf die Transkriptionsinitiierung am PrfA abhängigen Promotor *uhpT* zusammen mit PrfA. Dies konnte mehrfach gezeigt werden, jedoch gab es auch mehrmals Ergebnisse, die dies nicht zeigten. Das gleiche konnte für den *hly*-Promotor festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

#### D.4.4 Phosphorylierungsstatus der aufgereinigten EII-Proteine

Die uneinheitlichen Ergebnisse der *in vitro* Transkriptionsversuche (D.4.3) warfen die Frage auf, ob der Phosphorylierungsstatus der gereinigten EII Proteine eine Ursache für die oft starken Schwankungen darstellt. Da die Proteine in *E. coli* überexprimiert werden und im Falle von Lmo0096 und Lmo1017 hoch homolog zu den *E. coli* Proteinen ManX und PtsG sind, besteht die Möglichkeit, dass die Proteine teilweise phosphoryliert aufgereinigt werden. So würde man mit einem Gemisch aus phosphoryliertem und

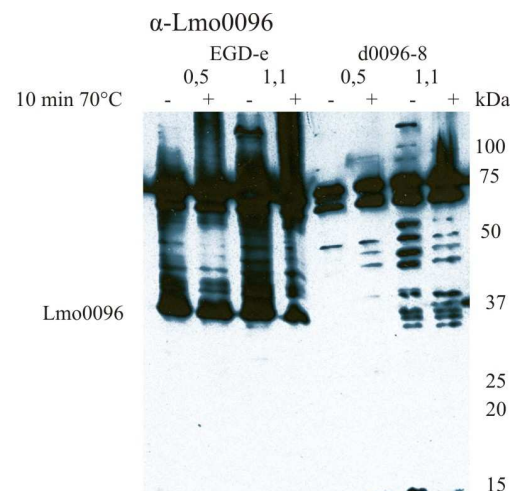


**Abbildung 82** Silbergel des Tests des Proteinphosphorylierungsstatus von Lmo1017, Lmo0096, Lmo0783, Lmo2685, Lmo2259 und PrfA nach Lauf in einem 15%-igen SDS-Gel mit nativem Probenpuffer. Je eine der zwei Proben wurde 10 min bei 70°C aufgekocht.

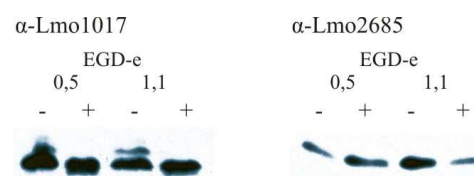
unphosphoryliertem EII arbeiten, was die Schwankungen in den *in vitro* Transkriptionen erklären würde.

Abbildung 82 zeigt ein SDS-Gel nach hoch empfindlicher Silberfärbung mit dem Phosphorylierungsstatus der aus *E. coli* gereinigten Proteine Lmo1017, Lmo0096, Lmo0783, Lmo2685, Lmo2259 und PrfA. Die Proben wurden nativ behandelt und jeweils die zweite Probe für 10 min bei 70°C erhitzt. Diese Hitzebehandlung zerstört Histidinphosphorylierungen. Lmo1017 ist sehr weit am Rand des Gels aufgetragen und daher schlecht detektierbar, aber Daten von S. Mertins (persönliche Mitteilung) zeigen, dass das aufgereinigte Lmo1017 teilweise Histidin-phosphoryliert vorliegt und diese Phosphorylierung durch Erhitzen verliert. Dies erklärt die dickere Bande beim erhitzten Lmo1017, da jetzt mehr unphosphoryliertes Lmo1017 vorliegt. Bei Lmo0096 ist eine kleine schneller laufende Bande erkennbar, die durch das Erhitzen wieder verschwindet, bei Lmo0783 ist es eine langsamer laufende Bande. Lmo2685 liegt zwar in mehreren Banden vor, deren Stärke ändert sich jedoch durch das Erhitzen nicht. Für Lmo2259 ist nur eine Bande detektierbar, deren Stärke sich nach 10 min bei 70°C nicht verändert. PrfA wird durch das Erhitzen weitgehend zerstört und ist nicht mehr im Gel zu erkennen. Scheinbar werden also die zu *E. coli* hoch homologen listeriellen Proteine Lmo1017 (EIIA<sup>Glc</sup>), Lmo0096 (ManX) und Lmo0783 (ManX) von *E. coli* bei der Überexpression teilweise phosphoryliert und liegen daher in einem Gemisch aus phosphoryliertem und unphosphoryliertem Protein vor.

Der Phosphorylierungsstatus von Lmo0096 wurde noch *in vivo* mit nativ aufgereinigten Proben von *L. monocytogenes* EGD-e und d0096-8 gezeigt. Dafür wurden beide Stämme bei OD<sub>600nm</sub> von 0,5 (logarithmische Phase) und 1,1 (Eintritt in die stationäre Phase) aus MM mit 10 mM Glucose isoliert. Es wurden dann je zwei Proben in nativem Probenpuffer auf ein 10%iges SDS-Gel aufgetragen, wobei die zweite Probe 10 min bei 70°C behandelt wurde um mögliche Histidin-Phosphorylierungen zu zerstören. Das SDS-Gel wurde geblottet um mit α-Lmo0096 Antikörper die Lmo0096 Banden zu detektieren. Abbildung 83 zeigt das Ergebnis des Blots. Der α-Lmo0096 Blot zeigt deutlich die starke Expression von Lmo0096 im Wildtyp in beiden Wachstumsphasen. Die Bande ist so stark, dass eventuell phosphorylierte Nebenbanden nicht erkennbar sind und durch Erhitzen verändert sich die Bandenstärke nicht. Die Deletion von Lmo0096 in d0096-8 ist erkennbar, da keine Lmo0096 Banden detektierbar sind. *In vivo* konnte der Phosphorylierungszustand von Lmo0096 also nicht eindeutig bestimmt werden. Im Blot



**Abbildung 83** Western Blot α-Lmo0096 mit nativen Zellextrakten von EGD-e und d0096-8 gewonnen nach Wachstum in MM mit 10 mM Glucose bis OD<sub>600nm</sub> von 0,5 und 1,1. Lauf von 5 µg Protein in einem 12%-igen SDS-Gel mit nativem Probenpuffer. Je eine der zwei Proben wurde 10 min bei 70°C aufgeköcht.



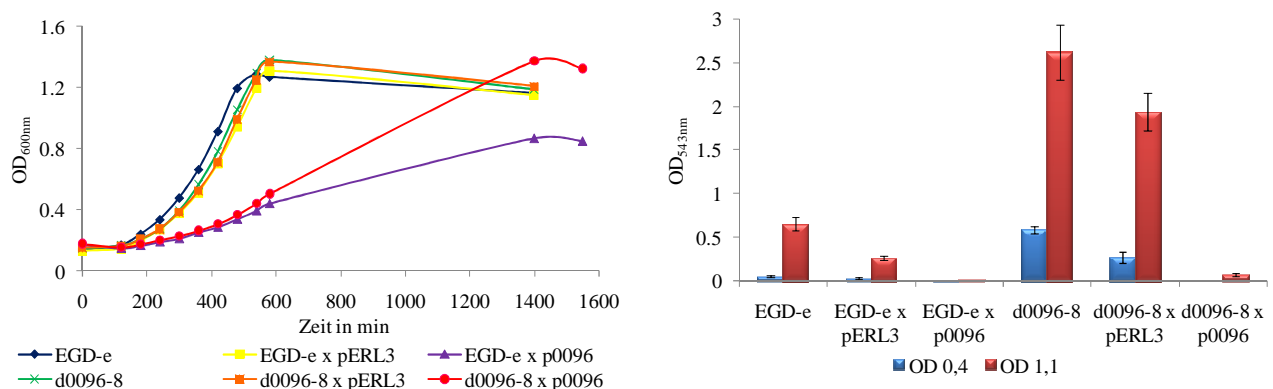
**Abbildung 84** Western Blots α-Lmo1017 und α-Lmo2685 mit nativen Zellextrakten von EGD-e gewonnen nach Wachstum in MM mit 10 mM Glucose bzw. 5 mM Cellobiose bis OD<sub>600nm</sub> von 0,5 und 1,1. Lauf von 5 µg Protein in einem 12%-igen SDS-Gel mit nativem Probenpuffer. Je eine der zwei Proben wurde 10 min bei 70°C aufgeköcht.

taucht zudem bei etwa 14 kDa in der d0096-8 Mutante eine zusätzliche Bande auf, die im Wildtyp nur sehr schwach ist. Möglicherweise wird hier vom Antikörper das in d0096-8 stark exprimierte EIIA von Lmo0027 erkannt.

Derselbe Versuch wurde nun auch noch mit EGD-e und d1017 Proben aus MM mit 10 mM Glucose und mit EGD-e und d2683-5 aus MM mit 5 mM Cellobiose durchgeführt. Für Lmo2685 konnte wie in Abbildung 84 zu sehen ist wieder kein Phosphorylierungsstatus gezeigt werden, aber für Lmo1017. Nach 10 minütigem Aufkochen phosphoryliert vor. bei 70°C verschwindet die obere Bande von Lmo1017 und das Protein liegt dann nicht mehr phosphoryliert vor. Interessanterweise sieht die *in vivo* Phosphorylierungsbande von Lmo1017 anders aus als die der mit den aufgereinigten Proteinen (Abbildung 82). Die Abbildung für die Proben der Deletionsmutanten d1017 und d2683-5 wurde nicht gezeigt, da keine neue Nebenbande auftaucht und die jeweilige Proteinbande aufgrund der Deletion auch nicht erscheint.

#### D.4.5 Lmo0096 Überexpression in *L. monocytogenes*

Da die bisherigen Versuche auf eine Proteininteraktion zwischen PrfA und verschiedenen EIIs (vor allem Lmo0096) hinweisen, wurde nun im Wildtyp *L. monocytogenes* EGD-e und in der Deletionsmutante d0096-8 das Lmo0096 Protein überexprimiert. Das entsprechende Gen wurde unter Kontrolle seines eigenen Promotors in das High-copy Plasmid pERL3 kloniert. Der Promotor von Lmo0096 wurde ausgewählt, da die Expressionsdaten (D.3.3) für Lmo0096 gezeigt haben, dass Lmo0096 im Wildtyp immer stark exprimiert wird. Zusätzlich wurde jeweils ein Kontrollstamm hergestellt, der das pERL3 Plasmid ohne Insert trägt.



**Abbildung 85** Wachstum und Hämolyse mit bei OD<sub>600nm</sub> von 0,4 und 1,1 abgenommenen Proben von EGD-e, der Deletionsmutante d0096-8 und den Lmo0096 überexprimierenden Stämmen EGD-e x pERL0096 und d0096-8 x pERL0096 in MM mit 10 mM Glucose.

Abbildung 85 zeigt die Wachstumskurve in MM mit 10 mM Glucose und den Hämolysetest mit bei OD<sub>600nm</sub> von 0,4 und 1,1 abgenommenen Proben von EGD-e, EGD-e x pERL3, EGD-e x pERL0096, d0096-8, d0096-8 x pERL3 und d0096-8 x pERL0096. Die Generationszeit von EGD-e und d0096-8 liegt um 150 min, wobei d0096-8 eine deutlich längere Lag-Phase hat. Die Überexpression von Lmo0096 erfolgt unter Erythromycinzugabe, da die Listerien sonst das Plasmid verlieren würden. Die Erythromycinzugabe bei den Stämmen EGD-e x pERL3 und d0096-8 x pERL3 verlängert die Generationszeit im Vergleich zu EGD-e und d0096-8 jeweils um 10 min. EGD-e x pERL0096 mit 370 min und d0096-8 x pERL0096 mit 340 min weisen deutlich längere Generationszeiten auf als die Stämme ohne die Überexpression von Lmo0096.

Im Hämolysetest ist durch die Erythromycin induzierte Expression von pERL3 im Wildtyp und d0096-8 in beiden Wachstumsphasen eine leichte Reduktion der PrfA-Aktivität festzustellen. Die Überproduktion von Lmo0096 im Wildtyp führt sowohl in der logarithmischen als auch in der frühen stationären Phase (Die Proben hierfür wurden bei  $OD_{600nm}$  0,8 abgenommen und entsprechend mehr Zellsuspension im Hämolysetest eingesetzt.) zu einer starken Reduktion der Hämolyse, was für eine starke Hemmung der PrfA-Aktivität spricht. Die d0096-8 Mutante zeigt wie schon unter D.3.3 gezeigt eine deutlich verstärkte Hämolyse im Vergleich zum Wildtyp, wobei in beiden Stämmen in der stationären Phase mehr LLO gebildet wird als in der logarithmischen Phase. Die Überexpression von Lmo0096 in d0096-8 verringert die PrfA-Aktivität von d0096-8 offensichtlich dramatisch, da die Hämolyse noch unter den Wildtyp-Level fällt.

## E Diskussion

*Listeria monocytogenes* ist ein Bakterium mit zwei verschiedenen Lebensweisen: Saprophytisch, vorwiegend auf verrottendem Pflanzenmaterial, und parasitisch in Säugetier- bzw. Vogelzellen (Farber and Peterkin, 1991). Die listerielle Pathogenese beinhaltet das Überqueren des Darmepithels durch aktive Invasion in die Wirtszelle, Entkommen aus dem Phagosom, Replikation im Cytosol und Aktin-vermittelte Zell-zu-Zell Verbreitung. Die wichtigsten listeriellen Virulenzgene (*prfA*, *plcA*, *hly*, *mpl*, *actA*, *plcB*, *inlA*, *inlB*, *inlC* und *uhpT*) werden vom Transkriptionsaktivator PrfA reguliert (Leimeister-Wächter *et al.*, 1990; Mengaud *et al.*, 1991). Dieser Hauptregulator der Virulenzgene in *L. monocytogenes* wurde später auch in der tierpathogenen Spezies *L. ivanovii* und im apathogenen *L. seeligeri* identifiziert (Gouin *et al.*, 1994; Lampidis *et al.*, 1994), jedoch nicht in den reinen Umweltkeimen *Listeria innocua* und *Listeria welshimeri* (Doumith *et al.*, 2004; Hain *et al.*, 2006). Phylogeniestudien haben gezeigt, dass das Virulenzgencluster LIPI-1, in dem auch PrfA organisiert ist, in *L. innocua* und *L. welshimeri* deletiert ist (Schmid *et al.*, 2005). Die verfügbaren Daten über die PrfA-regulierten Gene in *L. seeligeri* zeigen eine geringe Expression *in vitro* und *in vivo* (Karunasagar *et al.*, 1997; Kreft and Vázquez-Boland, 2001).

### E.1 Spezies-spezifische Unterschiede der PrfA-DNA-Bindung

*In vivo* ist die PrfA-Aktivität komplex reguliert mittels noch nicht vollständig verstandener zusätzlicher Faktoren und abhängig von metabolischen Bedingungen (Dickneite *et al.*, 1998; Ermolaeva *et al.*, 2004; Milenbachs-Lukowiak *et al.*, 2004; Milenbachs *et al.*, 1997; Renzoni *et al.*, 1997), welche in den drei PrfA-exprimierenden Arten *L. monocytogenes*, *L. ivanovii* und *L. seeligeri* verschieden sein könnten. Von Luo *et al.* wurde schon 2004 gezeigt, dass gereinigtes m-PrfA in der Lage ist, *in vitro* die Transkription PrfA-abhängiger Gene ähnlich gut wie das konstitutiv aktive m-PrfA\* zu initiieren. *In vivo* jedoch wird m-PrfA im Gegensatz zu m-PrfA\* in seiner Aktivität positiv oder negativ moduliert (Goebel *et al.*, 2006; Ripio *et al.*, 1996). Dieser Unterschied zwischen *in vitro* und *in vivo* Bedingungen deutet darauf hin, dass noch unbekannte zelluläre Faktoren m-PrfA *in vivo* in seiner Aktivität beeinflussen. Jüngste Untersuchungen, die in diesem (inhibitorischen) Faktor ein Element für einen Quorum-Sensing-Mechanismus sehen (Ermolaeva *et al.*, 2004), bestätigen diese Annahme.

In dieser Arbeit wurde zunächst mittels Electrophoretic Mobility Shift Assays (EMSA) untersucht, ob die verschiedenen aufgereinigten PrfAs (m-PrfA<sub>nt</sub>, m-PrfA\*<sub>nt</sub> (nt = not tagged, da diese Proteine keinen His-Tag besitzen), m-PrfA und m-PrfA\* aus *L. monocytogenes*, i-PrfA aus *L. ivanovii*, s-PrfA aus *L. seeligeri* und das Hybrid sm-PrfA) sich in ihren Bindungseigenschaften an die *Phly*- und *PactA*-Promotorregion von *L. monocytogenes*, *L. ivanovii* und *L. seeligeri* unterscheiden. Schon Dickneite *et al.* (1998) konnten zeigen, dass die Bindungsaffinität von PrfA an die PrfA-Box allein höchst ineffizient ist und große Mengen an PrfA benötigt werden um einen CIII-Komplex aus DNA und PrfA-Protein zu bilden. Ein CI-Komplex (aus DNA, PrfA und RNAP) konnte gar nicht ausgebildet werden, da dafür die Zugabe von RNA-Polymerase (RNAP) benötigt wird. Die Bindungsaffinität wird durch Nutzung des ganzen Promotorbereichs verbessert.

### E.1.1 Bindungsaffinität der verschiedenen PrfA-Proteine

Die mit den EMSAs erhaltenen Daten der Bindungsaffinität der einzelnen *L. monocytogenes* PrfAs ähneln tendenziell den von Gerald Seidel mittels "surface plasmon resonance" (SPR, Biacore) ermittelten Daten der Gleichgewichtskonstanten der Dissoziation ( $K_D$ ) für die Interaktion der Proteine m-PrfA<sub>nt</sub>, m-PrfA\*<sub>nt</sub>, m-PrfA und i-PrfA mit einer 28 bp langen DNA-Sequenz, welche die perfekte PrfA-Box mit den flankierenden sieben Basen von m-*Phly* enthält (Ecke *et al.*, 2006). Die von Gerald Seidel durchgeführten SPR-Messungen ergaben folgende Gleichgewichtskonstanten ( $K_D$ ):  $4,6 \pm 0,6 \times 10^{-9}$  M (m-PrfA<sub>nt</sub>),  $\sim 8,2 \pm 0,6 \times 10^{-11}$  M (m-PrfA\*<sub>nt</sub>),  $6,0 \pm 1,0 \times 10^{-10}$  M (m-PrfA) und  $3,6 \pm 0,1 \times 10^{-10}$  M (i-PrfA). Diese SPR Daten unterstützen die Idee, dass aufgereinigtes PrfA zumindest partiell in aktiver Form vorliegt und so an die PrfA-Box binden kann. Von Eiting *et al.* wurden für die *L. monocytogenes* PrfAs folgende Gleichgewichtskonstanten gemessen:  $9 \pm 1 \times 10^{-7}$  M (PrfA) und  $5 \pm 1 \times 10^{-8}$  M (PrfA\*) (Eiting *et al.*, 2005), welche um etwa drei dekadische Größenordnungen höher sind als die von Gerald Seidel gemessenen Werte. Dies kann unter Umständen mit den verschiedenen Arten der Proteinaufreinigung zusammenhängen oder 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 PrfA\* Mutante gegenüber der wildtypischen Form des PrfA-Proteins eine erhöhte Affinität für die Ziel-DNA.

Die in Abschnitt D.1 durchgeführten EMSA-Versuche zeigen, dass m-PrfA\* und i-PrfA mit vergleichbarer Affinität deutlich stärker an die PrfA-Box von m-*Phly* binden als m-PrfA oder gar s-PrfA. Bei Letzterem war überhaupt kein CIII-Komplex zu detektieren, während der CIII-Komplex von m-PrfA mindestens 20-fach schwächer war als der von i-PrfA und m-PrfA\*. Dieses Ergebnis war auch bei *PactA* und *Phly* aller drei Spezies zu beobachten. An den *actA* Promotoren aller drei Spezies konnte mit s-PrfA ein hochgeschifteter CIIIa-Komplex beobachtet werden, welcher möglicherweise aus DNA mit mehr als einem s-PrfA besteht.

Die Ursache 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.*, 1997; Sheehan *et al.*, 1996; Shetron-Rama *et al.*, 2003; Vega *et al.*, 1998; Vega *et al.*, 2004b; Wong and Freitag, 2004). Im ClustalW Alignment von i-PrfA und m-PrfA in Abbildung 19 in das bereits beschriebene PrfA\* Mutationen eingetragen sind, fällt bei i-PrfA der Cysteinrest 183 (S183C) auf, der wie die beschriebene S183A PrfA\* Substitution (Sheehan *et al.*, 1996) für eine erhöhte Aktivität bzw. DNA-Bindung verantwortlich sein könnte.

Auffällig ist die Unstimmigkeit 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 kleiner als die von m-PrfA mit  $6 \times 10^{-10}$  M, jedoch ist die Bindung von i-PrfA im EMSA über hundertfach stärker als die von m-PrfA. Dies liegt wahrscheinlich an den verschiedenen Versuchsbedingungen, da in der SPR Oligonukleotide mit einer Länge von 28 bp untersucht wurden und DNA dieser Länge im EMSA nur schwach mit PrfA interagiert. Daher wurde im EMSA, wie schon zuvor beschrieben, der 112 bp lange komplette Promotorbereich verwendet (Dickneite *et al.*, 1998; Freitag *et al.*, 1993; Sheehan *et al.*, 1996), der mit PrfA einen stärkeren Komplex eingeht als die PrfA-Box allein.

Es zeigen also beide Methoden (SPR und EMSA) eine ähnliche Tendenz für die Bindung der PrfA-Proteine und bestätigen nochmals, dass die gereinigten Proteine auch ohne die

Anwesenheit weiterer Faktoren aktiv sind (wie Paf; Böckmann *et al.*, 1996). Es wäre aber möglich, dass der unbekannte mit PrfA interagierende Faktor auch in *E. coli* M15 vorhanden ist und bei der Aufreinigung der rekombinanten Proteine mit eluiert wurde.

## E.1.2 Bildung des geschlossenen Transkriptionskomplexes

Für die Bildung des geschlossenen Transkriptionskomplexes wurde in den Ansatz RNAP in der getesteten optimalen Konzentration von 1,5 nM (D.1.3) zugegeben. Im Gegensatz zum CIII-Komplex konnte in den EMSA Versuchen ein geschlossener Komplex aus RNA-Polymerase, PrfA und DNA (CI-Komplex) bei allen eingesetzten PrfA-Proteinen und allen getesteten Promotoren beobachtet werden. Der CI-Komplex ist die Voraussetzung für PrfA-abhängige Transkription. Der große Unterschied zwischen m-PrfA und i-PrfA in der DNA-Bindung (CIII-Komplex) zeigte sich nicht bei der Bildung von CI-Komplex. Für einen gesättigten CI-Komplex (erkennbar daran, dass kein CII-Komplex aus RNAP und DNA mehr vorhanden ist) an m-*Phly* (Abbildung 22) waren sowohl bei m-PrfA als auch bei i-PrfA 60 nM Protein in 30 µl Versuchsansatz nötig. Bei m-PrfA\* waren es sogar lediglich 18 nM. Für die gesättigte Bildung von CI-Komplex bei s-PrfA war jedoch mit 3,5 µM eine rund 60-mal höhere Konzentration als für m-PrfA oder i-PrfA erforderlich, bzw. 200 mal mehr im Vergleich zu m-PrfA\*.

Die EMSA Studien an den *hly*- und *actA*-Promotoren aller drei Spezies ergaben, dass die aktiven PrfAs an die PrfA-Boxen der Promotoren von *L. seeligeri* binden und zusammen mit der RNA-Polymerase einen geschlossenen Komplex bilden können. Von Norman Mauder wurden die sechs Promotoren mittels *in vitro* Transkription auf ihre Fähigkeit hin untersucht, die Transkription zu initiieren (Ecke *et al.*, 2006). Es ließen sich kleinere Unterschiede in den Transkriptmengen feststellen, doch hat sich gezeigt, dass die PrfA-abhängigen Promotoren von *L. seeligeri* voll funktionsfähig sind. Eine spezies-spezifische Anpassung von Promotoren und PrfA-Proteinen gleicher Spezies konnte weder in den EMSA Versuchen noch in den "run off" *in vitro* Transkriptionsassays von Norman Mauder nachgewiesen werden. Das heißt, dass z.B. m-PrfA im Vergleich zu i-PrfA bei den Promotoren aller drei Spezies die grundsätzlich gleiche Aktivität besitzt.

Die Fähigkeit zur Bildung von CI-Komplex 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 (Ecke *et al.*, 2006).

Die in dieser Arbeit und von Norman Mauder erhaltenen Ergebnisse der Bindungsstudien und Transkriptionsexperimente zeigen, dass für eine effiziente Transkriptionsaktivierung eine starke DNA-Bindung nötig ist. Dies wird im Falle von s-PrfA besonders deutlich. Das PrfA von *L. seeligeri* bindet schlecht an alle getesteten Promotoren und zeigt auch eine geringe Transkriptionsaktivierung. Zudem deuten die im Supershift-Experiment mit m-PrfA und s-PrfA gebildeten CI-Komplexe darauf hin, dass weniger s-PrfA-Moleküle am CI-Komplex gebunden sind im Vergleich zu den m-PrfA-Molekülen. Dies liegt möglicherweise an der geringeren Fähigkeit von s-PrfA, funktionelle Dimere auszubilden, aufgrund der im Vergleich zu m-PrfA C-terminalen Aminosäureaustausche, da der C-Terminus als wichtig für die Dimer-Bildung beschrieben ist (Herler *et al.*, 2001).

Zudem könnte die Interaktion des PrfA-Proteins mit der RNAP von Bedeutung für die Transkription sein, da die Proteine m-PrfA, m-PrfA\* und i-PrfA trotz der großen

Unterschiede in der DNA-Bindung alle ähnlich gut in der Lage sind, die Transkription zu initiieren (Ecke *et al.*, 2006). Daneben könnten *in vivo* beobachtete Unterschiede in der Expression von Virulenzgenen nicht nur durch unterschiedliche Bindungsaffinitäten der PrfA-Proteine an die Promotoren PrfA-abhängiger Gene begründet sein, sondern auch durch unterschiedliche Wechselwirkung mit den möglicherweise mit PrfA interagierenden Faktoren, welche die Aktivität von PrfA regulieren (Herro *et al.*, 2005).

### E.1.3 Auswirkung der N-terminalen His<sub>6</sub>-Markierung

Die Untersuchung der His<sub>6</sub>-markierten und unmarkierten PrfA-Proteine in EMSA Versuchen (D.1.4) am m-*Phly* Promotor ergab, dass die Bindung von m-PrfA<sub>nt</sub> an die DNA-Sonde (CIII-Komplex) zu schwach für einen aussagekräftigen Vergleich mit m-PrfA war, wobei m-PrfA einen zumindest detektierbaren CIII-Komplex bildete. Bei den Proteinen m-PrfA\*<sub>nt</sub> und m-PrfA\* war zu erkennen, dass die His<sub>6</sub>-Markierung die Bindung etwa um den Faktor zehn verbessert. Ähnliche Ergebnisse zeigen die Bindungsversuche an m-*PactA*, wobei an diesem Promotor m-PrfA\* den deutlichsten CIII-Komplex ausbildet.

Messungen mittels SPR (von Gerald Seidel) an der m-*Phly* PrfA-Box ergaben für m-PrfA<sub>nt</sub> eine  $K_D$  von  $4,6 \times 10^{-9}$  M und für m-PrfA eine  $K_D$  von  $6 \times 10^{-10}$  M. His<sub>6</sub>-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\*<sub>nt</sub> und m-PrfA\* konnten mit SPR nicht verglichen werden, da die Bindung von m-PrfA\* zu stark war und damit außerhalb des Messbereichs des Gerätes lag (Ecke *et al.*, 2006).

Es zeigen also beide Methoden (SPR und EMSA) eine etwa 18-fach höhere Bindungsaffinität für m-PrfA\* im Vergleich zu m-PrfA und eine 50-fach höhere Bindungsaffinität zwischen m-PrfA\*<sub>nt</sub> und m-PrfA<sub>nt</sub>. Die verbesserte Bindung der His<sub>6</sub>-markierten Proteine ist auf vier positiv geladene Histidinreste zurückzuführen, da diese die 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 positiv geladen sein dürften.

Obwohl die His<sub>6</sub>-Markierung die Bindung an die Ziel-DNA verbessert, führt sie in EMSA-Versuchen nicht gleichzeitig zu einer proportional höheren Bildung von CI-Komplex. Auch *in vitro* Transkriptionsstudien mit den vier verschiedenen PrfA-Proteinen an m-*Phly* und m-*PactA* (durchgeführt von Stefanie Müller-Altrock) zeigten keine Erhöhung der Transkriptionsrate, die mit der höheren DNA-Bindung übereinstimmen würde. Sowohl die Bildung von CI-Komplex als auch die Transkriptionsaktivität wurden durch His<sub>6</sub>-markierte PrfA Proteine gegenüber den nicht markierten höchstens um den Faktor zwei verstärkt (Ecke *et al.*, 2006).

### E.1.4 Untersuchung der Bindungseigenschaften des Hybrids sm-PrfA

Da s-PrfA eine vergleichsweise niedrige Bindungseigenschaft und Transkriptionsaktivität an PrfA-abhängigen Promotoren aufweist, 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 von Norman Mauder ein Hybridprotein (sm-PrfA) aus s-PrfA und m-PrfA hergestellt. Dieses sm-PrfA gleicht s-PrfA bis auf die letzten 38 C-terminalen Aminosäurereste, welche durch die 38 C-terminalen Aminosäurereste von m-PrfA ersetzt wurden. Die Proteine m-PrfA, sm-PrfA und s-PrfA wurden in direktem Vergleich mittels EMSA-Versuchen und von Norman Mauder in *in vitro* Transkriptionsstudien an der DNA-Sonde des m-*Phly* Promotors getestet (Ecke *et al.*, 2006).

Die EMSA-Studien ergaben keine miteinander vergleichbaren PrfA-DNA-Komplexe (CIII-Komplex), da die Bindung dieser PrfA-Proteine an die DNA-Sonde in den gewählten Konzentrationen zu schwach war. Somit kann die Bindung der Proteine an die Ziel-DNA nicht direkt verglichen werden. Komplexe aus RNA-Polymerase und DNA-Sonde (CII-Komplex) und geschlossene Transkriptionskomplexe aus RNA-Polymerase, PrfA-Protein und DNA-Sonde (CI-Komplex) konnten detektiert werden. Mit m-PrfA ging der CII-Komplex bei einer PrfA-Konzentration von 60 nM vollständig in den CI-Komplex über. Dies geschah mit sm-PrfA bei einer Konzentration von 2,8  $\mu\text{M}$  und mit s-PrfA bei einer Konzentration von 3,5  $\mu\text{M}$ . Die von Norman Mauder durchgeführten *in vitro* Transkriptionsstudien ergaben, dass eine zur CI-Komplexbildung ähnliche Menge an Protein für die Transkriptionsaktivierung nötig ist (Ecke *et al.*, 2006).

Diese Ergebnisse zeigen deutlich, dass sm-PrfA gegenüber s-PrfA eine verbesserte Aktivität besitzt, doch ist diese nur sehr gering. Demzufolge müssen andere Unterschiede in der Aminosäuresequenz für die niedrige Aktivität von s-PrfA verantwortlich sein.

## E.2 PrfA-Aktivität von *Listeria monocytogenes* in verschiedenen Kulturmedien

Die Virulenz von *L. monocytogenes* ist abhängig vom Transkriptionsregulator PrfA, welcher von den Wachstumsbedingungen reguliert wird. Vollmedium inhibiert die PrfA-Aktivität generell (Kreft and Vázquez-Boland, 2001). Dieser inhibitorische Effekt wird durch die Zugabe von Aktivkohle (Ripio *et al.*, 1996) oder dem Amberlite XAD-4 ins Medium aufgehoben (Rauch, 2003). Daher wurde angenommen, dass möglicherweise von *L. monocytogenes* ins Kulturmedium abgegebene Komponenten für die PrfA-Inhibierung verantwortlich sein könnten oder mit PrfA-aktivierenden Faktoren interagieren (Ermolaeva *et al.*, 2004). Andererseits haben die unter D.1 und von N. Mauder erhaltenen Daten deutlich gezeigt, dass aufgereinigtes m-PrfA bei der Transkriptionsinitiation *in vitro* fast genauso aktiv ist wie m-PrfA\* (Ecke *et al.*, 2006; Luo *et al.*, 2004). Diese Daten deuten an, dass PrfA entweder keinen aktivierenden Faktor benötigt oder dass dieser bei der Aufreinigung an PrfA gebunden ist. Diese Beobachtungen zeigen deutlich, dass zumindest zusätzlich zu einem möglichen PrfA-aktivierenden Faktor, die PrfA-Aktivität *in vivo* von inhibierenden Faktoren beeinflusst wird. Die Bindung an diesen inhibierenden Faktor ist wohl kovalent und wahrscheinlich schwach, da der Faktor bei der Aufreinigung offenbar verschwindet. Stefanie Müller-Altrock konnte zeigen, dass keiner der PTS-Zucker Cellobiose, Glucose und Mannose die PrfA-abhängige Transkription *in vitro* direkt beeinflusst. Auch Komponenten des PTS-Stoffwechselweges (EI, HPr, HPr-His-P) oder der Kohlenstoffkatabolitrepression (CcpA, HPr-Ser-P) haben keinen direkten Einfluss auf die PrfA Aktivität *in vivo* oder *in vitro* (Behari and Youngman, 1998; Herro *et al.*, 2005; Mertins *et al.*, 2007; Milenbachs *et al.*, 1997).

Aktuelle Daten deuten darauf hin, dass der Phosphorylierungsstatus der PTS-Permeasen für die oben genannten Zucker mit der PrfA-Aktivität korreliert (Joseph *et al.*, 2008; Mertins *et al.*, 2007). Darauf basierend wurde ein Modell aufgestellt, nach dem unphosphorylierte PTS-Permeasen PrfA inhibieren könnten, indem sie direkt an PrfA binden. Die phosphorylierten PTS-Permeasen dagegen könnten entweder PrfA aktivieren oder den inhibitorischen Faktor von dem inhibitorischen PTS/PrfA-Komplex entfernen, so dass das freie PrfA transkriptionell aktiv werden kann oder nicht an PrfA binden und dieses somit nicht inaktivieren. *In vitro* erhält man unphosphorylierte PTS-Komponenten vorwiegend in der logarithmischen Wachstumsphase, wenn das Phosphat an den Zucker übertragen wird, wohingegen in der stationären Phase die PTS-Komponenten phosphoryliert vorliegen, da kein Zucker mehr aufgenommen wird. Eine ähnliche Interaktion zwischen Komponenten des Glucose-spezifischen PTS und dem globalen Transkriptionsregulator Mlc ist schon für *E. coli* beschrieben worden (Nam *et al.*, 2001). Die in diesem Teil der Arbeit erhaltenen Daten, sowie die von S. Mertins und B. Joseph beschriebenen Daten erlauben jedoch keine genaue Definition, mit welchen PTS-Permeasen PrfA interagieren könnte.

Um das aufgestellte Modell besser untersuchen zu können, wurden der *L. monocytogenes* Wildtyp-Stamm EGD, welcher eine Kopie des *prfA*-Gens unter Kontrolle seines eigenen Promotors im Genom trägt (Mengaud *et al.*, 1991), sowie die das *prfA* bzw. *prfA\** Gen auf einem in hoher Kopienzahl vorliegenden pERL3-Plasmid tragende *prfA*-Deletionsmutante EGD $\Delta$ *prfA* in verschiedenen Medien untersucht. Die Gene *prfA* und *prfA\** werden auf dem Plasmid unter Kontrolle der beiden konstitutiven Promotoren PprfA1 und PprfA2 auf

konstant hohem Niveau exprimiert. Entsprechend dem Modell wurde erwartet, dass die hohe zelluläre Konzentration an PrfA (und möglicherweise auch PrfA\*) durch Bindung der unphosphorylierten PTS-Komponenten die PTS Funktion einschränken könnte. In der Tat wurde schon von A. Marr eine Wachstumsinhibierung bei Überexpression von PrfA und PrfA\* festgestellt (Marr *et al.*, 2006).

Als Kulturmedien für die Versuche wurden BHI (brain-heart infusion), Luria-Bertani (LB) und ein definiertes Minimalmedium (MM, (Premaratne *et al.*, 1991)) ausgewählt und entweder mit den PTS-Zuckern Glucose, Mannose oder Cellobiose versetzt oder mit der nicht-PTS-Kohlenstoffquelle Glycerin. Die PrfA-Aktivität und das Transkriptprofil der Gene, die für PTS-Permeasen codieren, wurden in der logarithmischen Phase untersucht, in der noch aktiv Zucker transportiert werden.

### **E.2.1 Verhalten von *L. monocytogenes* EGD, EGD $\Delta$ *prfApPrfA* und EGD $\Delta$ *prfApPrfA*\* in verschiedenen Kulturmedien**

Untersuchungen mit einer *ptsH*-Insertionsmutante (persönliche Mitteilung S. Mertins) haben gezeigt, dass PTS-Zucker nicht die einzige Energiequelle von *L. monocytogenes* in BHI zu sein scheinen, da die Mutante in BHI im Gegensatz zu Minimalmedium mit verschiedenen Zuckerquellen noch wachsen kann. Dennoch ist das Wachstum der *ptsH*-Mutante im Vergleich zum Wildtyp deutlich reduziert, was darauf hindeutet, dass *L. monocytogenes* EGD in BHI zusätzlich PTS-Kohlenstoffquellen zur Verfügung stehen (Stoll *et al.* 2008).

In dem Vollmedium BHI verändert die Zugabe von Kohlenstoffquellen (Glucose, Mannose, Cellobiose oder Glycerin) das Wachstum aller drei Stämme nicht. Dennoch weisen die PrfA-überexprimierenden Stämme eine etwas längere Generationszeit auf als der Wildtyp. Das verringerte Wachstum der beiden PrfA-überexprimierenden Stämme EGD $\Delta$ *prfApPrfA* und EGD $\Delta$ *prfApPrfA*\* korreliert mit den Annahmen des Modells, dass die überexprimierenden Stämme durch Binden der unphosphorylierten PTS-Komponenten langsamer wachsen. Gleichzeitig wird jedoch so viel PrfA produziert, dass EGD $\Delta$ *prfApPrfA* und EGD $\Delta$ *prfApPrfA*\* eine wesentlich höhere PrfA-Aktivität aufweisen als der Wildtyp EGD, dessen PrfA-Aktivität in BHI sehr gering ist. Wie schon beim Wachstum, verändert in BHI die Zugabe der Kohlenstoffquellen die PrfA-Aktivität fast gar nicht. EGD hat nach Zugabe von Cellobiose ins Medium eine etwas verringerte PrfA-Aktivität, auf EGD $\Delta$ *prfApPrfA* und EGD $\Delta$ *prfApPrfA*\* haben die Zucker in BHI keinerlei Auswirkung.

In reinem LB Medium zeigen *L. monocytogenes* EGD, EGD $\Delta$ *prfApPrfA* und EGD $\Delta$ *prfApPrfA*\* nur geringes Wachstum und die *ptsH*-Mutante ist nicht in der Lage in LB (ohne und mit Zugabe der Kohlenstoffquellen) zu wachsen (Stoll *et al.* 2008). Das deutet darauf hin, dass das geringe Wachstum von EGD in LB bis zu einer OD<sub>600nm</sub> von 0,6 aufgrund von PTS-Kohlenstoffquellen im Medium stattfindet. Wird 50 mM Glucose, Mannose oder Cellobiose ins Medium gegeben wächst EGD auf einem ähnlichen Level wie in BHI, 50 mM Glycerin im Medium verringert die Generationszeit um 10 min. EGD $\Delta$ *prfApPrfA* und EGD $\Delta$ *prfApPrfA*\* haben im Vergleich zu EGD jeweils eine um 20 min verlängerte Generationszeit.

Das Wachstum von EGD in LB mit den drei PTS-Zuckern und Glycerin verursacht eine sehr geringe, kaum messbare PrfA-Aktivität. Obwohl geringe Mengen an PrfA produziert werden, ist es nicht aktiv.

Die PrfA-Aktivität von EGD $\Delta$ *prfApPrfA* ist im Vergleich zu EGD nur schwach erhöht, obwohl in Gegenwart aller vier Kohlenstoffquellen genauso viel PrfA gebildet wird wie in EGD $\Delta$ *prfApPrfA*\*. Glycerin als Kohlenstoffquelle erhöht die PrfA-Aktivität in geringem Maße. EGD $\Delta$ *prfApPrfA*\* produziert, wie erwartet, hohe Mengen an PrfA\*, welches ähnlich aktiv ist wie in BHI.

*L. monocytogenes* kann in nach Premaratne *et al.* (1991) hergestelltem Minimalmedium ohne Zugabe von Kohlenstoffquellen nicht wachsen. Die Zugabe von 50 mM Glucose, Cellobiose, Mannose oder Glycerin führt nach einer langen Lag-Phase zu einem im Vergleich zu BHI und LB sehr langsamen Wachstum, da die Generationszeiten bei allen drei Stämmen mehr als doppelt so lang sind. In Glycerin-haltigem MM benötigen EGD und EGD $\Delta$ *prfApPrfA* am längsten, um das Wachstum zu starten. EGD $\Delta$ *prfApPrfA*\* hat die längste Lag-Phase und Generationszeit in Cellobiose-haltigem MM.

Die PrfA-Aktivität von EGD ist nach Wachstum in MM mit Glucose, Mannose und vor allem Glycerin wesentlich höher als in BHI, Cellobiose inhibiert wie schon von Brehm *et al.* (1999) beobachtet die PrfA-Aktivität stark. EGD $\Delta$ *prfApPrfA*\* zeigt wieder die erwartete hohe PrfA-Aktivität, EGD $\Delta$ *prfApPrfA* dagegen zeigt ähnlich wie in LB trotz mit EGD $\Delta$ *prfApPrfA*\* vergleichbarer PrfA Menge eine stark verringerte PrfA-Aktivität. Diese ist fast so gering wie beim Wildtyp nach Wachstum in Cellobiose-haltigem MM.

Die erhaltenen Daten zeigen deutlich, dass die Art der Kohlenstoffquelle und des Wachstumsmediums eine starke Auswirkung auf die PrfA-Aktivität von *L. monocytogenes* EGD, EGD $\Delta$ *prfApPrfA* nicht aber von EGD $\Delta$ *prfApPrfA*\* haben. Um diese Auswirkungen und das postulierte Modell der Regulation der PrfA-Aktivität genauer erklären zu können, wurden von den bis zu 29 kompletten und unvollständigen PTS der verschiedenen Zucker-Familien, den Genen für die Glycerinaufnahme und *prfA* sowie den PrfA-abhängigen Virulenzgenen (Glaser *et al.*, 2001; Nguyen *et al.*, 2006) so genannte PTS-Microarrays hergestellt. Der Wildtyp EGD wurde nach Wachstum in BHI, LB und MM mit jeweils 50 mM Glucose in der mittleren logarithmischen Wachstumsphase untersucht und die PrfA-überexprimierenden Stämme nach Wachstum in MM mit verschiedenen Kohlenstoffquellen.

## **E.2.2 Expressionsdaten von *L. monocytogenes* EGD, EGD $\Delta$ *prfApPrfA* und EGD $\Delta$ *prfApPrfA*\* in verschiedenen Kulturmedien**

Die erhaltenen Daten der PTS-Microarrays zeigen deutlich, dass von EGD in LB nur sehr wenig PrfA exprimiert wird, welches zudem inaktiv ist. Die PrfA-Aktivität ist in BHI deutlich höher als in LB und am ausgeprägtesten in MM mit 50 mM Glucose.

Das Wachstum von EGD in BHI ist von PTS-Zuckern abhängig ist, da eine hohe Expression des PTS<sup>Man</sup>(Imo0096-98) und in geringerem Maße PTS<sup>Man</sup>(Imo0781-0784) beobachtet werden. Offenbar wird Glucose vor allem über diese zwei PTS-Permeasen aufgenommen, da alle anderen PTS-Permeasen nur sehr schwach exprimiert werden. Die Komponenten dieser PTS liegen während der aktiven Zuckeraufnahme zu einem Großteil unphosphoryliert vor und könnten somit laut dem Modell an PrfA binden und es inaktivieren. Dies korreliert mit der geringen PrfA-Aktivität von EGD in BHI.

In LB mit Glucose sind die zwei PTS<sup>Man</sup>(Imo0096-98) und PTS<sup>Man</sup>(Imo0781-0784) deutlich stärker exprimiert als in BHI. Da jedoch das Wachstum in LB mit Glucose anders als in BHI völlig von der Aufnahme von Glucose abhängt, liegen vermutlich die PTS-EIIA/B-Komponenten der PTS<sup>Man</sup> in wesentlich höherem Maße unphosphoryliert vor als in BHI und können somit mehr PrfA binden und inaktivieren. Dies erklärt auch die geringe PrfA-Aktivität von EGD $\Delta$ *prfApPrfA* in LB. Trotz der hohen Menge an gebildetem PrfA liegt in der Glucose-aufnehmenden Zelle so viel von dem in hohem Maße exprimierten EIIA/B von PTS<sup>Man</sup>(Imo0096-98) und PTS<sup>Man</sup>(Imo0781-0784) in unphosphorylierter Form vor, dass PrfA gebunden und inaktiviert wird. Das äußert sich auch in der verringerten Generationszeit von EGD $\Delta$ *prfApPrfA* im Vergleich zu EGD, da durch Binden der unphosphorylierten PTS-Komponenten weniger von HPr phosphoryliert werden können und daher weniger PTS-Permeasen für die Zuckeraufnahme funktionsfähig sind, obwohl mehr exprimiert werden. Die Beobachtung der verringerten Wachstumsrate bei erhöhter PrfA Produktion korreliert auch mit den Daten von A. Marr *et al.* (2006).

Bei Wachstum von *L. monocytogenes* EGD in MM mit Glucose ist die Expressionsstärke von PTS<sup>Man</sup>(Imo0096-0098) und PTS<sup>Man</sup>(Imo0781-0784) deutlich geringer als in BHI oder LB und die PrfA-Aktivität eindeutig höher. Das passt wieder zum Modell der Regulation der PrfA-Aktivität, da die geringere Expression der PTS-Permeasen eine geringere Menge an unphosphoryliertem EII zur Verfügung stellt, welches mit PrfA interagieren kann und die PrfA-Aktivität hemmt. Daher ist die PrfA-Aktivität in MM höher als in BHI oder LB. Daten von B. Joseph *et al.* (2008) zeigen zudem, dass PrfA nur in der Phase aktiven Zuckertransports gehemmt wird. Wird nun aufgrund der geringen PTS-Expression nur wenig Zucker aufgenommen, ist PrfA aktiv.

Die Expressionsdaten zeigen also, dass *L. monocytogenes* EGD nach Wachstum in BHI, LB oder MM vor allem die zwei PTS<sup>Man</sup>(Imo0096-0098) und PTS<sup>Man</sup>(Imo0781-0784) exprimiert, welche die wichtigsten Glucose aufnehmenden PTS-Permeasen in *L. monocytogenes* EGD-e zu sein scheinen (Dalet *et al.*, 2001; Xue and Miller, 2007). Zusätzlich werden noch die Gene für EIIBC des Beta-Glucosid spezifischen PTS<sup>Glc</sup>(Imo1255) und das EIIA des PTS<sup>Lac</sup>(Imo2259) relativ stark exprimiert. Alle anderen PTS-Permeasen werden in den drei Medien mit 50 mM Glucose (wenn überhaupt) nur auf einem sehr geringen Level produziert. Diese Annahmen setzen natürlich voraus, dass das Expressionsmuster der PTS-Gene auch der gebildeten Proteinmenge in der listeriellen Zelle entspricht.

Da die Auswirkungen der verschiedenen Zucker besonders in Minimalmedium gut zu verfolgen sind, wurden von den beiden PrfA-überexprimierenden Stämme EGD $\Delta$ *prfApPrfA* und EGD $\Delta$ *prfApPrfA*\* im Vergleich zu EGD nach Wachstum in MM mit 50 mM Glucose, Cellobiose und Glycerin bis in die mittlere logarithmische Phase ebenfalls PTS-Microarrays gemacht. Die Daten zeigen, dass in MM mit Glucose EGD $\Delta$ *prfApPrfA* gleich viel PTS<sup>Man</sup>(Imo0096-0098) exprimiert wie der Wildtyp, jedoch wesentlich mehr PTS<sup>Man</sup>(Imo0781-0784) und PTS<sup>Lac</sup>(Imo2683-2685). Möglicherweise inaktivieren die höheren Konzentrationen an unphosphorylierten EII-Komponenten dieser PTS (während der Zuckeraufnahme) die erhöhte Menge an PrfA, indem sie daran binden. Umgekehrt führt die geringere Menge dieser PTS-Komponenten im Wildtyp zu einer relativ hohen PrfA-Aktivität. Diese Annahmen korrelieren zudem wieder mit dem Modell, da das Wachstum von EGD $\Delta$ *prfApPrfA* deutlich langsamer ist als das von EGD (220 min im Vergleich zu 100 min

Generationszeit), da es die unphosphorylierten PTS-Komponenten blockiert. Zudem wird durch die geringere Zuckeraufnahme weniger PEP produziert, die Phosphorylierung der EII-Komponenten verringert und somit zeigt sich ein geringeres Wachstum.

EGD $\Delta$ prfApPrfA\* exprimiert nach Wachstum in MM mit Glucose am wenigsten PTS<sup>Man</sup>(Imo0096-0098), fast genauso viel PTS<sup>Man</sup>(Imo0781-0784) wie EGD $\Delta$ prfApPrfA und nur wenig PTS<sup>Lac</sup>(Imo2683-2685). Trotzdem ist seine PrfA-Aktivität nicht reduziert, sondern nur das Wachstum. Möglicherweise bindet auch PrfA\* PTS-Komponenten, bleibt aber durch die G145S Mutation trotzdem aktiv und verlangsamt durch weniger funktionsfähige PTS-Permeasen nur das Wachstum von EGD $\Delta$ prfApPrfA\*.

Nach Wachstum der Stämme in MM mit 50 mM Cellobiose ist die PrfA-Aktivität in EGD stark inhibiert, obwohl die Gene für PTS<sup>Man</sup>(Imo0096-0098) und PTS<sup>Man</sup>(Imo0781-0784) herunterreguliert sind. Gleichzeitig ist jedoch das PTS<sup>Lac</sup>(Imo2683-2685) stark hochreguliert. Während des aktiven Cellobiose-Transports werden die PTS-Komponenten von PTS<sup>Lac</sup>(Imo2683-2685) dephosphoryliert und es liegen größere Mengen im unphosphorylierten Zustand vor. Passend zum aufgestellten Modell der Regulation der PrfA-Aktivität wäre es möglich, dass auch die unphosphorylierten PTS-Komponenten der Cellobiose-spezifischen PTS PrfA binden und inaktivieren können, möglicherweise sogar stärker als die für Mannose, was die generell starke Herunterregulation von PrfA in Cellobiose-haltigem Medium erklären würde. Dies würde auch das stark reduzierte Wachstum von EGD $\Delta$ prfApPrfA in MM mit Cellobiose begreiflich machen. Wenn das im Übermaß produzierte PrfA\* die unphosphorylierten EII-Komponenten bindet, kann weniger Cellobiose aufgenommen werden und das Wachstum reduziert sich. Der Effekt wird noch verstärkt durch die trotzdem vorhandene Aktivität von PrfA\*, welches ständig die Produktion von neuem PrfA\* anregt, welches wiederum die produzierten PTS-Komponenten bindet.

Bei Wachstum in Glycerin-haltigem MM werden die zwei wichtigsten PTS<sup>Man</sup> fast gar nicht exprimiert (ähnlich dem Level in Cellobiose). Dagegen werden viele andere PTS-Permeasen (vor allem die unter Katabolitrepression stehenden (Joseph *et al.*, 2008)) unter diesen Bedingungen durch die teilweise Aufhebung der Katabolitrepression exprimiert (z.B. PTS(Imo0298-0299) oder PTS(Imo2096-2098)). Obwohl für den Glycerin-Transport keine PTS-Permeasen benötigt werden ist HPr-HisP (phosphoryliert EIIA) in *L. monocytogenes* wie in *B. subtilis* (Darbon *et al.*, 2002) wichtig für die Aktivierung der Glycerinkinase (GlpK) (Joseph *et al.*, 2008). Daher ist es möglich zu postulieren, dass die in geringem Maße exprimierten PTS-Komponenten von PTS<sup>Man</sup>(Imo0096-0098), PTS<sup>Man</sup>(Imo0781-0784) und PTS<sup>Lac</sup>(Imo2683-2685) in phosphorylierter Form vorliegen und somit nicht an PrfA binden und diese inaktivieren. Das heißt also, die PTS-Komponenten werden exprimiert (wenn auch nur in geringem Maße), vom vorhandenen HPr-HisP phosphoryliert und können das Phosphat nicht an das jeweilige Zuckersubstrat abgeben, da keines im Medium vorhanden ist. Da nun keine oder nur wenige unphosphorylierte PTS-Komponenten vorhanden sind, erklärt dies die hohe PrfA-Aktivität der drei untersuchten Stämme in Glycerin-haltigem MM. Die Ergebnisse von EGD $\Delta$ prfApPrfA zeigen keine so stark erhöhte PrfA-Aktivität, was vermutlich an der hohen Expression von PTS<sup>Lac</sup>(Imo2683-2685) und PTS<sup>Lac</sup>(Imo2259) liegt, deren PTS-Komponenten nicht alle phosphoryliert werden. EGD $\Delta$ prfApPrfA\* zeigt dagegen wieder die erwartete hohe PrfA-Aktivität, da die gebundenen unphosphorylierten PTS-Komponenten die Aktivität von PrfA\* nicht zu beeinflussen scheinen.

Auch die längere Lag-Phase und das prinzipiell etwas verringerte Wachstum der Stämme in Glycerin-haltigem Medium lässt sich so erklären, da von den PTS-Komponenten viel Phosphat vom HPr-HisP abgefangen wird, welches aber für die Glycerinaufnahme benötigt wird.

Die Annahme, dass die PrfA-Aktivität von Komponenten der Phosphotransferasesysteme (vorwiegend Mannose und Cellobiose) moduliert wird, wird zudem von den Transkriptomdaten der zwei *L. monocytogenes* Stämme EGD und EGD-e unterstützt. EGD zeigt im Hämolysetest, in Real-Time-Analysen und auch im Microarray eine 4 bis 10 fach höhere PrfA-Expression und PrfA-Aktivität als EGD-e. Betrachtet man nun die Expression der PTS-Gene in den Transkriptomdaten nach Wachstum in MM mit 50 mM Glucose, so fällt auf, dass PTS<sup>Man</sup>(lmo0781-0784) und PTS<sup>Lac</sup>(2683-2685) in EGD-e mehr als zehnmals so stark exprimiert sind als in EGD. Sind nun in EGD weniger PTS-Komponenten exprimiert, so können auch weniger unphosphorylierte Komponenten an PrfA binden und dieses in seiner Aktivität inhibieren.

### **E.2.3 Verhalten von *L. monocytogenes* EGD, EGD $\Delta$ prfApPrfA und EGD $\Delta$ prfApPrfA\* nach Zugabe von XAD-4 ins Medium**

Die Zugabe von Amberlite XAD-4 in das Kulturmedium von *L. monocytogenes* hat einen ähnlich stimulierenden Effekt auf die PrfA-Aktivität wie Aktivkohle (Ermolaeva *et al.*, 1999; Rauch, 2003). Basierend auf diesem Erkenntnis wurde überlegt, ob XAD-4 oder Aktivkohle möglicherweise Komponenten aus dem Kulturmedium absorbieren, die die PrfA-Aktivität inhibieren. Da Aktivkohle einen geringeren Effekt auf PrfA hat als XAD-4 wurde letzteres für die Versuche ausgewählt.

In LB Medium mit 50 mM Glucose bewirkt die Zugabe von 1% XAD-4 beim Wildtyp EGD fast keine Veränderung in Wachstum oder der PrfA-Aktivität. Beim PrfA\*-überexprimierenden Stamm EGD $\Delta$ prfApPrfA\* erhöht sich die Generationszeit von 60 min auf etwa 100 min, wobei die PrfA-Aktivität ebenfalls kaum beeinflusst wird. Der PrfA-überexprimierende Stamm EGD $\Delta$ prfApPrfA, welcher in LB mit Glucose stark in seiner PrfA-Aktivität gehemmt ist, zeigt dagegen eine starke Veränderung nach Zugabe von XAD-4 ins Medium. Zum einen erhöht sich die Generationszeit von etwa 50 min auf fast 200 min, das heißt, der Stamm wächst viermal langsamer als ohne XAD-4 im Medium. Zum anderen erhöht sich die PrfA-Aktivität stark.

Das Bild ändert sich, wenn man MM mit 50 mM Glucose und 1% XAD-4 betrachtet. Der Wildtyp EGD-e benötigt etwa 20 min länger für eine Verdopplung und zeigt eine erhöhte PrfA-Aktivität. Die PrfA überexprimierenden Stämme dagegen wachsen mit einer um 50 min verkürzten Generationszeit und die PrfA-Aktivität verringert sich nach Wachstum in MM mit 50 mM Glucose und 1% XAD sogar.

Die Daten zeigen wieder deutlich, dass die PrfA-Menge mit der Wachstumsgeschwindigkeit korreliert. Zum Interpretieren der XAD-4 Effekte sind jedoch noch weitere Daten notwendig: Von B. Knaupp (persönliche Mitteilung) wurden die XAD-4 Kügelchen nach dem Wachstum mit *L. monocytogenes* mittels Gaschromatographie untersucht und Riboflavin als Hauptprodukt detektiert, welches von den Kügelchen aus dem Medium absorbiert wird. Das Fehlen von Riboflavin im Medium beeinflusst aber einige Stoffwechselwege, so dass von B. Joseph (persönliche Mitteilung) Microarrays mit *L. monocytogenes* nach Wachstum in MM

mit Glucose und Cellobiose mit und ohne XAD-4 durchgeführt wurden. Diese zeigten neben der Aktivierung von PrfA auch in der spätlogarithmischen Phase, dass  $\text{PTS}^{\text{Man}}(\text{lmo0096-0098})$  und  $\text{PTS}^{\text{Lac}}(2683-2685)$  herunterreguliert sind. Gleichzeitig sind Gene der letzten Schritte der Glycolyse herunterreguliert, so dass Pyruvat schlechter in Acetyl-CoA umgewandelt werden kann. Zudem konnte S. Mertins zeigen, dass der Wildtyp in LB Medium höhere Konzentrationen an XAD-4 (5%) benötigt, damit die PrfA-Aktivität erhöht wird (Mertins, 2008).

Die verringerte Expression der  $\text{PTS}^{\text{Man}}(\text{lmo0096-0098})$  und  $\text{PTS}^{\text{Lac}}(2683-2685)$  könnte zum einen das verringerte Wachstum der Stämme erklären, wobei gleichzeitig das Fehlen der unphosphorylierten PTS-Komponenten die PrfA-Aktivität erhöht. Die gleichzeitige Akkumulation der Intermediate der Glykolyse und von PEP führt zu einem erhöhten intrazellulären Level an HPr-His-P und vermehrt phosphorylierten PTS-Komponenten, welche PrfA nicht inhibieren. Aus den Daten lässt sich schließen, dass die erhöhte PrfA-Aktivität nach Zugabe von XAD-4 ins Medium nicht durch die spezifische Interaktion der XAD-4 Kügelchen mit *L. monocytogenes* oder durch Absorption inhibierender Faktoren zu erklären ist, sondern durch die Veränderung des Stoffwechsels.

So benötigt der in LB stark in seiner PrfA-Aktivität inhibierte Wildtyp mehr XAD-4 im Medium als  $\text{EGD}\Delta\text{prfApPrfA}$ . Es ist zu vermuten, dass die durch die Veränderung des Stoffwechsels hervorgerufene Reduktion der PTS-Komponenten auch in LB auftritt und für  $\text{EGD}\Delta\text{prfApPrfA}$  eine erhöhte PrfA-Aktivität bewirkt. Da von EGD in LB im Vergleich zu MM aber sehr viel  $\text{PTS}^{\text{Man}}(\text{lmo0096-0098})$  und  $\text{PTS}^{\text{Man}}(\text{lmo0781-0784})$  produziert wird, ist es möglich, dass eine XAD-4 Konzentration von 1% nicht ausreicht den Stoffwechsel so weit zu verändern, dass sich die PrfA-Aktivität erhöht. Zudem ist in LB wesentlich mehr Riboflavin vorhanden (B. Knaupp, persönliche Mitteilung). In MM aktiviert die Veränderung des Stoffwechsels wie schon erwartet die PrfA-Aktivität des Wildtyps.  $\text{EGD}\Delta\text{prfApPrfA}$  zeigt jedoch eine Reduktion der PrfA-Aktivität. Dies ist nicht eindeutig zu erklären und es müssten noch Transkriptomdaten von diesem Stamm nach Wachstum in MM mit Glucose und 1% XAD erstellt werden um eine genaue Aussage über die Expression der PTS- und Glykolyse-Komponenten zu treffen.

Die bisher gezeigten Daten für Wachstum, PrfA-Aktivität und PTS-Genexpression korrelieren alle mit dem aufgestellten Model der Regulation der PrfA-Aktivität. Um genauere Aussagen treffen zu können, wurden die Phosphotransferasesysteme von *L. monocytogenes* EGD-e genauer untersucht.



### E.3 Listerielle Phosphotransferasesysteme

*L. monocytogenes* ist ein heterotropher Organismus, der in der Lage ist, eine Vielzahl von Kohlenhydraten zu verwerten und hat viele allgemeine metabolische Wege mit *Bacillus subtilis* gemein. Für die effiziente Aufnahme einer Vielzahl dieser Substrate besitzt *L. monocytogenes* nach der Genomsequenz (Glaser *et al.*, 2001) 84 *pts*-Gene, die für 29 komplette PTS und 12 einzelne EIIA-, EIIB-, EIIC-, EIIBAB- oder EIIBBC-Komponenten codieren. Tabelle 18 (im Anhang) bietet einen Überblick über alle *pts*-Gene, die Substratspezifität der dazugehörigen PTS-Permeasen und über putative Regulatoren der *pts*-Operons. Die Einteilung der PTS-Familien wurde nach der Nomenklatur von Barabote und Saier (2005) erstellt. Von S. Mertins konnte in Microarrays mit *ccpA* und/oder *hprK* Insertionsmutanten gezeigt werden, dass einige dieser PTS-Gene unter Katabolitrepression stehen (Mertins *et al.*, 2007). Andere wiederum sind offensichtlich substratinduziert (Dalet *et al.*, 2001; Joseph *et al.*, 2008).

Der Kohlenstoffstoffwechsel hat einen starken Einfluss auf die Aktivität des zentralen Transkriptionsregulators PrfA und die Virulenz von *L. monocytogenes*. Beim Wachstum von *L. monocytogenes* in definiertem MM in Gegenwart der PTS-Zucker Glucose, Mannose und Cellobiose kann eine starke Kohlenstoffkatabolitrepression (CCR) beobachtet werden und die PrfA-Aktivität ist gering (Mertins *et al.*, 2007). Im Hinblick auf die PrfA-Aktivität scheint es eine Hierarchie unter den PTS-Zuckern zu geben. Cellobiose hat den am stärksten reprimierenden Einfluss auf PrfA. Glucose, Mannose und Fructose inhibieren die PrfA-Aktivität in einem geringeren Maß. Saccharose dagegen hat keinen Einfluss auf die PrfA-Aktivität (Gilbreth *et al.*, 2004; Milenbachs *et al.*, 1997). Im Gegensatz dazu sind alle PrfA-regulierten Gene in der nicht-PTS-Kohlenstoffquelle Glycerin hoch induziert, was die Rolle der PTS-Permeasen bei der PrfA-Inhibierung noch unterstreicht. Jedoch weder CcpA (Milenbachs *et al.*, 1997) noch HPr-Ser-P (Mertins *et al.*, 2007), die zwei Hauptkomponenten der CCR-Kontrolle in Gram-positiven Bakterien, fungieren direkt als Modulator für PrfA.

Glucose, Mannose und Cellobiose werden über PTS-Permeasen aufgenommen, da eine *ptsH* Insertionsmutante (*::ptsH*), die kein HPr mehr bildet, nicht mehr auf diesen Zuckern wachsen kann (Mertins *et al.*, 2007). Mit dem mit PTS-Permeasen interagierenden Bakteriocin Pediocin konnten schon Christensen *et al.* (1994) nachweisen, dass Glucose in *L. monocytogenes* Scott A über PTS aufgenommen wird (Christensen and Hutkins, 1994).

BHI ist das einzige Medium, in dem *::ptsH* noch wachsen kann, da hier offensichtlich PTS-unabhängige Kohlenstoffquellen vorliegen. Da die PrfA-Aktivität von *::ptsH* im Vergleich zum Wildtyp in BHI hoch ist, kann man vermuten, dass im Wildtyp Komponenten des PTS-abhängigen Stoffwechselweges PrfA inhibieren (Mertins *et al.*, 2007). Herro *et al.* (2005) gingen davon aus, dass der Phosphatüberträger HPr direkt die PrfA-Aktivität beeinflusst. Dies ist jedoch nicht der Fall, da S. Mertins zeigen konnte, dass EGD-e in MM mit Glycerin während der logarithmischen Phase genauso viel HPr-His-P und HPr-Ser-P bildet wie in MM mit Cellobiose und es liegen ähnliche Mengen an unphosphoryliertem HPr vor. Gleichzeitig ist die PrfA-Aktivität in MM mit Glycerin sehr hoch und in MM mit Cellobiose sehr gering (Mertins, 2008; Stoll *et al.*, 2008).

Daher liegt die Vermutung näher, dass Komponenten der PTS-Permeasen in die Regulation der PrfA-Aktivität involviert sind. Dies wird unterstützt von der Tatsache, dass Überexpression von PrfA die Zuckeraufnahme inhibiert (Eisenreich *et al.*, 2006; Hain *et al.*,

2007; Marr *et al.*, 2006). Zudem zeigt eine *hprK*-Insertionsmutante (*::hprK*) erhöhte PrfA-Aktivität, egal ob in BHI oder in MM mit 50 mM Glucose gewachsen (Mertins *et al.*, 2007). Die *::hprK*-Mutante kann kein HPr-Ser-P mehr bilden und daher sind die unter Kohlenstoffkatabolitrepression stehenden Operons dereprimiert, weshalb die unter CCR stehenden PTS-Gene exprimiert sind. Da die HPr-Kinase fehlt, wird in dieser Mutante viel mehr HPr-His-P produziert, welches nun alle EIIA/B phosphorylieren kann. Die gebildeten PTS-Komponenten liegen daher in phosphorylierter Form vor. Das Wachstum der *hprK*-Mutante ist trotzdem langsamer als das des Wildtyps, da viel PEP für die Phosphorylierung von im Wildtyp unter CCR stehenden EIAs verbraucht wird, welche den im Medium vorhandenen Zucker nicht aufnehmen können. Eine *ccpA*-Insertionsmutante dagegen verringert die PrfA-Aktivität. In der *ccpA*-Mutante sind die unter Kohlenstoffkatabolitrepression stehenden Operons dereprimiert, weshalb viele unter CCR stehenden PTS-Gene auch exprimiert werden (Mertins *et al.*, 2007). Gleichzeitig wird viel HPr-Ser-P gebildet, welches in *B. subtilis* die Menge an HPr-His-P um den Faktor 300 reprimiert (M. Sprehe, persönliche Mitteilung), wodurch die vielen PTS-Komponenten unphosphoryliert vorliegen und PrfA inaktivieren.

Während des Wachstums in Caco2-Epithelzellen sind im Vergleich zu in BHI gewachsenen Listerien viele Gene hoch- bzw. herunterreguliert. Zu den wichtigsten hochregulierten Genen gehören die PrfA-abhängigen Virulenzgene, deren Genprodukte essentiell für intrazelluläres Wachstum sind. Zudem sind 30 Gene von PTS-Komponenten, ABC Transportern und andere unter CCR stehende Gene *in vivo* hochreguliert (Joseph *et al.*, 2006). Die starke Hochregulation von *uhpT*, dem PrfA-regulierten Gen für den Hexose-Phosphat-Transporter (Chico-Calero *et al.*, 2002; Milohanic *et al.*, 2003) in Caco2-Zellen führt zu der Annahme, dass phosphorylierte Glucose in der Wirtszelle eine alternative Kohlenstoffquelle darstellt.

Es konnte in dieser Arbeit (D.2) bestätigt werden, dass die Zucker einen Einfluss auf die PrfA-Aktivität haben und die Erkenntnisse wurden um Expressionsdaten der PTS-Gene in verschiedenen Stämmen und Medien erweitert. Ein daraus abgeleitetes Modell der Regulation der PrfA-Aktivität besagt, dass PrfA von unphosphorylierten Komponenten der PTS-Permeasen inaktiviert wird, vermutlich die im Zytosol löslichen EIIA- und/oder EIIB-Komponenten. Von *E. coli* ist bekannt, dass EIIA<sup>Glc</sup> von PtsG direkt mit der Adenylatzyklase (CyaA) interagiert. EIIA<sup>Glc</sup> und P-EIIA<sup>Glc</sup> binden beide an CyaA, jedoch nur die phosphorylierte Form stimuliert die Aktivität (Park *et al.*, 2006). Die Adenylatzyklase bildet nun ATP-abhängig cAMP, welches sich mit dem Transkriptionsregulator Crp (welcher hoch homolog zu PrfA ist) verbindet und an die Promotorregion der Zielgene bindet, wobei die Genauigkeit der Konsensussequenz in der Bindestelle bestimmt, wieviel cAMP-Crp für die Transkriptionsinitiation benötigt wird (Busby and Ebright, 1999; Deutscher, 2008).

Angesichts der 29 kompletten PTS und den einzelnen PTS-Komponenten, die von *L. monocytogenes* EGD-e codiert werden ergaben sich zwei Fragen. Zum einen, welche der vielen PTS-Permeasen wichtig für die Glucose- bzw. Cellobioseaufnahme sind und zum anderen, ob ein Einfluss von PTS-Komponenten auf PrfA direkt nachgewiesen werden kann. In diesem Teil der Arbeit wurden die für die Glucose-, Mannose- und Cellobioseaufnahme wichtigsten PTS-Permeasen identifiziert und es konnte gezeigt werden, dass Komponenten dieser PTS in die Regulierung der Aktivität des zentralen Virulenzgenregulators PrfA involviert sind.

### E.3.1 Betrachtung verschiedener PTS-Deletionsmutanten

B. Joseph konnte mit Microarraydaten von EGD-e nach Wachstum in MM mit 50 mM Glucose und BHI zeigten, dass in MM im Vergleich zu BHI viele PTS-Gene herunterreguliert sind, so zum Beispiel  $\text{PTS}^{\text{Glc}}$ (lmo0027) oder  $\text{PTS}^{\text{Man}}$ (lmo0096-0098) und  $\text{PTS}^{\text{Man}}$ (lmo0781-0784). Gleichzeitig sind die PrfA-abhängigen Virulenzgene hochreguliert. Die unter D.2 erhaltenen Daten zeigten für den *L. monocytogenes* Wildtyp EGD die Expressionsstärke der PTS-Komponenten nach Wachstum in MM mit Glucose und Cellobiose, sowie in BHI. Da die Arbeit mit dem EGD-e Wildtyp weitergeführt wurde, wurde die Expressionsstärke einiger in EGD auffälliger PTS-Permeasen mit EGD-e in Real-Time-PCR quantitativ getestet.

Die RT-PCR-Daten von *L. monocytogenes* EGD-e nach Wachstum in MM mit Glucose, Mannose, Cellobiose und Glycerin zeigen, dass bei Wachstum in MM mit Glucose  $\text{PTS}^{\text{Man}}$ (lmo0096-0098) die wichtigste PTS-Permease für die Glucoseaufnahme und nach Wachstum in MM mit Cellobiose  $\text{PTS}^{\text{Lac}}$ (lmo2683-2685) die wichtigste PTS-Permease für den Cellobiosetransport ist. Die Expression aller anderen PTS-Permeasen ist sehr gering, außer  $\text{PTS}^{\text{Man}}$ (lmo0781-0784), welches in allen vier untersuchten Kohlenstoffquellen gut exprimiert wird und  $\text{PTS}^{\text{Lac}}$ (lmo1719/1720), welches ebenfalls in Cellobiose gut exprimiert wird, aber auf einem geringeren Level als  $\text{PTS}^{\text{Lac}}$ (lmo2683-2685). Die  $\text{PTS}^{\text{Glc}}$  werden in Gegenwart von jeder der vier Kohlenstoffquellen nur in sehr geringem Maße exprimiert.

Zusätzlich zu den PTS-Permeasen codiert *L. monocytogenes* für mindestens zwei nicht-PTS-Glucosetransporter (codiert von lmo0169 und lmo0176): Anhand der Transkriptomdaten ist jedoch zu erkennen, dass diese Gene sowohl im Wildtyp als auch in den untersuchten Mutanten bei Wachstum in MM mit 10 mM Glucose kaum exprimiert sind. Offenbar spielen sie für den Glucosetransport keine Rolle, was mit den Daten der *ptsH*-Insertionsmutante übereinstimmt, die nicht mehr in der Lage ist, PTS-Permeasen zu phosphorylieren und auf Glucose zu wachsen (Mertins *et al.*, 2007; Stoll *et al.*, 2008).

#### E.3.1.1 Beta-Glucosid spezifische Phosphotransferasesysteme

Nach der Genomanalyse von Glaser *et al.* (2001) konnte in *L. monocytogenes* EGD-e kein vollständiges Glucose-spezifisches PtsG detektiert werden, lediglich ein  $\text{EIIA}^{\text{Glc}}$  (codiert von lmo1017) konnte nachgewiesen werden. Glucose kann jedoch auch über Beta-Glucosid-PTS aufgenommen werden, welche daher auch zur  $\text{PTS}^{\text{Glc}}$ -Familie zählen (Postma *et al.*, 1993). Für vollständige Beta-Glucosid-spezifische PTS codieren die Gene lmo0027, lmo0738, lmo1035, lmo2772 und lmo2787. Diese fünf  $\text{PTS}^{\text{Glc}}$ -Permeasen in *L. monocytogenes* sind hoch homolog zum  $\text{PTS}^{\text{Glc}}$  in *E. coli* (Gulati and Mahadevan, 2000). Von Barabote und Saier (2005) wurden insgesamt sechs vollständige  $\text{PTS}^{\text{Glc}}$  annotiert und nach weiteren BLAST Untersuchungen konnte lmo1255 als hoch homolog zu Glucose-spezifischen-PTS gefunden werden, welches für ein  $\text{EIIBC}^{\text{Glc}}$  codiert und möglicherweise mit  $\text{EIIA}^{\text{Glc}}$  (lmo1017) interagiert.

Die  $\text{EIIA}$ -Komponenten der genannten PTS weisen mit  $\text{EIIA}^{\text{Glc}}$  aus *E. coli* eine etwa 30%-ige Homologie auf und könnten somit ähnlich wie Crp in *E. coli* die PrfA-Aktivität in *L. monocytogenes* regulieren.

Keine der sechs PTS<sup>Glc</sup>-Permeasen wird im Wildtyp EGD-e nach Wachstum in Glucose- oder Cellobiose-haltigen Medium signifikant transkribiert, obwohl diese PTS-Permeasen die Zucker transportieren sollten (Barabote and Saier, 2005). Die Transkription von *bvrB* (lmo2787) und PTS<sup>Glc</sup> (lmo2772) ist unter der Kontrolle von Antiterminatoren. Das *bvrA*-Gen, welches für einen Antiterminator der Bgl/SacY-Familie codiert, wurde schon als essentiell für die Transkription von *bvrB* (lmo2787) beschrieben (Brehm *et al.*, 1999). Ein von lmo2773 codierter ähnlicher Antiterminator konnte vor PTS<sup>Glc</sup> (lmo2772) identifiziert werden. Weitere Antiterminatoren konnten *in silico* nicht bestimmt werden.

Die Deletionsmutanten dieser Gene d0027, d0738, d1035, d2772, d2787, d1017 und d1255 zeigten in Wachstumsuntersuchungen in BHI, LB mit Glucose und MM mit Glucose oder Cellobiose keinen Unterschied zum Wildtyp EGD-e, lediglich d1255 wächst minimal langsamer. Die Untersuchung der <sup>14</sup>C-Glucoseaufnahme zeigte keinen Unterschied bei d0027, d0738, d1035, d2772, d2787 und d1255 im Vergleich zu EGD-e. S. Mertins konnte dies in ihrer Dissertation für d1017 ebenfalls zeigen. Offenbar sind also die PTS<sup>Glc</sup> im *L. monocytogenes* EGD-e Wildtyp nicht vorrangig für die Glucoseaufnahme zuständig.

Auf die PrfA-Aktivität hatte die Deletion der PTS<sup>Glc</sup> fast keine Auswirkung, da sich die Menge an Listeriolysin in den Deletionsmutanten nur gering vom Wildtyp unterschied.

Von Brehm *et al.* (1999) konnte gezeigt werden, dass eine Insertion in lmo2787 die PrfA-Aktivität erhöht. Es ist möglich, dass die Regulation von zumindest einigen *pts*-Genen und Operons zwischen den verschiedenen listeriellen Stämmen variieren kann (Brehm *et al.*, 1999; Parker and Hutkins, 1997). Zum Beispiel zeigten Brehm *et al.* (1999), dass in *L. monocytogenes* NCTC 7973 die Transkription von *bvrB* (codiert von PTS<sup>Glc</sup> (lmo2787)) von Cellobiose induziert wird und eine Mutation in *bvrB* zu einer verringerten Wachstumsrate in Cellobiose-haltigem LB. Dies ist eindeutig nicht der Fall bei EGD-e, da die Deletion von lmo2787 keinerlei Effekt zeigte, unabhängig, ob das Wachstum in BHI, LB oder MM mit Cellobiose durchgeführt wurde. Diese Stammvariation könnte auch die Ursache dafür sein, dass in der *bvrB*-Mutante von NCTC 7973 eine deutliche Erhöhung der PrfA-Aktivität beobachtet werden konnte, wohingegen d2787 von EGD-e eine zum Wildtyp kaum veränderte PrfA-Aktivität zeigte.

Ebenso konnten in EGD-e der von Parker und Hutkins (1997) in ScottA festgestellte Glucosetransport über Protonentransporter mit geringer Affinität zu Glucose nicht nachgewiesen werden, da eine *ptsH*-Mutante in MM mit Glucose als einziger Kohlenstoffquelle nicht mehr wächst (Mertins *et al.*, 2007) und wie schon zuvor erwähnt die beiden möglichen Glucosetransporter in keiner untersuchten PTS-Mutante und auch nicht in der *ptsH*-Mutante hochreguliert werden (Daten von *::ptsH* nicht gezeigt).

Die Ergebnisse zeigen deutlich, dass die PTS-Komponenten der PTS<sup>Glc</sup> in *L. monocytogenes* weder einen primären Einfluss auf die Glucoseaufnahme noch auf die PrfA-Aktivität haben. Daher gilt die für *E. coli* gezeigte Regulation von EIIA<sup>Glc</sup> an Crp nicht für PrfA in *L. monocytogenes*. Dies war nach den Genexpressionsdaten in den verschiedenen Zuckern auch nicht zu erwarten, da die PTS<sup>Glc</sup> in allen untersuchten Medien nur schwach exprimiert werden.

### E.3.1.2 Mannose-spezifische Phosphotransferasesysteme

Von den vier in *L. monocytogenes* annotierten Mannose-spezifischen PTS-Permeasen wurden Einzeldelentionsmutanten (d0021-4, d0096-8, d0781-4 und d1997/2000-2) sowie eine Deletionsmutante aller vier Mannose-PTS-Permeasen (ManPTS) hergestellt und ihr Wachstum in verschiedenen Medien, die PrfA-Aktivität, die Glucoseaufnahme sowie ihr Verhalten *in vivo* getestet.

Die Deletionsmutanten d1997/2000-2 und d0021-4 zeigten in allen untersuchten Medien keinen deutlichen Unterschied zum Wildtyp im Wachstum, in der PrfA-Aktivität und <sup>14</sup>C-Glucoseaufnahme. Diese Daten zeigen deutlich, dass PTS<sup>Man</sup>(lmo1997/2000-2002) und PTS<sup>Man</sup>(lmo0021-0024) in EGD-e eine untergeordnete Rolle spielen, was auch mit der Beobachtung übereinstimmt, dass beide im Wildtyp kaum exprimiert werden.

Der Einfluss von PTS<sup>Man</sup>(lmo0781-0784) auf den Glucosetransport ist schwer zu deuten, da die Deletion von PTS<sup>Man</sup>(lmo0781-0784) zu einem kompletten Verlust der Transkription von PTS<sup>Man</sup>(lmo0096-0098) führt. Im Gegensatz dazu führt die Deletion von PTS<sup>Man</sup>(lmo0096-0098) zu einem Anstieg der Expression von PTS<sup>Man</sup>(lmo0781-0784). In der d0096-8-Mutante ist die Glucoseaufnahme stark reduziert, trotzdem wächst die Mutante nach etwas längerer Lag-Phase mit ähnlicher Replikationsgeschwindigkeit wie der Wildtyp. Dies liegt aber weniger an der erhöhten Expression von PTS<sup>Man</sup>(lmo0781-0784), da eine PTS<sup>Man</sup>-Komplettdeletionsmutante ähnlich wächst wie d0096-8, sondern vielmehr an der stark erhöhten Expression von PTS<sup>Glc</sup>(lmo0027) in d0096-8 und vor allem der ManPTS-Deletionsmutante. Offenbar scheint PTS<sup>Glc</sup>(lmo0027) neben PTS<sup>Man</sup>(lmo0096-0098) die wichtigste PTS-Permease zur Glucoseaufnahme in *L. monocytogenes* EGD-e zu sein. Unterstützt wird diese Annahme noch dadurch, dass PTS<sup>Glc</sup>(lmo0027) die einzige Beta-Glucosid-spezifische PTS ist, welches in *L. innocua* exprimiert wird und auch in den anderen Listerienarten ist diese PTS-Permease zu finden und somit offenbar für Listerien wichtig.

Die PTS-Microarray-Analyse von d0027 nach Wachstum in MM mit 10 mM Glucose zeigt im Vergleich zum Wildtyp keine Veränderung im Genexpressionsmuster, ebenso wie die Deletion von lmo0027 in d0096-8 im Vergleich zum Expressionsmuster von d0096-8. Die zusätzliche Deletion von PTS<sup>Glc</sup>(lmo0027) in ManPTS führt zu einer starken Reduktion der Wachstumsrate in Gegenwart von 10 mM Glucose, jedoch nicht zu einem kompletten Wachstumsstopp. Nach einer langen Lag-Phase werden die Gene für PTS<sup>Glc</sup>(lmo2772), PTS<sup>Lac</sup>(lmo2683-2685) und PTS<sup>Lac</sup>(lmo2708) verstärkt exprimiert. Die zusätzliche Deletion dieser PTS-Permeasen führte jedoch nicht zu einer Mutante, die nicht mehr auf Glucose wachsen kann, sondern zu einer stärkeren Expression anderer PTS-Permeasen, so zum Beispiel PTS<sup>Glc</sup>(lmo0738) in der ManPTS d0027 d2683-5 Mutante. Diese scheinen alle (wenn auch mit unterschiedlicher Effizienz) in der Lage zu sein, Glucose aufnehmen zu können. So verringert sich zwar die Replikationsrate von *L. monocytogenes* mit jeder Deletion, aber die Vielzahl an offenbar vielseitigen PTS-Permeasen ermöglicht es immer wieder, neue Permeasen für den Glucosetransport zu exprimieren.

Die Ergebnisse passen zu dem schon zuvor aufgestellten Modell der Regulation der PrfA-Aktivität, nach dem die während der PTS-Zuckeraufnahme unphosphorylierten EIIA- oder B-Komponenten mit PrfA interagieren und es inhibieren. So scheint vor allem das von lmo0096 codierte EIIA/B wichtig für die Regulation der PrfA-Aktivität zu sein. Nach der Deletion von PTS<sup>Man</sup>(lmo0096-0098) steigt die PrfA-Aktivität an, da PrfA nicht mehr mit lmo0096

interagieren und inhibiert werden kann. Es ist jedoch noch nicht klar, wieso die Deletion von PTS<sup>Man</sup>(Imo0781-0784) keine aktivierende Wirkung auf PrfA hat, sondern eher eine inhibierende. Möglicherweise hemmt das unphosphorylierte Protein Lmo0096 PrfA und das EIIA/B von PTS<sup>Man</sup>(Imo0781-0784) erhöht die PrfA-Aktivität.

Eine von Arous *et al.* (2004) hergestellte *rpoN* Mutante, welche nicht mehr für den Stress-Sigmafaktor 54 codiert, zeigt in Macroarray- und 2-D-Gelanalysen eine Vielzahl von Modifikationen im Kohlenhydratstoffwechsel. Da die Mutation von *rpoN* vor allem das *mpt*-Operon (Imo0096-0098) beeinflusst gehen die Autoren davon aus, dass die Herunterregulation von *mpt* auf etwa 0,2 die Veränderungen im Kohlenhydratstoffwechsel verursacht. Interessanterweise hatte die *rpoN* Mutante im Mausmodell keinen zum Wildtyp verschiedenen Phänotyp. Dies stimmt auch mit unseren Beobachtungen überein, dass d0096-8 in J774-Makrophagen keine Erhöhung der Virulenz zeigt. In J774-Zellen verläuft die Glycolyse sehr schnell und effizient, so dass Glucose-6-Phosphat in der Zelle kaum frei verfügbar ist und die Listerien verwerten vor allem Glycerin als Kohlenstoffquelle (Eylert *et al.*, 2008; Joseph *et al.*, 2006). Trotzdem spielt auch G-6-P in der Zelle eine Rolle im Kohlenstofftransport, da das *hpt*-Gen unter Kohlenstoffkatabolitrepression steht und somit in Wirtszellen verstärkt exprimiert wird (Mertins *et al.*, 2007) und da eine *uhpt*-Mutante in der Zelle schlechter repliziert als der Wildtyp (Chico-Calero *et al.*, 2002).

Um die Hypothesen der Regulation der PrfA-Aktivität zu unterstützen, wurden von d0096-8, d0781-4 und ManPTS Genexpressionsdaten nach Wachstum in MM mit 10 mM Glucose bis zur mittleren logarithmischen Phase mit Hilfe der PTS-Microarrays erstellt. Die Daten zeigten eine leicht erhöhte *prfA*-Expression in d0096-8 und ManPTS im Vergleich zu d0781-4 und EGD-e. Von den PrfA-abhängigen Virulenzgenen war in allen drei Mutanten die *uhpT* Expression besonders erhöht. Möglicherweise ist der Hexose-Phosphat-Transporter als Reaktion auf die verringerte Fähigkeit der Zuckeraufnahme aktiviert.

Im Test der hämolytischen Aktivität zeigt die Mutante ManPTS d0027 im Vergleich zu ManPTS keine Erhöhung der PrfA-Aktivität, obwohl die PTS-Microarray-Expressionsdaten einen deutlichen Anstieg der PrfA-Aktivität erkennen lassen. Dieser Unterschied ist vermutlich methodisch bedingt. Betrachtet man *L. monocytogenes* EGD-e und die Deletionsmutanten mikroskopisch (Daten nicht gezeigt) so erkennt man, dass je mehr PTS-Permeasen deletiert werden, die Bakterien deutlich erkennbare Aggregate bilden. Diese können nun weniger LLO in den Überstand abgeben als weniger agglutinierte Bakterien. Daher kann im Hämolyseassay die vermutlich hohe PrfA-Aktivität unter diesen Bedingungen nicht nachgewiesen werden.

Eine Erhöhung der PrfA-Aktivität in ManPTS d0027 d2683-5 und ManPTS d0027 d2683-5 d2708 im Vergleich zu ManPTS d0027 nach Wachstum in MM mit Glucose ist im Hämolysetest nicht nachweisbar, vermutlich auf Grund der eben beschriebenen Agglutination der Bakterien. Die Virulenzgenexpression im Microarray ist im Vergleich zum Wildtyp stark hochreguliert. Nur *inlA* und *inlB* sind herunterreguliert, was möglicherweise mit einer veränderten Expression des Stress-Sigmafaktors  $\sigma^{54}$  zusammenhängt (Rauch *et al.* 2005). Da dieses Gen auf dem PTS-Microarray nicht vorhanden ist kann dazu keine genaue Aussage gemacht werden. Zudem werden *inlA* und *inlB* nur teilweise PrfA-abhängig transkribiert.

*In vivo* zeigen die Deletionsmutanten aber interessanterweise trotz der starken Aktivierung der Virulenzgene wie schon die PTS<sup>Man</sup>-Einzeldelentionsmutanten keinen Unterschied im

Vergleich zum Wildtyp. Nur die verringerte Invasion in J774 Zellen auf Grund des schlechteren Wachstums in RPMI Medium und der Runterregulation von *inlA* und *inlB* ist zu beobachten.

### E.3.1.3 Cellobiose-spezifische Phosphotransferasesysteme

Für die Expression der Cellobiose-spezifischen PTS scheint es eine ähnliche Hierarchie zu geben wie bei den Glucose-spezifischen PTS. Die am stärksten exprimierten *pts*-Gene in *L. monocytogenes* nach Wachstum in MM mit 50 mM Cellobiose sind PTS<sup>Lac</sup>(lmo2683-2685) und PTS<sup>Lac</sup>(lmo1719/1720). Der Cellobiosetransport wird jedoch vor allem von PTS<sup>Lac</sup>(lmo2683-2685) durchgeführt, da die d2683-5 Deletionsmutante eine deutliche Reduktion der Wachstumsrate zeigt, wohingegen die Aufgabe von PTS<sup>Lac</sup>(lmo1719/1720) in der Cellobioseaufnahme unklar ist, da d1719/1720 wie der Wildtyp wächst.

Wie schon in den Glucose-Mutanten ist auch in der d2683-5-Mutante PTS<sup>Glc</sup>(lmo0027) stark hochreguliert, was andeutet, dass PTS<sup>Glc</sup>(lmo0027) auch Cellobiose aufnehmen kann. Verstärkt wird diese Vermutung dadurch, dass die Doppelmutante d2583-5 d0027 sehr viel schlechter in Cellobiose-haltigem MM wächst als der Wildtyp und auch als d2683-5. *In vivo* spielt die Cellobioseaufnahme keine Rolle, da d2683-5 wie der Wildtyp in J774 Zellen invadiert und repliziert.

Die PrfA-Aktivität ist in der frühen und mittleren logarithmischen Phase nur etwa zweifach erhöht. Jedoch zu Beginn der stationären Phase, wenn das in d2683-5 stark exprimierte Lmo0096 vermutlich phosphoryliert vorliegt, ist die PrfA-Aktivität sehr hoch. Lmo0096 wird in Cellobiose-haltigem Medium normal nur wenig exprimiert, ist jedoch in d2683-5 stark hochreguliert. Die Deletion von PTS<sup>Glc</sup>(lmo0027) hat auf die PrfA-Aktivität keinen verstärkenden Einfluss, weshalb davon ausgegangen werden kann, dass die stark erhöhte Menge Lmo0027 in d2683-5 nicht für die erhöhte PrfA-Aktivität verantwortlich ist.

### E.3.1.4 Auswirkung der PRD-enthaltenden Transkriptionsaktivatoren

Frühere Arbeiten (Arous *et al.*, 2004a; Dalet *et al.*, 2001; Dalet *et al.*, 2003) konnten zeigen, dass PTS<sup>Man</sup>(lmo0096-0098) (*mpt*), PTS<sup>Man</sup>(lmo0781-0784) (*mpo*) und PTS<sup>Lac</sup>(lmo1719/1720) (*lpo*) abhängig vom  $\sigma^{54}$ -Faktor und den Transkriptionsaktivatoren ManR bzw. LacR transkribiert werden. Beide Transkriptionsaktivatoren gehören zur LevR-Familie von PRD-enthaltenden Transkriptionsaktivatoren in *B. subtilis*. Die Deletion von *mpo*, *mpt* oder *lpo* hatte auf *L. monocytogenes* keinen Effekt bei Wachstum in LB mit einer hohen Konzentration an Glucose/Mannose oder Cellobiose/Lactose (Dalet *et al.*, 2001; Dalet *et al.*, 2003).

Eine *in silico*-Analyse der *pts*-Operons von *L. monocytogenes* EGD-e ergab, dass die meisten dieser Operons upstream des ersten Gens für putative PRD-Regulatoren codieren (Tabelle 18 im Anhang). Die meisten dieser Gene besitzen hohe Homologie in ihrer PRD-I, PRD-II und anderen Teilen mit den Transkriptionsaktivatoren LevR, LicR oder ManR aus *B. subtilis*.

Die LevR-Homologe ManR und LacR aus *L. monocytogenes* (im Folgenden als LevR<sub>L</sub>-I und LevR<sub>L</sub>-II bezeichnet) werden von lmo0785 (upstream von PTS<sup>Man</sup>(lmo0781-0784)) und lmo1721 (upstream von PTS<sup>Lac</sup>(lmo1719/1720)) codiert. Die Umbenennung der zwei listeriellen Aktivatoren ist notwendig, da die zwei Proteine LevR-ähnlich sind und zusätzlich im listeriellen auch LicR- und ManR-Homologe (Greenberg *et al.*, 2002) zu finden sind (siehe Tabelle 18) und Verwechslungen ausgeschlossen werden sollten. LevR<sub>L</sub>-I und LevR<sub>L</sub>-II

werden beide konstitutiv (offenbar  $\sigma^{70}$ -abhängig) produziert, da keine differentielle Transkription der Gene *lmo0785* und *lmo1721* in der Anwesenheit von Glucose, Cellobiose oder Glycerin beobachtet werden konnte (Joseph *et al.*, 2008).

Arous *et al.* (2004) haben angenommen, dass *LevR<sub>L</sub>-I* die Transkription der zwei Operons  $\text{PTS}^{\text{Man}}(\text{lmo0096-0098})$  und  $\text{PTS}^{\text{Man}}(\text{lmo0781-0784})$  aktiviert. Interessanterweise zeigten die in dieser Arbeit erstellten Daten, dass in der d0781-4-Deletionsmutante  $\text{PTS}^{\text{Man}}(\text{lmo0096-0098})$  nicht mehr exprimiert wird, obwohl *lmo0785* intakt ist, wohingegen die Deletion von  $\text{PTS}^{\text{Man}}(\text{lmo0096-0098})$  zu einer erhöhten Expression von  $\text{PTS}^{\text{Man}}(\text{lmo0781-0784})$  führt.

Die Transkription des  $\text{PTS}^{\text{Man}}(\text{lmo0781-0784})$ -Operons wird zwar von *LevR<sub>L</sub>-I* aktiviert, aber das Substrat Glucose (oder Mannose) wird im Gegensatz zu  $\text{PTS}^{\text{Man}}(\text{lmo0096-0098})$ , welches substratspezifisch für Glucose und Mannose ist (Dalet *et al.*, 2001; Xue and Miller, 2007), nicht benötigt. Die Real-Time-PCR-Daten zeigen, dass  $\text{PTS}^{\text{Man}}(\text{lmo0781-0784})$  auch in der Gegenwart von Cellobiose und Glycerin mit gleicher Intensität exprimiert wird wie in Glucose. Diese Daten deuten darauf hin, dass aktives *LevR<sub>L</sub>-I* funktionell aktives  $\text{PTS}^{\text{Man}}(\text{lmo0781-0784})$  benötigt, da in der d0781-4 Mutante kein  $\text{PTS}^{\text{Man}}(\text{lmo0096-0098})$  mehr exprimiert wird, obwohl das *lmo0785*-Gen in dieser Mutante noch intakt ist. Möglicherweise benötigt *LevR<sub>L</sub>-I* eine Phosphorylierung von EIIB-P (*lmo0783*) an seiner PRD um aktiv sein zu können (Studholme and Dixon, 2003; Stülke *et al.*, 1998), ähnlich dem Mechanismus in *L. innocua*, wo *Lin0142* benötigt wird um *LevR<sub>L</sub>-I* zu aktivieren (Xue and Miller, 2007). Dies erklärt, dass in d0096-8 mehr  $\text{PTS}^{\text{Man}}(\text{lmo0781-0784})$  gebildet wird, da *lmo0783* zum Phosphorylieren von *LevR<sub>L</sub>-I* vorhanden ist, wohingegen in d0781-4 *lmo0783* fehlt und so die *LevR<sub>L</sub>-I*-abhängige Expression von  $\text{PTS}^{\text{Man}}(\text{lmo0096-0098})$  nicht mehr gewährleistet ist.

Die Transkription von  $\text{PTS}^{\text{Lac}}(\text{lmo2683-2685})$  und  $\text{PTS}^{\text{Lac}}(\text{lmo1719/1720})$  erfolgt  $\sigma^{54}$ - und *LevR<sub>L</sub>-II*-abhängig, wobei letzteres von *lmo1721* codiert wird. Die Deletion von  $\text{PTS}^{\text{Lac}}(\text{lmo1719/1720})$  führt zu einer erhöhten Expression von  $\text{PTS}^{\text{Lac}}(\text{lmo2683-2685})$ , wohingegen in d2683-5 die Expression von  $\text{PTS}^{\text{Lac}}(\text{lmo1719/1720})$  herunterreguliert ist. Dies deutet an, dass die Aktivität von *LevR<sub>L</sub>-II* von *lmo2684*, der EII-B-Komponente dieses PTS abhängig ist, ähnlich wie *LevR<sub>L</sub>-I* von *lmo0783* abhängig zu sein scheint. In d1719/1720 wird  $\text{PTS}^{\text{Lac}}(\text{lmo2683-2685})$  nicht nur nach Wachstum in Cellobiose, sondern auch nach Wachstum in Glucose hochreguliert, was darauf hindeutet, dass Glucose zu einem gewissen Maß auch *LevR<sub>L</sub>-II* aktivieren kann, was die Aktivierung von  $\text{PTS}^{\text{Lac}}(\text{lmo2683-2685})$  in der Mutante *ManPTS* d0027 selbst in Gegenwart von Glucose erklären könnte.

Milenbachs-Lukowiak *et al.* (2004) haben eine Mutante erstellt, die in *lmo1721* zu einem Basenaustausch von C in T in der Position 1687 führt, wodurch ein Stopp-Codon entsteht. *LevR<sub>L</sub>-II* ist dadurch nur noch 562 statt 892 Aminosäuren lang und nicht mehr voll funktionsfähig. Die in der *csr*-Mutante zu beobachtende Erhöhung Lecithinase- und Listeriolysin-Produktion im Vergleich zum Wildtyp korreliert mit den in dieser Arbeit erhaltenen Daten. Da neben  $\sigma^{54}$  auch *LevR<sub>L</sub>-II* notwendig ist um  $\text{PTS}^{\text{Lac}}(\text{lmo1719/1720})$  und  $\text{PTS}^{\text{Lac}}(\text{lmo2683-2685})$  zu transkribieren, werden in der *csr*-Mutante diese beiden PTS-Permeasen nicht mehr produziert. Dies resultiert, wie in d2683-5, in einer Erhöhung der PrfA-Aktivität, da PrfA bei Wachstum in Cellobiose-haltigem Medium nicht mehr durch  $\text{EIIA}^{\text{Lac}}$  inhibiert werden kann und  $\text{EIIA/B}^{\text{Man}}$  nicht produziert wird. Die Erhöhung der PrfA-Aktivität ist bei der *csr*-Mutante nicht so stark wie bei d2683-5, was an der Auswahl des Mediums liegt. In dieser Arbeit wurden die Mutanten in MM mit nur einer Zuckerquelle betrachtet und



Milenbachs-Lukowiak *et al.* (2004) haben die *csr*-Mutante in BHI oder LB wachsen lassen. Es konnte in dieser Arbeit jedoch auch gezeigt werden, dass in BHI und LB PTS<sup>Man</sup>(lmo0096-0098) noch exprimiert wird, das nach der aufgestellten Hypothese einen inhibierenden Effekt auf die PrfA-Aktivität haben könnte

Wie schon zuvor gezeigt werden konnte (Joseph *et al.*, 2008; Mertins *et al.*, 2007), stehen einige *pts*-Gene und -Operons unter Kohlenstoffkatabolitrepression (CCR), da ihre Transkription in einer *ccpA*- und *hprK*-Insertionsmutante nach Wachstum in MM mit Glucose erhöht ist (siehe Tabelle 18) oder im Wildtyp nach Wachstum in Glycerin-haltigem MM. Einige dieser Gene sind auch in d0096-8 nach Wachstum in MM mit Glucose induziert, jedoch in weitaus geringerem Maße als PTS<sup>Glc</sup>(lmo0027), was andeutet, dass die Repression von PTS<sup>Glc</sup>(lmo0027) im Wildtyp auf anderen Mechanismen als der CCR beruht.

Die Transkription von PTS<sup>Glc</sup>(lmo0027) ist stark erhöht, wenn entweder PTS<sup>Man</sup>(lmo0096-0098), PTS<sup>Man</sup>(lmo0781-0784) oder PTS<sup>Lac</sup>(lmo2683-2685) deletiert sind. In Abwesenheit von *rpoN*, das für den  $\sigma^{54}$ -Faktor codiert, welcher für die Transkription von PTS<sup>Man</sup>(lmo0096-0098), PTS<sup>Man</sup>(lmo0781-0784) und PTS<sup>Lac</sup>(lmo2683-2685) ebenfalls benötigt wird, ist die Transkription von PTS<sup>Glc</sup>(lmo0027) ebenfalls erhöht (Arous *et al.*, 2004a). PTS<sup>Glc</sup>(lmo0027) war auch schon in der spontan entstandenen Deletionsmutante von *mpt* hochreguliert (Dalet *et al.*, 2001). Dies könnte ein indirekter Effekt der *rpoN*-Mutation sein, da PTS<sup>Glc</sup>(lmo0027) auf Grund einer upstream liegenden *cre*-Box unter Katabolitrepression zu stehen scheint. Die von Arous *et al.* (2004) beobachtete Hochregulation der in den Glycerinmetabolismus involvierten Gene *glpD*, *glpF* und *lmo1538* scheint jedoch eine direkte Auswirkung der *rpoN* Insertion zu sein, da dieses Phänomen bei der in dieser Arbeit erstellten Mutante d0096-8 nicht auftritt.

Da offenbar Lmo0783 und Lmo2684 für die Substratspezifität von LevR<sub>L</sub>-I und LevR<sub>L</sub>-II notwendig sind, da sie die Transkriptionsfaktoren an ihren PRDs phosphorylieren und so aktivieren, kann man davon ausgehen, dass die Transkription von PTS<sup>Glc</sup>(lmo0027) entweder negativ von LevR<sub>L</sub>-I und LevR<sub>L</sub>-II kontrolliert wird oder einen Aktivator benötigt, der nur in Abwesenheit von LevR<sub>L</sub>-I und LevR<sub>L</sub>-II aktiv ist. Zudem steht PTS<sup>Glc</sup>(lmo0027) auch unter CCR. Arous *et al.* (2004) stellten anhand ihrer Daten und dem bekannten Mechanismus aus *B. subtilis* (Deutscher, 2008) die Hypothese auf, dass die Abnahme der *mpt* Expression möglicherweise in einer erhöhten Menge HPr-His-P resultiert, was zu einer Phosphorylierung der GlpK oder PTS-Komponenten führt und zu einer Abnahme an HPr-Ser-P, was wiederum zu einer Verringerung der CCR führt, wodurch mehr PTS<sup>Glc</sup>(lmo0027) gebildet wird. Eine solche Regulation anderer PTS-Permeasen durch Mannose-spezifische PTS wurde schon zuvor als Teil der CCR in *Streptococcus salivarius* und *Lactobacillus pentosus* beschrieben (Bourassa and Vadeboncoeur, 1992; Chaillou *et al.*, 2001)

Die Transkription der wichtigsten PTS-Permeasen für Glucose und Cellobiose hängt also eng mit PRD-enthaltenden Proteinen zusammen. Da die Deletionen von PTS<sup>Man</sup>(lmo0096-0098) und PTS<sup>Lac</sup>(lmo2683-2685) auch einen starken Einfluss auf die PrfA-Aktivität haben, wäre es auch denkbar, dass aktive PRD-enthaltenden Transkriptionsaktivatoren einen hemmenden Einfluss auf die PrfA-Aktivität haben. Denn so lange das entsprechende Substrat Glucose oder Cellobiose aufgenommen wird, sind LevR<sub>L</sub>-I und LevR<sub>L</sub>-II aktiv und könnten gleichzeitig auch PrfA inaktivieren. Wächst *L. monocytogenes* nun aber in Glycerin-haltigem Medium, so sind LevR<sub>L</sub>-I und LevR<sub>L</sub>-II inaktiv und gleichzeitig erhöht sich die PrfA-Aktivität.

Diese Annahme wird jedoch von der Tatsache entkräftet, dass in d0096-8 LevR<sub>L</sub>-I aktiv ist, da eine erhöhte Menge an PTS<sup>Man</sup>(lmo0781-0784) gebildet wird, gleichzeitig steigt die PrfA-Aktivität beträchtlich an.

## E.4 Interaktion verschiedener EII Proteine mit PrfA

Die Deletion der PTS-Gene, die Untersuchung der Hoch- bzw. Herunterregulation verschiedener PTS-Gene nach Wachstum in definierten Kohlenstoffquellen und die mögliche Auswirkung auf die PrfA-Aktivität gaben bisher nur Hinweise für ein Modell, nach dem PrfA von Komponenten der PTS-Permeasen reguliert wird, aber keine eindeutigen Beweise. S. Müller-Altrock konnte in Biacore Versuchen zuvor eine sehr schwache Interaktion von PrfA mit Lmo1017 nachweisen. Um die Daten zu unterstützen wurden zusätzlich zu den schon vorhandenen PrfA<sub>nt</sub> und PrfA-Proteinen die Proteine Lmo0096 (EIIA/B<sup>Man</sup>), Lmo0783 (EIIB<sup>Man</sup>) und Lmo2685 (EIIA<sup>Lac</sup>) isoliert.

Die Proteine waren ausgewählt worden, da die PTS-Permeasen im Wildtyp stark exprimiert werden und die Deletion dieser PTS-Gene den stärksten Effekt auf die PrfA-Aktivität hatte. Die EIIA- und EIIB-Komponenten dieser PTS waren nach putativen Histidin-Phosphorylierungsstellen *in silico* untersucht worden, über die sie direkt mit PrfA interagieren könnten. Von S. Müller-Altrock wurden zusätzlich noch Lmo1017 (EIIA<sup>Glc</sup>) und Lmo2259 (EIIA<sup>Lac</sup>) aufgereinigt. Außer PrfA<sub>nt</sub> sind alle mit einem 6xHis-Tag kloniert.

Zunächst wurde versucht, mittels Immunpräzipitation eine Interaktion zwischen Lmo0096 und PrfA nachzuweisen. Nach Auftrennung in einem SDS-Page konnte mit den Antikörpern  $\alpha$ -PrfA und mit  $\alpha$ -Lmo0096 auf Höhe von etwa 75 kDa eine Bande identifiziert werden, die nur bei den Proben auftritt, wo PrfA und Lmo0096 gemeinsam inkubiert wurden. Es ist jedoch schwierig einzuschätzen, was genau diesen Komplex ausmacht, da Lmo0096 etwa 35 kDa schwer ist und PrfA 27 kDa. Selbst angesichts der üblichen Ungenauigkeit der Marker, ergeben keine denkbaren Komplexe dieser zwei Proteine ein Produkt von etwa 75 kDa.

In EMSA-Studien konnte gezeigt werden, dass eine mögliche Interaktion von PrfA und EII nicht die Bindung an die DNA oder RNAP beeinflusst. *In vitro* Transkriptionsstudien an schon zuvor beschriebenen PrfA abhängigen Promotoren (Rauch, 2003) war eine statistisch eindeutige Aktivierung der Transkriptionsinitiation mit der zehnfachen molaren Menge an Lmo0096 und Lmo1017 im Vergleich zu PrfA zu erkennen. Stefanie Müller-Altrock konnte zeigen, dass in der *in vitro* Transkription molare Mengen an Lmo1017, die deutlich geringer im Vergleich zu PrfA konzentriert waren, die PrfA-abhängige Transkriptionsinitiation nicht verstärken. Mit Lmo2685, Lmo0783 und Lmo2259 konnte keine eindeutige Aktivierung der Transkriptionsinitiation festgestellt werden.

Phosphorylierungsanalysen haben gezeigt, dass Lmo1017 und Lmo0096 aus *E. coli* in einem Gemisch aus phosphoryliertem und unphosphoryliertem Protein aufgereinigt werden, vermutlich auf Grund der hohen Homologie der zwei Proteine zu den äquivalenten Proteinen in *E. coli*. Daher kann man davon ausgehen, dass je mehr phosphoryliertes EIIA und/oder EIIB in die Reaktion gegeben wird, es umso leichter unphosphoryliertes EII von PrfA verdrängt oder selbst an PrfA bindet und somit die Transkription aktiviert.

Lmo0096 wurde nun unter der Kontrolle seines eigenen Promotors auf dem High-copy Plasmid pERL3 in *L. monocytogenes* EGD-e und d0096-8 exprimiert und die Auswirkung auf

Wachstum und Hämolyse untersucht. Da das reine pERL3 Plasmid in EGD-e und d0096-8 nur eine leichte Verringerung der Generationszeit und der PrfA-Aktivität zeigt kann der Effekt des Plasmids vernachlässigt werden. Die Expression von lmo0096 auf dem High-copy-Plasmid pERL3 in EGD-e führt zu einer mehr als doppelt so langen Generationszeit und das Eintreten in die stationäre Phase geschieht schon bei einer  $OD_{600nm}$  von 0,8. Wird lmo0096 in d0096-8 exprimiert verlängert sich die Generationszeit fast genauso stark wie im Wildtyp, aber der Stamm ist noch in der Lage bis zu einer  $OD_{600nm}$  von 1,2 zu wachsen.

Die Ursache für die starke Wachstumsreduktion liegt vermutlich darin, dass lmo0096 unter Kontrolle seines eigenen Promotors auf dem High-copy-Plasmid exprimiert wurde. Da der lmo0096-Promotor  $\sigma^{54}$ - und LevR<sub>L</sub>-I-abhängig transkribiert wird und werden diese zwei Proteine aus der Zelle titriert und somit werden andere LevR<sub>L</sub>-I-abhängigen Gene in geringerem Maße exprimiert, was das Wachstum verringert. Die verringerte PrfA-Aktivität in den Stämmen mit pERL3 x lmo0096 ergibt sich vermutlich aufgrund des im Übermaß vorhandenen lmo0096, das von *L. monocytogenes* nicht ausreichend phosphoryliert werden kann, so PrfA bindet und es inaktiviert.

## E.5 Modell der Regulation der PrfA-Aktivität

Die Daten dieser Arbeit zeigen, dass die Deletionen von PTS<sup>Man</sup>(lmo0096-0098) und PTS<sup>Lac</sup>(lmo2683-2685) zum höchsten Anstieg der PrfA-Aktivität bei Anwesenheit von Glucose beziehungsweise Cellobiose führen. Die Deletion keines der anderen Glucose-spezifischen oder Cellobiose-spezifischen PTS hat einen vergleichbaren Effekt auf *L. monocytogenes* EGD-e, obwohl die kombinierte Deletion aller vier PTS<sup>Man</sup> zu einer weiteren Zunahme der PrfA-Aktivität führt.

Obwohl d0096-8 eine mindestens fünffach geringere Glucoseaufnahme zeigt als der Wildtyp, ist die Wachstumsrate beider Stämme in MM mit 10 mM Glucose ähnlich. Diese Daten deuten darauf hin, dass die Glucoseaufnahme nicht der limitierende Schritt für die Effizienz des Glucose-Katabolismus ist. Die Menge an katabolen Intermediaten, die sich von Glucose ableiten, sollte also in d0096-8 gleich hoch wie im Wildtyp sein. Daher scheint es unwahrscheinlich, dass diese Intermediate für die erhöhte PrfA-Aktivität in d0096-8 verantwortlich sind.

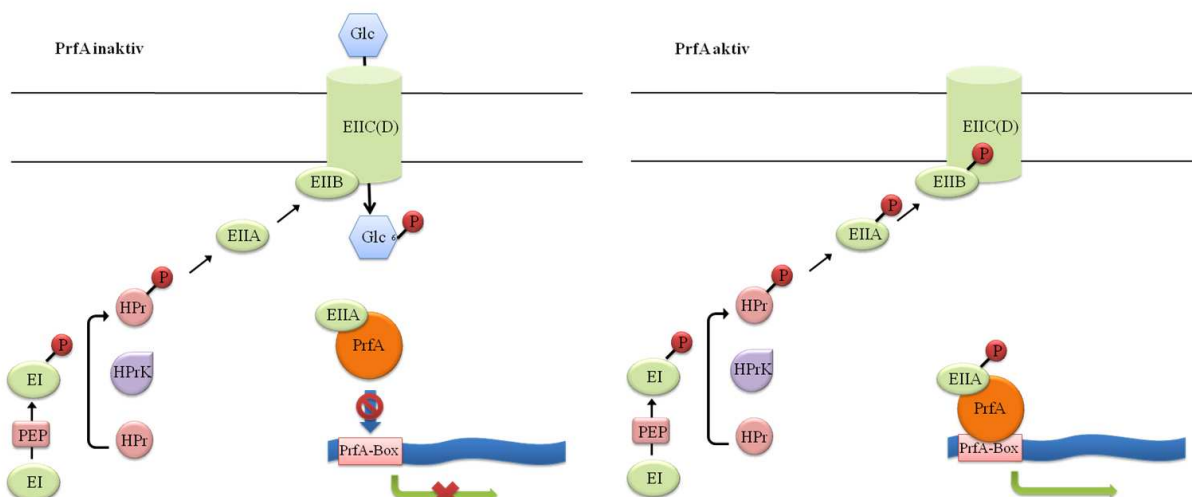
Wie schon in E.2 und anderen Arbeiten (Joseph *et al.*, 2008; Mertins *et al.*, 2007; Stoll *et al.*, 2008) diskutiert, gibt es Hinweise darauf, dass unphosphorylierte EIIA(B)-Komponenten der PTS, die während des aktiven Zuckertransportes in der Zelle überwiegen, mit niedriger PrfA-Aktivität einhergehen. Dagegen zeigt sich erhöhte PrfA-Aktivität, wenn vorwiegend phosphorylierte EIIA(B)-Komponenten der PTS in den Bakterien zu finden sind. Gleichzeitig konnte von S. Mertins in ihrer Dissertation und von S. Müller-Altrock in *in vitro*-Transkriptionsversuchen die Beteiligung von Intermediaten des Zucker-Metabolismus an der Regulation der PrfA-Aktivität ausgeschlossen werden. Auch die Komponenten der Glycerinaufnahme, Glycerin selbst und Glycerin-Abbauprodukte sind nicht direkt für die Regulation der PrfA-Aktivität zuständig (Joseph *et al.*, 2008).

Die in dieser Arbeit präsentierten Daten deuten an, dass im *L. monocytogenes* EGD-e Wildtyp besonders die EIIA(B)-Komponenten der PTS<sup>Man</sup>(lmo0096-0098) und PTS<sup>Lac</sup>(lmo2683-2685) die PrfA-Aktivität modulieren. Die Daten stimmen ebenfalls mit den früheren Beobachtungen überein, dass die PrfA-Aktivität während des aktiven Glucosetransportes eher gering ist,

besonders in der frühen logarithmischen Phase, wenn  $\text{PTS}^{\text{Man}}$ (lmo0096-0098) vorwiegend unphosphoryliert vorliegt. Die PrfA-Aktivität steigt jedoch in der stationären Phase an, wenn der Glucosetransport abnimmt und  $\text{PTS}^{\text{Man}}$ (lmo0096-0098) vorwiegend phosphoryliert vorliegt (Joseph *et al.*, 2008). Gleiches gilt für  $\text{PTS}^{\text{Lac}}$ (lmo2683-2685) während des Wachstums in Cellobiose-haltigem Medium.

Unterstützt werden die Daten dieser Arbeit zusätzlich von Ergebnissen der Gruppe von H. Ingmer. Eine Deletionsmutante von *resD* führte zu einer Herunterregulation von lmo0096 und gleichzeitiger Erhöhung der PrfA-Aktivität (Larsen *et al.*, 2006).

Wie schon zuvor diskutiert, scheint  $\text{PTS}^{\text{Glc}}$ (lmo0027) in d0096-8 den Glucosetransport und in d2683-5 den Cellobiosetransport zu übernehmen. Trotz des effizienten Wachstums der zwei Mutanten in Glucose oder Cellobiose, ist die PrfA-Aktivität höher als im Wildtyp, was andeutet, dass  $\text{PTS}^{\text{Glc}}$ (lmo0027) die PrfA-Aktivität weniger beeinflusst als  $\text{PTS}^{\text{Man}}$ (lmo0096-0098) oder  $\text{PTS}^{\text{Lac}}$ (lmo2683-2685). Da die Deletion von  $\text{PTS}^{\text{Glc}}$ (lmo0027) auf die PrfA-Aktivität von d0096-8, ManPTS und d2683-5 keinen verstärkenden Einfluss hat, kann davon ausgegangen werden, dass die stark erhöhte Menge lmo0027 in den Mutanten nicht für die erhöhte PrfA-Aktivität verantwortlich ist



**Abbildung 86 Modell der Regulation der PrfA-Aktivität in *L. monocytogenes* EGD-e.** Während des aktiven Zuckertransportes liegen die EIIA/B-Komponenten unphosphoryliert vor, interagieren direkt mit PrfA und inaktivieren dieses. Liegt in der listeriellen Umgebung kein Zucker vor, sind alle Komponenten der PTS phosphoryliert und EIIA/B-P kann mit PrfA interagieren und es aktivieren oder phosphoryliertes EIIA/B interagiert gar nicht mit PrfA und inaktiviert dieses somit auch nicht.

Basierend auf den erhaltenen Daten ist vermutlich die Interaktion von PrfA mit EIIA(B)-Komponenten von  $\text{PTS}^{\text{Man}}$ (lmo0096-0098) und  $\text{PTS}^{\text{Lac}}$ (lmo2683-2685) an erster Stelle verantwortlich für die Modulation der PrfA-Aktivität. Die unphosphorylierten EIIA- oder EII(B)-Komponenten dieser Permeasen scheinen die PrfA-Aktivität zu inhibieren, während die phosphorylierten Komponenten PrfA möglicherweise aktivieren. Diese Daten stimmen mit der starken PrfA-Inhibierung überein, die nach Überexpression von lmo0096 in EGD-e und d0096-8 auftritt. Abbildung 86 zeigt das postulierte Modell der Regulation der PrfA-Aktivität. Während des aktiven Zuckertransportes liegen die EIIA/B-Komponenten der PTS-Permeasen unphosphoryliert vor und interagieren direkt mit PrfA, welches dadurch inaktiviert wird. Ist kein freier PTS-Zucker vorhanden, zum Beispiel im intrazellulären Milieu (Joseph and Goebel, 2007), werden die PTS-Permeasen nicht benötigt und alle Komponenten der PTS

sind phosphoryliert. EIIA/B-P kann nun entweder mit PrfA interagieren und es aktivieren oder aber die PTS-Permeasen werden gar nicht erst exprimiert, können also gar nicht mit PrfA interagieren und dieses somit auch nicht inaktivieren.

## F Anhang

### F.1 Tabellen

**Tabelle 13** Vergleichende Transkriptomanalyse der Gene codierend für *prfA*, die PrfA-abhängigen Virulenzgene und aller PTS-Gene in *L. monocytogenes* EGD nach Wachstum in BHI und LB (BHI/LB), in BHI und MM (BHI/MM) und in MM und LB (MM/LB). Alle Medien waren mit 50 mM Glucose versetzt, n.a. steht für unter den Bedingungen nicht detektierbare Gene.

Genname	BHI-LB	BHI-MM	MM-LB	Annotation nach <a href="http://genolist.pasteur.fr/ListiList/">http://genolist.pasteur.fr/ListiList/</a>
<b>lmo0200</b>	4.88	0.37	20.71	<i>prfA</i> - listeriolysin positive regulatory protein
<b>lmo0201</b>	25.53	0.39	82.89	<i>plcA</i> - phosphatidylinositol-specific phospholipase c
<b>lmo0202</b>	50.77	0.61	76.12	<i>hly</i> - listeriolysin O precursor
<b>lmo0203</b>	7.89	0.39	22.90	<i>mpl</i> - Zinc metalloproteinase precursor
<b>lmo0204</b>	38.05	0.28	132.22	<i>actA</i> - actin-assembly inducing protein precursor
<b>lmo0205</b>	63.43	0.27	202.75	<i>plcB</i> - phospholipase C
<b>lmo0433</b>	6.41	0.47	39.38	<i>inlA</i> - InternalinA
<b>lmo0434</b>	5.49	0.35	19.75	<i>inlB</i> - InternalinB
<b>lmo0838</b>	4.61	0.34	10.46	<i>uhpT</i> - highly similar to hexose phosphate transport protein
<b>lmo1786</b>	3.40	0.38	8.60	<i>inlC</i> - Internalin C
<b>lmo0021</b>	1.13	1.09	0.81	similar to PTS system, fructose-specific IIA component
<b>lmo0022</b>	n.a.	n.a.	n.a.	similar to PTS system, fructose-specific IIB component
<b>lmo0023</b>	n.a.	n.a.	n.a.	similar to PTS system, fructose-specific IIC component
<b>lmo0024</b>	n.a.	n.a.	n.a.	similar to PTS system, mannose-specific IID component
<b>lmo0027</b>	1.09	1.09	2.74	similar to PTS system, beta-glucosides specific enzyme IABC
<b>lmo0034</b>	n.a.	n.a.	n.a.	similar to PTS system, cellobiose-specific IIC component
<b>lmo0096</b>	0.82	3.18	0.46	similar to PTS system mannose-specific, factor IAB
<b>lmo0097</b>	0.80	3.28	0.52	similar to PTS system mannose-specific, factor IIC
<b>lmo0098</b>	0.95	2.93	0.54	similar to PTS system mannose-specific, factor IID
<b>lmo0169</b>	0.35	1.57	0.46	similar to a glucose uptake protein
<b>lmo0176</b>	0.84	1.32	1.17	similar to a glucose uptake protein
<b>lmo0258</b>	0.88	1.21	1.24	<i>rpoB</i> - RNA polymerase (beta subunit)
<b>lmo0298</b>	n.a.	n.a.	n.a.	similar to PTS beta-glucoside-specific enzyme IIC component
<b>lmo0299</b>	0.70	1.34	0.66	similar to PTS beta-glucoside-specific enzyme IIB component
<b>lmo0301</b>	2.24	0.79	0.91	similar to PTS beta-glucoside-specific enzyme IIA component
<b>lmo0357</b>	n.a.	n.a.	n.a.	similar to PTS system, enzyme IIA component
<b>lmo0358</b>	n.a.	n.a.	n.a.	similar to PTS system, enzyme IIBC component
<b>lmo0373</b>	0.87	1.32	0.88	similar to PTS betaglucoside-specific enzyme IIC component
<b>lmo0374</b>	n.a.	n.a.	n.a.	similar to PTS betaglucoside-specific enzyme IIB component
<b>lmo0398</b>	1.64	1.03	2.66	similar to phosphotransferase system enzyme IIA
<b>lmo0399</b>	1.07	0.94	0.90	similar to fructose-specific phosphotransferase enzyme IIB
<b>lmo0400</b>	n.a.	n.a.	n.a.	similar to fructose-specific phosphotransferase enzyme IIC
<b>lmo0424</b>	n.a.	n.a.	n.a.	similar to <i>Staphylococcus xylosus</i> glucose uptake protein
<b>lmo0426</b>	0.83	0.80	1.34	similar to PTS fructose-specific enzyme IIA component
<b>lmo0427</b>	0.93	0.81	1.32	similar to PTS fructose-specific enzyme IIB component
<b>lmo0428</b>	1.35	0.77	1.90	similar to PTS fructose-specific enzyme IIC component
<b>lmo0503</b>	1.10	0.95	0.98	similar to PTS fructose-specific enzyme IIA component

Genname	BHI-LB	BHI-MM	MM-LB	Annotation nach <a href="http://genolist.pasteur.fr/ListiList/">http://genolist.pasteur.fr/ListiList/</a>
lmo0507	0.90	0.86	0.86	similar to PTS system, Galactitol-specific IIB component
lmo0508	1.32	0.87	0.75	similar to PTS system, Galactitol-specific IIC component
lmo0542	1.31	0.97	0.90	similar to PTS system, glucitol/sorbitol-specific enzyme IIA component
lmo0543	1.15	1.10	0.93	similar to PTS system, glucitol/sorbitol-specific enzyme IIBC component
lmo0544	n.a.	n.a.	n.a.	similar to PTS system, glucitol/sorbitol-specific enzyme IICII component
lmo0631	n.a.	n.a.	n.a.	similar to PTS system, fructose-specific IIA component
lmo0632	1.65	0.96	1.07	similar to PTS system, fructose-specific IIB component
lmo0633	1.27	1.03	0.88	similar to PTS system, fructose-specific IIC component
lmo0738	1.10	0.90	1.04	similar to phosphotransferase system (PTS) beta-glucoside-specific enzyme IIABC component
lmo0781	0.71	1.03	0.85	similar to mannose-specific phosphotransferase system (PTS) component IID
lmo0782	0.43	1.47	0.61	similar to mannose-specific phosphotransferase system (PTS) component IIC
lmo0783	0.33	1.40	0.46	similar to mannose-specific phosphotransferase system (PTS) component IIB
lmo0784	0.30	1.26	0.43	similar to mannose-specific phosphotransferase system (PTS) component IIA
lmo0859	1.29	0.50	1.98	similar to putative sugar ABC transporter, periplasmic sugar-binding protein
lmo0874	1.60	0.82	0.80	similar to PTS system enzyme IIA component
lmo0875	0.83	0.96	1.37	similar to PTS system, beta-glucoside enzyme IIB component
lmo0876	n.a.	n.a.	n.a.	similar to PTS system, Lichenan-specific enzyme IIC component
lmo0901	n.a.	n.a.	n.a.	similar to PTS system, cellobiose-specific IIC component
lmo0914	1.05	0.72	0.98	similar to PTS system, IIB component
lmo0915	n.a.	n.a.	n.a.	similar to phosphotransferase system enzyme IIC
lmo0916	n.a.	n.a.	n.a.	similar to phosphotransferase system enzyme IIA
lmo1003	1.39	1.28	1.67	phosphotransferase system enzyme I
lmo1017	1.10	1.33	1.13	similar to phosphotransferase system glucose-specific enzyme IIA
lmo1035	1.00	1.37	1.14	similar to phosphotransferase system (PTS) beta-glucoside-specific enzyme IIABC
lmo1095	0.66	0.86	1.28	similar to PTS system, cellobiose-specific IIB component (cel A)
lmo1255	1.10	6.15	0.15	similar to PTS system trehalose specific enzyme IIBC
lmo1719	1.11	1.56	0.87	similar to phosphotransferase system (PTS) lichenan-specific enzyme IIA component
lmo1720	0.92	1.34	0.96	similar to phosphotransferase system (PTS) lichenan-specific enzyme IIB component
lmo1971	n.a.	n.a.	n.a.	similar to pentitol PTS system enzyme II C component
lmo1972	0.97	1.07	0.98	similar to pentitol PTS system enzyme II B component
lmo1973	0.46	0.98	1.13	similar to PTS system enzyme II A component
lmo1997	1.04	1.00	1.00	similar to PTS mannose-specific enzyme IIA component
lmo2000	0.60	0.57	0.94	similar to PTS mannose-specific enzyme IID component
lmo2001	0.46	0.59	0.96	similar to PTS mannose-specific enzyme IIC component
lmo2002	0.53	0.83	1.18	similar to PTS mannose-specific enzyme IIB component
lmo2096	1.59	0.63	2.02	similar to PTS system galactitol-specific enzyme IIC component
lmo2097	1.09	0.95	1.03	similar to PTS system galactitol-specific enzyme IIB component
lmo2098	1.64	0.95	0.83	similar to PTS system galactitol-specific enzyme IIA component
lmo2135	1.31	1.00	1.52	similar to PTS system, fructose-specific enzyme IIC component
lmo2136	1.48	1.03	0.89	similar to PTS system, fructose-specific enzyme IIB component

Genname	BHI-LB	BHI-MM	MM-LB	Annotation nach <a href="http://genolist.pasteur.fr/ListiList/">http://genolist.pasteur.fr/ListiList/</a>
lmo2137	1.31	1.01	0.85	similar to PTS system, fructose-specific enzyme IIA component
lmo2259	0.62	0.82	0.92	similar to phosphotransferase system (PTS) beta-glucoside-specific enzyme IIA
lmo2335	0.26	0.33	1.44	fruA - highly similar to phosphotransferase system (PTS) fructose-specific enzyme IABC component
lmo2373	1.23	0.91	1.47	similar to phosphotransferase system (PTS) beta-glucoside-specific enzyme IIB component
lmo2649	n.a.	n.a.	n.a.	similar to hypothetical PTS enzyme IIC component
lmo2650	n.a.	n.a.	n.a.	similar to hypothetical PTS enzyme IIB component
lmo2651	n.a.	n.a.	n.a.	similar to mannitol-specific PTS enzyme IIA component
lmo2665	0.93	0.74	1.92	similar to PTS system galactitol-specific enzyme IIC component
lmo2666	0.89	0.66	2.20	similar to PTS system galactitol-specific enzyme IIB component
lmo2667	0.78	0.72	2.14	similar to PTS system galactitol-specific enzyme IIA component
lmo2683	0.88	0.55	1.66	similar to cellobiose phosphotransferase enzyme IIB component
lmo2684	1.05	0.63	1.63	similar to cellobiose phosphotransferase enzyme IIC component
lmo2685	1.13	0.79	1.50	similar to cellobiose phosphotransferase enzyme IIA component
lmo2708	n.a.	n.a.	n.a.	similar to PTS system, cellobiose-specific enzyme IIC
lmo2733	n.a.	n.a.	n.a.	similar to PTS system, fructose-specific IABC component
lmo2762	n.a.	n.a.	n.a.	similar to PTS cellobiose-specific enzyme IIB
lmo2763	n.a.	n.a.	n.a.	similar to PTS cellobiose-specific enzyme IIC
lmo2765	n.a.	n.a.	n.a.	similar to PTS cellobiose-specific enzyme IIA
lmo2772	n.a.	n.a.	n.a.	similar to beta-glucoside-specific enzyme IABC
lmo2780	0.93	0.93	0.92	similar to cellobiose PTS enzyme IIA
lmo2782	n.a.	n.a.	n.a.	similar to PTS, cellobiose-specific IIB component
lmo2783	n.a.	n.a.	n.a.	similar to cellobiose phosphotransferase system enzyme IIC
lmo2787	n.a.	n.a.	n.a.	<i>bvrB</i> , beta-glucoside-specific phosphotransferase enzyme II ABC component
lmo2797	n.a.	n.a.	n.a.	similar to phosphotransferase system mannitol-specific enzyme IIA
lmo2799	n.a.	n.a.	n.a.	similar to phosphotransferase system mannitol-specific enzyme IIBC
lmo2850	n.a.	n.a.	n.a.	similar to sugar transport proteins

**Tabelle 14** Vergleichende Transkriptomanalyse der Gene codierend für *prfA*, die PrfA-abhängigen Virulenzgene und aller PTS-Gene in *L. monocytogenes* EGD $\Delta$ *prfA*PrfA (PrfA) und EGD $\Delta$ *prfA*PrfA\* (PrfA\*) verglichen mit EGD nach Wachstum in MM mit 50 mM Glucose (G), Cellobiose (C) oder Glycerin (Y) versetzt, n.a. steht für unter den Bedingungen nicht detektierbare Gene. Die Funktion der Gene ist so wie in Tabelle 1 beschrieben.

Genname	PrfA/EGD G	PrfA*/EGD G	PrfA/EGD C	PrfA*/EGD C	PrfA/EGD Y	PrfA*/EGD Y
lmo0200	0.65	0.62	15.72	17.84	0.87	0.49
lmo0201	0.15	0.11	2.42	3.46	0.20	0.07
lmo0202	0.23	2.02	2.14	27.67	0.68	1.29
lmo0203	0.34	6.48	1.87	55.95	0.72	3.24
lmo0204	0.11	4.82	1.15	83.96	0.40	1.64
lmo0205	0.11	3.08	0.96	47.37	0.38	1.43
lmo0433	0.19	2.86	0.55	5.28	0.42	2.21
lmo0434	0.14	1.65	0.46	3.94	0.28	2.27
lmo0838	0.13	8.58	2.00	6.73	0.33	9.27
lmo1786	0.17	7.79	0.58	14.07	0.34	9.17



Genname	PrfA/EGD G	PrfA*/EGD G	PrfA/EGD C	PrfA*/EGD C	PrfA/EGD Y	PrfA*/EGD Y
lmo0021	0.92	0.56	n.a.	n.a.	0.87	0.78
lmo0022	0.80	n.a.	n.a.	n.a.	0.64	0.52
lmo0023	0.71	n.a.	n.a.	n.a.	0.61	0.56
lmo0024	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	0.45	0.61
lmo0027	1.26	1.03	n.a.	n.a.	1.20	1.19
lmo0034	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	1.14	1.20
lmo0096	0.93	0.62	0.91	0.76	1.22	0.90
lmo0097	0.85	0.68	0.98	0.93	1.13	0.97
lmo0098	0.93	0.63	1.03	1.03	1.52	1.06
lmo0169	2.11	2.31	1.83	1.75	4.94	2.40
lmo0176	1.53	1.47	1.39	1.20	2.30	1.84
lmo0298	1.06	n.a.	n.a.	n.a.	1.81	0.97
lmo0299	1.01	0.71	n.a.	n.a.	2.20	1.01
lmo0301	0.76	n.a.	n.a.	n.a.	2.43	0.99
lmo0357	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	0.75	0.85
lmo0358	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	1.15	1.05
lmo0373	1.17	1.05	1.18	0.78	2.08	1.54
lmo0374	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
lmo0398	0.59	0.94	0.39	1.52	0.97	1.41
lmo0399	0.99	n.a.	n.a.	n.a.	1.43	0.99
lmo0400	0.80	0.86	n.a.	n.a.	2.26	1.02
lmo0424	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
lmo0426	1.06	0.92	0.89	0.76	2.95	1.31
lmo0427	1.04	0.82	0.92	0.75	2.21	1.40
lmo0428	1.09	0.90	1.15	1.05	2.00	1.18
lmo0503	1.08	0.90	0.87	0.93	0.37	0.18
lmo0507	1.35	0.94	1.32	0.78	0.32	0.13
lmo0508	0.93	0.72	0.93	0.55	0.32	0.16
lmo0542	0.72	n.a.	n.a.	0.46	0.87	0.87
lmo0543	0.96	n.a.	n.a.	0.85	0.72	0.91
lmo0544	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	0.59	0.63
lmo0631	0.78	n.a.	n.a.	n.a.	1.13	1.03
lmo0632	0.76	n.a.	n.a.	n.a.	0.98	0.85
lmo0633	0.78	n.a.	n.a.	n.a.	1.11	1.00
lmo0738	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	1.30	1.13
lmo0781	1.54	1.21	0.87	0.89	1.82	2.02
lmo0782	2.33	2.27	2.14	2.23	2.44	2.34
lmo0783	3.23	2.63	2.34	2.14	3.77	2.48
lmo0784	3.24	2.43	2.75	2.07	3.38	2.29
lmo0859	0.55	1.30	0.18	1.57	0.91	1.39
lmo0874	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	1.35	1.16
lmo0875	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	0.78	1.10
lmo0876	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	1.16	1.21
lmo0901	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	0.90	1.97
lmo0914	1.25	1.15	0.27	0.76	0.93	0.89
lmo0915	1.19	0.94	n.a.	0.70	0.95	0.90
lmo0916	0.86	1.09	0.23	1.56	0.94	1.04
lmo1003	1.03	0.90	0.77	0.78	1.20	1.49
lmo1017	1.06	0.77	1.07	0.81	1.36	2.11
lmo1035	1.19	0.78	0.85	0.70	1.10	0.87
lmo1095	1.17	0.83	1.08	0.89	1.52	1.32
lmo1255	1.06	0.54	n.a.	0.36	0.84	1.05

Genname	PrfA/EGD G	PrfA*/EGD G	PrfA/EGD C	PrfA*/EGD C	PrfA/EGD Y	PrfA*/EGD Y
lmo1719	1.38	0.68	0.70	0.94	1.05	0.85
lmo1720	2.26	0.88	0.88	1.24	1.22	0.87
lmo1971	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	0.64	0.36
lmo1972	0.78	0.68	n.a.	n.a.	0.56	0.71
lmo1973	0.97	0.76	n.a.	n.a.	1.21	0.66
lmo1997	0.69	n.a.	n.a.	n.a.	0.69	0.82
lmo2000	0.77	0.56	0.87	0.65	1.10	1.03
lmo2001	0.79	0.58	0.90	0.76	1.15	0.99
lmo2002	0.71	0.57	0.79	0.87	1.12	1.00
lmo2096	1.09	1.16	n.a.	n.a.	1.99	1.33
lmo2097	1.38	0.93	n.a.	n.a.	2.35	0.99
lmo2098	1.68	0.79	n.a.	n.a.	2.90	1.08
lmo2135	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	0.52	0.69
lmo2136	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	0.66	0.70
lmo2137	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	0.69	0.61
lmo2259	1.39	1.01	1.55	1.20	2.15	1.60
lmo2335	1.03	1.00	0.91	0.90	1.49	1.22
lmo2373	0.97	0.67	0.99	0.79	1.25	1.41
lmo2649	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	1.10	1.08
lmo2650	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	1.14	1.02
lmo2651	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	1.59	1.07
lmo2665	1.88	1.41	1.01	1.31	1.35	0.81
lmo2666	1.88	1.44	1.10	1.14	1.23	0.80
lmo2667	1.99	1.23	1.17	1.36	1.34	0.75
lmo2683	4.85	0.93	0.99	1.64	1.61	0.60
lmo2684	2.59	0.83	0.97	1.51	1.33	0.52
lmo2685	1.87	0.83	1.23	1.71	1.26	0.64
lmo2708	1.45	0.62	0.40	0.91	0.99	0.22
lmo2733	0.97	0.93	n.a.	n.a.	1.28	1.48
lmo2762	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	2.24	1.41
lmo2763	n.a.	n.a.	1.50	1.21	2.69	1.59
lmo2765	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	1.50	1.50
lmo2772	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	2.32	3.28
lmo2780	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	0.81	1.22
lmo2782	0.89	n.a.	n.a.	n.a.	1.37	1.63
lmo2783	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	0.80	3.54
lmo2787	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	1.45	1.05
lmo2797	0.74	0.60	n.a.	n.a.	1.31	1.29
lmo2799	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	0.57	1.06
lmo2850	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	0.88	0.53

**Tabelle 15** Vergleichende Transkriptomanalyse der Gene codierend für *prfA*, die PrfA-abhängigen Virulenzgene und aller PTS-Gene in *L. monocytogenes* EGD und EGD-e nach Wachstum in MM mit 50 mM Glucose versetzt, n.a. steht für unter den Bedingungen nicht detektierbare Gene.

Genname	EGD-EGD-e	Funktion
lmo0200	4.13	prfA - listeriolysin positive regulatory protein
lmo0201	5.20	plcA - phosphatidylinositol-specific phospholipase c
lmo0202	5.63	hly - listeriolysin O precursor
lmo0203	5.93	mpl - Zinc metalloproteinase precursor
lmo0204	4.82	actA - actin-assembly inducing protein precursor

<b>Gencode</b>	<b>EGD-EGD-e</b>	<b>Funktion</b>
<b>lmo0205</b>	10.38	plcB - phospholipase C
<b>lmo0433</b>	2.73	inlA - InternalinA
<b>lmo0434</b>	2.34	inlB - InternalinB
<b>lmo0838</b>	2.05	uhpT - highly similar to hexose phosphate transport protein
<b>lmo1786</b>	1.54	inlC - Internalin C
<b>lmo0021</b>	n.a.	similar to PTS system, fructose-specific IIA component
<b>lmo0022</b>	n.a.	similar to PTS system, fructose-specific IIB component
<b>lmo0023</b>	n.a.	similar to PTS system, fructose-specific IIC component
<b>lmo0024</b>	n.a.	similar to PTS system, mannose-specific IID component
<b>lmo0027</b>	n.a.	similar to PTS system, beta-glucosides specific enzyme IIABC
<b>lmo0034</b>	n.a.	similar to PTS system, cellobiose-specific IIC component
<b>lmo0096</b>	0.68	similar to PTS system mannose-specific, factor IIAB
<b>lmo0097</b>	1.18	similar to PTS system mannose-specific, factor IIC
<b>lmo0098</b>	1.20	similar to PTS system mannose-specific, factor IID
<b>lmo0169</b>	0.38	similar to a glucose uptake protein
<b>lmo0176</b>	0.92	similar to a glucose uptake protein
<b>lmo0298</b>	n.a.	similar to PTS beta-glucoside-specific enzyme IIC component
<b>lmo0299</b>	1.34	similar to PTS beta-glucoside-specific enzyme IIB component
<b>lmo0301</b>	n.a.	similar to PTS beta-glucoside-specific enzyme IIA component
<b>lmo0357</b>	n.a.	similar to PTS system, enzyme IIA component
<b>lmo0358</b>	n.a.	similar to PTS system, enzyme IIBC component
<b>lmo0373</b>	n.a.	similar to PTS betaglucoside-specific enzyme IIC component
<b>lmo0374</b>	n.a.	similar to PTS betaglucoside-specific enzyme IIB component
<b>lmo0398</b>	n.a.	similar to phosphotransferase system enzyme IIA
<b>lmo0399</b>	n.a.	similar to fructose-specific phosphotransferase enzyme IIB
<b>lmo0400</b>	n.a.	similar to fructose-specific phosphotransferase enzyme IIC
<b>lmo0424</b>	0.89	similar to Staphylococcus xylosus glucose uptake protein
<b>lmo0426</b>	n.a.	similar to PTS fructose-specific enzyme IIA component
<b>lmo0427</b>	n.a.	similar to PTS fructose-specific enzyme IIB component
<b>lmo0428</b>	3.09	similar to PTS fructose-specific enzyme IIC component
<b>lmo0503</b>	n.a.	similar to PTS fructose-specific enzyme IIA component
<b>lmo0507</b>	n.a.	similar to PTS system, Galactitol-specific IIB component
<b>lmo0508</b>	1.07	similar to PTS system, Galactitol-specific IIC component
<b>lmo0542</b>	n.a.	similar to PTS system, glucitol/sorbitol-specific enzyme IIA component
<b>lmo0543</b>	n.a.	similar to PTS system, glucitol/sorbitol-specific enzyme IIBC component
<b>lmo0544</b>	1.07	similar to PTS system, glucitol/sorbitol-specific enzyme IICII component
<b>lmo0631</b>	n.a.	similar to PTS system, fructose-specific IIA component
<b>lmo0632</b>	n.a.	similar to PTS system, fructose-specific IIB component
<b>lmo0633</b>	n.a.	similar to PTS system, fructose-specific IIC component
<b>lmo0738</b>	0.71	similar to phosphotransferase system (PTS) beta-glucoside-specific enzyme IIABC component
<b>lmo0781</b>	0.51	similar to mannose-specific phosphotransferase system (PTS) component IID
<b>lmo0782</b>	0.27	similar to mannose-specific phosphotransferase system (PTS) component IIC
<b>lmo0783</b>	0.10	similar to mannose-specific phosphotransferase system (PTS) component IIB
<b>lmo0784</b>	0.17	similar to mannose-specific phosphotransferase system (PTS) component IIA
<b>lmo0859</b>	0.57	similar to putative sugar ABC transporter, periplasmic sugar-binding protein
<b>lmo0874</b>	n.a.	similar to PTS system enzyme IIA component
<b>lmo0875</b>	1.43	similar to PTS system, beta-glucoside enzyme IIB component
<b>lmo0876</b>	n.a.	similar to PTS system, Lichenan-specific enzyme IIC component
<b>lmo0901</b>	n.a.	similar to PTS system, cellobiose-specific IIC component
<b>lmo0914</b>	0.72	similar to PTS system, IIB component

Genname	EGD-EGD-e	Funktion
lmo0915	1.09	similar to phosphotransferase system enzyme IIC
lmo0916	n.a.	similar to phosphotransferase system enzyme IIA
lmo1003	0.94	phosphotransferase system enzyme I
lmo1017	0.94	similar to phosphotransferase system glucose-specific enzyme IIA
lmo1035	n.a.	similar to phosphotransferase system (PTS) beta-glucoside-specific enzyme IIABC
lmo1095	1.11	similar to PTS system, cellobiose-specific IIB component (cel A)
lmo1255	n.a.	similar to PTS system trehalose specific enzyme IIBC
lmo1719	0.74	similar to phosphotransferase system (PTS) lichenan-specific enzyme IIA component
lmo1720	0.22	similar to phosphotransferase system (PTS) lichenan-specific enzyme IIB component
lmo1971	n.a.	similar to pentitol PTS system enzyme II C component
lmo1972	n.a.	similar to pentitol PTS system enzyme II B component
lmo1973	n.a.	similar to PTS system enzyme II A component
lmo1997	1.69	similar to PTS mannose-specific enzyme IIA component
lmo2000	n.a.	similar to PTS mannose-specific enzyme IID component
lmo2001	n.a.	similar to PTS mannose-specific enzyme IIC component
lmo2002	n.a.	similar to PTS mannose-specific enzyme IIB component
lmo2096	n.a.	similar to PTS system galactitol-specific enzyme IIC component
lmo2097	1.19	similar to PTS system galactitol-specific enzyme IIB component
lmo2098	n.a.	similar to PTS system galactitol-specific enzyme IIA component
lmo2135	n.a.	similar to PTS system, fructose-specific enzyme IIC component
lmo2136	n.a.	similar to PTS system, fructose-specific enzyme IIB component
lmo2137	0.85	similar to PTS system, fructose-specific enzyme IIA component
lmo2259	n.a.	similar to phosphotransferase system (PTS) beta-glucoside-specific enzyme IIA
lmo2335	n.a.	<i>fruA</i> - highly similar to phosphotransferase system (PTS) fructose-specific enzyme IIABC component
lmo2373	n.a.	similar to phosphotransferase system (PTS) beta-glucoside-specific enzyme IIB component
lmo2649	n.a.	similar to hypothetical PTS enzyme IIC component
lmo2650	n.a.	similar to hypothetical PTS enzyme IIB component
lmo2651	n.a.	similar to mannitol-specific PTS enzyme IIA component
lmo2665	n.a.	similar to PTS system galactitol-specific enzyme IIC component
lmo2666	n.a.	similar to PTS system galactitol-specific enzyme IIB component
lmo2667	n.a.	similar to PTS system galactitol-specific enzyme IIA component
lmo2683	0.17	similar to cellobiose phosphotransferase enzyme IIB component
lmo2684	0.67	similar to cellobiose phosphotransferase enzyme IIC component
lmo2685	n.a.	similar to cellobiose phosphotransferase enzyme IIA component
lmo2708	n.a.	similar to PTS system, cellobiose-specific enzyme IIC
lmo2733	n.a.	similar to PTS system, fructose-specific IIABC component
lmo2762	n.a.	similar to PTS cellobiose-specific enzyme IIB
lmo2763	n.a.	similar to PTS cellobiose-specific enzyme IIC
lmo2765	n.a.	similar to PTS cellobiose-specific enzyme IIA
lmo2772	n.a.	similar to beta-glucoside-specific enzyme IIABC
lmo2780	n.a.	similar to cellobiose PTS enzyme IIA
lmo2782	n.a.	similar to PTS, cellobiose-specific IIB component
lmo2783	n.a.	similar to cellobiose phosphotransferase system enzyme IIC
lmo2787	n.a.	<i>bvrB</i> , beta-glucoside-specific phosphotransferase enzyme II ABC component
lmo2797	n.a.	similar to phosphotransferase system mannitol-specific enzyme IIA
lmo2799	n.a.	similar to phosphotransferase system mannitol-specific enzyme IIBC
lmo2850	n.a.	similar to sugar transport proteins

**Tabelle 16** In *L. monocytogenes* EGD verglichen mit *L. monocytogenes* EGD-e hochregulierte Gene nach Wachstum MM mit 50 mM Glucose versetzt.

Genname	Ratio	Funktion
---------	-------	----------

<b>lmo0200</b>	0.39	Listeriolysin positive regulatory protein
<b>lmo0201</b>	0.21	Phosphatidylinositol-specific phospholipase c
<b>lmo0202</b>	0.21	Listeriolysin O precursor
<b>lmo0204</b>	0.26	Actin-assembly inducing protein precursor
<b>lmo0205</b>	0.04	Phospholipase C
<b>lmo1650</b>	0.47	Unknown, similar to hypothetical proteins
<b>lmo1988</b>	0.50	Unknown, similar to 3-isopropylmalate dehydrogenase
<b>lmo2040</b>	0.44	Unknown, similar to cell-division protein FtsL

**Tabelle 17** In *L. monocytogenes* EGD-e verglichen mit *L. monocytogenes* EGD hochregulierte Gene nach Wachstum MM mit 50 mM Glucose versetzt.

<b>Genname</b>	<b>Ratio</b>	<b>Funktion</b>
<b>lmo0013</b>	2.09	AA3-600 quinol oxidase subunit II
<b>lmo0015</b>	2.12	AA3-600 quinol oxidase subunit III
<b>lmo0115</b>	22.23	Unknown, similar to Antigen D
<b>lmo0119</b>	10.67	Unknown
<b>lmo0120</b>	9.00	Unknown
<b>lmo0122</b>	6.55	Unknown, similar to phage proteins
<b>lmo0123</b>	10.67	Unknown, similar to protein gp18 from Bacteriophage A118
<b>lmo0126</b>	7.31	Unknown
<b>lmo0127</b>	18.13	Unknown, weakly similar to protein gp20 from Bacteriophage A118
<b>lmo0170</b>	4.10	Unknown
<b>lmo0187</b>	3.08	Unknown, similar to <i>B. subtilis</i> YabF protein
<b>lmo0191</b>	3.97	Unknown, similar to a putative phospho-beta-glucosidase
<b>lmo0196</b>	2.59	Unknown, similar to <i>B. subtilis</i> SpoVG protein
<b>lmo0197</b>	5.48	Unknown, similar to <i>B. subtilis</i> SpoVG protein
<b>lmo0198</b>	2.30	Unknown, highly similar to UDP-N-acetylglucosamine pyrophosphorylase
<b>lmo0199</b>	13.10	Phosphoribosyl pyrophosphate synthetase
<b>lmo0211</b>	3.03	Unknown, similar to <i>B. subtilis</i> general stress protein
<b>lmo0218</b>	3.25	Unknown, polyribonucleotide nucleotidyltransferase domain present
<b>lmo0235</b>	2.51	Unknown, similar to nucleotidyl transferase, pyrophosphorylase
<b>lmo0238</b>	2.42	Unknown, similar to serine O-acetyltransferase
<b>lmo0239</b>	2.26	CysteinyI-tRNA synthetase
<b>lmo0240</b>	2.54	Unknown, highly similar to <i>B. subtilis</i> YazC protein
<b>lmo0242</b>	3.02	Unknown, similar to <i>B. subtilis</i> Yacp protein
<b>lmo0243</b>	3.26	RNA polymerase sigma-30 factor (sigma-H)
<b>lmo0256</b>	2.55	Unknown, conserved hypothetical protein
<b>lmo0259</b>	2.17	RNA polymerase (beta subunit)
<b>lmo0279</b>	3.37	Unknown, highly similar to anaerobic ribonucleoside-triphosphate reductase
<b>lmo0280</b>	4.58	Unknown, highly similar to anaerobic ribonucleotide reductase activator protein
<b>lmo0292</b>	3.04	Unknown, similar to heat-shock protein htrA serine protease
<b>lmo0369</b>	3.68	Unknown, conserved hypothetical protein, highly similar to <i>B. subtilis</i> YeeI protein
<b>lmo0370</b>	3.20	Unknown, conserved hypothetical protein
<b>lmo0394</b>	2.19	Unknown, similar to <i>L. monocytogenes</i> extracellular P60 protein
<b>lmo0404</b>	2.06	Unknown
<b>lmo0500</b>	2.38	Unknown, similar to transaldolase
<b>lmo0539</b>	8.43	Unknown, similar to tagatose-1,6-diphosphate aldolase
<b>lmo0555</b>	2.90	Unknown, similar to di-tripeptide transporter
<b>lmo0558</b>	2.29	Unknown, conserved hypothetical protein
<b>lmo0592</b>	8.95	Unknown
<b>lmo0593</b>	2.83	Unknown, similar to transport proteins (formate?)
<b>lmo0596</b>	17.84	Unknown, similar to unknown proteins
<b>lmo0644</b>	8.24	Unknown, similar to conserved hypothetical proteins

<b>Gencode</b>	<b>Ratio</b>	<b>Funktion</b>
<b>lmo0756</b>	3.17	Unknown, Similar to ABC transporter (ATP-binding protein)
<b>lmo0774</b>	2.97	Unknown, conserved hypothetical protein
<b>lmo0781</b>	2.58	Unknown, similar to mannose-specific phosphotransferase system (PTS) component IID
<b>lmo0782</b>	128.38	Unknown, similar to mannose-specific phosphotransferase system (PTS) component IIC
<b>lmo0783</b>	12.28	Unknown, similar to mannose-specific phosphotransferase system (PTS) component IIB
<b>lmo0784</b>	63.39	Unknown, similar to mannose-specific phosphotransferase system (PTS) component IIA
<b>lmo0866</b>	5.47	Unknown, similar to ATP-dependent RNA helicase
<b>lmo0895</b>	3.45	RNA polymerase sigma-37 factor (sigma-B)
<b>lmo0944</b>	6.61	Unknown, similar to B. subtilis YneR protein
<b>lmo0959</b>	2.88	Unknown, similar to undecaprenyl-phosphate N-acetylglucosaminyltransferase
<b>lmo0964</b>	2.86	Unknown, similar to B. subtilis YjbH protein
<b>lmo0972</b>	2.58	D-alanyl carrier protein
<b>lmo1015</b>	3.75	Unknown, highly similar to glycine betaine ABC transporters (permease)
<b>lmo1016</b>	4.21	Unknown, highly similar to glycine betaine ABC transporters (glycine betaine-binding protein)
<b>lmo1052</b>	2.69	Unknown, highly similar to pyruvate dehydrogenase (E1 alpha subunit)
<b>lmo1055</b>	2.38	Unknown, highly similar to dihydrolipoamide dehydrogenase, E3 subunit of pyruvate dehydrogenase complex
<b>lmo1057</b>	2.10	Unknown, similar to L-lactate dehydrogenase
<b>lmo1067</b>	2.50	Unknown, similar to GTP-binding elongation factor
<b>lmo1081</b>	2.55	Unknown, similar to glucose-1-phosphate thymidyl transferase
<b>lmo1083</b>	2.57	Unknown, similar to dTDP-D-glucose 4,6-dehydratase
<b>lmo1084</b>	3.81	Unknown, similar to DTDP-L-rhamnose synthetase
<b>lmo1088</b>	2.22	Unknown, similar to teichoic acid biosynthesis protein B precursor
<b>lmo1162</b>	2.09	Unknown
<b>lmo1216</b>	6.21	Unknown, similar to N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase (autolysin)
<b>lmo1233</b>	4.30	Thioredoxin
<b>lmo1240</b>	2.26	Unknown, conserved hypothetical protein, similar to B. subtilis YsnB protein
<b>lmo1304</b>	130.98	Unknown, similar to B. subtilis YnzC protein
<b>lmo1316</b>	3.12	Unknown, similar to phosphatidate cytidyltransferase (CDP-diglyceride synthase)
<b>lmo1318</b>	4.53	Unknown, conserved hypothetical protein similar to B. subtilis YluC protein
<b>lmo1334</b>	4.02	Unknown, similar to B. subtilis YqzD protein
<b>lmo1338</b>	2.03	Unknown similar to B. subtilis yqgQ
<b>lmo1350</b>	2.13	Unknown, similar to glycine dehydrogenase (decarboxylating) subunit 2
<b>lmo1356</b>	3.27	Unknown, similar to acetyl-CoA carboxylase subunit (biotin carboxyl carrier subunit)
<b>lmo1357</b>	3.13	Acetyl-CoA carboxylase subunit (biotin carboxylase subunit)
<b>lmo1358</b>	3.01	Unknown, similar to B. subtilis YqhY protein
<b>lmo1364</b>	2.51	Unknown, similar to cold shock protein
<b>lmo1380</b>	3.05	Unknown
<b>lmo1423</b>	5.64	Unknown
<b>lmo1424</b>	4.43	Unknown, similar to manganese transport proteins NRAMP
<b>lmo1427</b>	14.50	Unknown, similar to glycine betaine/carnitine/choline ABC transporter (membrane protein)
<b>lmo1431</b>	5.67	Unknown, similar to ABC transporter (ATP-binding protein)
<b>lmo1432</b>	3.95	Unknown
<b>lmo1435</b>	2.66	Unknown, similar to dihydrodipicolinate synthase
<b>lmo1439</b>	3.35	Superoxide dismutase
<b>lmo1449</b>	2.07	Unknown, similar to endonuclease IV
<b>lmo1460</b>	2.20	Unknown, similar to B. subtilis RecO protein involved in DNA repair and homologous recombination
<b>lmo1473</b>	2.34	Class I heat-shock protein (molecular chaperone) DnaK
<b>lmo1476</b>	2.19	Unknown, highly similar to coproporphyrinogen III oxidase
<b>lmo1503</b>	2.22	Unknown
<b>lmo1508</b>	2.18	Unknown, similar to two-component sensor histidine kinase
<b>lmo1525</b>	4.54	Unknown, similar to single-stranded-DNA-specific exonuclease (RecJ)

<b>Gename</b>	<b>Ratio</b>	<b>Funktion</b>
<b>lmo1528</b>	2.60	Unknown, similar to unknown proteins
<b>lmo1531</b>	3.36	Unknown, similar to S-adenosylmethionine:tRNA ribosyltransferase-isomerase
<b>lmo1539</b>	2.07	Unknown, similar to glycerol uptake facilitator
<b>lmo1571</b>	2.57	Unknown, highly similar to 6-phosphofructokinase
<b>lmo1601</b>	4.89	Unknown, similar to general stress protein
<b>lmo1602</b>	4.19	Unknown, similar to unknown proteins
<b>lmo1634</b>	9.75	Unknown, similar to Alcohol-acetaldehyde dehydrogenase
<b>lmo1636</b>	2.87	Unknown, similar to similar to ABC transporter (ATP-binding protein)
<b>lmo1720</b>	3.30	Unknown, similar to phosphotransferase system (PTS) lichenan-specific enzyme IIB component
<b>lmo1733</b>	2.36	Unknown, similar to glutamate synthase (small subunit)
<b>lmo1765</b>	2.03	Bifunctional phosphoribosylaminoimidazole carboxy formyl formyltransferase and inosine-monophosphate cyclohydrolase
<b>lmo1773</b>	2.03	Adenylosuccinate lyase
<b>lmo1816</b>	2.48	Ribosomal protein L28
<b>lmo1820</b>	2.12	Unknown, similar to putative serine/threonine-specific protein kinase
<b>lmo1847</b>	3.40	Unknown, similar to adhesion binding proteins and lipoproteins with multiple specificity for metal cations (ABC transporter)
<b>lmo1888</b>	3.05	Unknown, similar to hypothetical proteins
<b>lmo1892</b>	2.02	Unknown, similar to penicillin-binding protein 2A
<b>lmo1923</b>	2.39	Unknown, similar to 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase
<b>lmo1936</b>	2.67	Unknown, similar to NAD(P)H-dependent glycerol-3-phosphate dehydrogenase
<b>lmo1956</b>	2.89	Unknown, similar to transcriptional regulator (Fur family)
<b>lmo1975</b>	6.84	Unknown, similar to E. coli DNA-damage-inducible protein dinP
<b>lmo2020</b>	3.46	Unknown, similar to cell-division initiation protein (septum placement)
<b>lmo2055</b>	2.57	Unknown, similar to unknown proteins
<b>lmo2072</b>	5.01	Unknown, similar to a putative DNA binding proteins
<b>lmo2089</b>	2.24	Unknown, similar to lipases
<b>lmo2103</b>	2.56	Unknown, similar to phosphotransacetylase
<b>lmo2105</b>	3.40	Unknown, similar to ferrous iron transport protein B
<b>lmo2109</b>	5.03	Unknown, similar to hydrolase
<b>lmo2137</b>	2.10	Unknown, similar to PTS system, fructose-specific enzyme IIA component
<b>lmo2155</b>	2.27	Unknown, similar to ribonucleoside-diphosphate reductase, subunit alpha
<b>lmo2193</b>	2.63	Unknown, similar to oligopeptide ABC transporter (ATP-binding protein)
<b>lmo2203</b>	2.62	Unknown, similar to N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase and to internalin B
<b>lmo2204</b>	3.14	Unknown, similar to unknown protein
<b>lmo2205</b>	3.26	Unknown, similar to phosphoglyceromutase I
<b>lmo2206</b>	2.37	Unknown, similar to endopeptidase Clp ATP-binding chain B (ClpB)
<b>lmo2207</b>	3.58	Unknown, similar to unknown protein
<b>lmo2211</b>	2.02	Unknown, similar to ferrenchelatae
<b>lmo2212</b>	3.52	Unknown, similar to uroporphyrinogen III decarboxylase
<b>lmo2216</b>	2.64	Unknown, similar to histidine triad (HIT) protein
<b>lmo2237</b>	2.68	Unknown, similar to transport system permease protein
<b>lmo2264</b>	2.42	Unknown, similar to unknown proteins
<b>lmo2267</b>	2.77	Unknown, similar to ATP-dependent deoxyribonuclease (subunit A)
<b>lmo2268</b>	2.75	Unknown, similar to ATP-dependent deoxyribonuclease (subunit B)
<b>lmo2343</b>	4.26	Unknown, similar to nitrilotriacetate monoxygenase
<b>lmo2381</b>	5.15	Unknown, similar to proteins involved in resistance to cholate and to NA(+) and in pH homeostasis
<b>lmo2390</b>	2.38	Unknown, similar to hypothetical thioredoxine reductase
<b>lmo2429</b>	5.16	Unknown, similar to B. subtilis ferrichrome ABC transporter (ATP-binding protein) FhuC
<b>lmo2460</b>	4.91	Unknown, similar to B. subtilis CggR hypothetical transcriptional regulator
<b>lmo2488</b>	2.41	Excinuclease ABC (subunit A)
<b>lmo2522</b>	3.56	Unknown, similar to hypothetical cell wall binding protein from B. subtilis

Genname	Ratio	Funktion
lmo2596	2.14	Ribosomal protein S10
lmo2676	7.50	Unknown, similar to UV-damage repair protein
lmo2719	2.41	Unknown, conserved hypothetical proteins
lmo2720	3.35	Unknown, similar to acetate-CoA ligase

**Tabelle 18 Übersicht über alle Phosphotransferasesysteme (PTS) in *L. monocytogenes* EGD-e** mit Einteilung in die sieben von Barabote und Saier (2005) benannten PTS-Familien. Zusätzlich wurden nach *in silico* Analysen putative PRD-Antiterminatoren und -Aktivatoren dargestellt und die PTS-Permeasen, die in einer *ccpA* oder *hprK*-Insertionsmutante hochreguliert sind (Mertins *et al.*, 2007).

PTS	Anti-terminator	Aktivator	in <i>::ccpA</i> oder <i>::hprK</i> ↑	Annotation nach <a href="http://genolist.pasteur.fr/ListiList/">http://genolist.pasteur.fr/ListiList/</a>
<b>1. The PTS Glucose-Glucoside (Glc) Family (6)</b>				
lmo0027				similar to PTS system, beta-glucosides specific enzyme IIABC
lmo0738			<i>::hprK</i>	similar to phosphotransferase system (PTS) beta-glucoside-specific enzyme IIABC component
lmo1017				similar to phosphotransferase system glucose-specific enzyme IIA
lmo1035				similar to phosphotransferase system (PTS) beta-glucoside-specific enzyme IIABC
lmo1255			<i>::hprK</i>	similar to PTS system trehalose specific enzyme IIBC
lmo2772	lmo2773		<i>::ccpA</i> und <i>::hprK</i>	similar to beta-glucoside-specific enzyme IIABC
lmo2787	lmo2788 ( <i>bvrA</i> )		<i>::hprK</i>	beta-glucoside-specific phosphotransferase enzyme II ABC component
<b>2. The PTS Mannose-Fructose-Sorbose (Man) Family (4)</b>				
lmo0021-0024		GntR (lmo0020)		similar to PTS system, fructose-specific IIA, B, C and D component
lmo0096-0098		LevR <sub>L</sub> -I (lmo0785)	<i>::hprK</i>	similar to PTS system mannose-specific, factor IIAB, C and D
lmo0781-0784		LevR <sub>L</sub> -I (lmo0785)	<i>::hprK</i>	similar to mannose-specific phosphotransferase system (PTS) component IID, C, B and A
lmo1997				similar to PTS mannose-specific enzyme IIA component
lmo2000-2002			<i>::ccpA</i> und <i>::hprK</i>	similar to PTS mannose-specific enzyme IID, C and B component
<b>3. The PTS Lactose-N,N'-Diacylchitobiose-β-glucoside (Lac) Family (8)</b>				
lmo0298/0299/0301		LicR (lmo0297)	<i>::ccpA</i>	similar to PTS beta-glucoside-specific enzyme IIC, B and A component
lmo0373/0374				similar to PTS betaglucoside-specific enzyme IIC and B component
lmo0874-0876		ManR (lmo0873)		similar to PTS system enzyme IIA, B and C component



PTS	Anti-terminator	Aktivator	in <i>::ccpA</i> oder <i>::hprK</i> ↑	Annotation nach <a href="http://genolist.pasteur.fr/ListiList/">http://genolist.pasteur.fr/ListiList/</a>
<b>Imo0914-0916</b>			<i>::hprK</i>	similar to phosphotransferase system enzyme IIB, C and A
<b>Imo1719/1720</b>		LevR <sub>L</sub> -II (Imo1721)		similar to phosphotransferase system (PTS) lichenan-specific enzyme IIA and B component
<b>Imo2683-2685</b>		LevR <sub>L</sub> -II (Imo1721)		similar to cellobiose phosphotransferase enzyme IIB, C and A component
<b>Imo2762/2763/2765</b>			<i>::ccpA</i> und <i>::hprK</i>	similar to PTS cellobiose-specific enzyme IIB, C and A
<b>Imo2780/2782/2783</b>		LicR (Imo2784)		similar to cellobiose PTS enzyme IIA, B and C
<b>Imo0034</b>			<i>::ccpA</i>	similar to PTS system, cellobiose-specific IIC component
<b>Imo0901</b>				similar to PTS system, cellobiose-specific IIC component
<b>Imo1095</b>				similar to PTS system, cellobiose-specific IIB component (cel A)
<b>Imo2259</b>				similar to phosphotransferase system (PTS) beta-glucoside-specific enzyme IIA
<b>Imo2373</b>				similar to phosphotransferase system (PTS) beta-glucoside-specific enzyme IIB component
<b>Imo2708</b>				similar to PTS system, cellobiose-specific enzyme IIC
<b>4. The PTS Fructose-Mannitol (Fru) Family (6)</b>				
<b>Imo0357/0358</b>				similar to PTS system, enzyme IIA and B/C component
<b>Imo0398-0400</b>		LicR (Imo0402)		similar to phosphotransferase system enzyme IIA, B and C
<b>Imo0426-0428</b>		LicR (Imo0425)	<i>::ccpA</i> und <i>::hprK</i>	similar to PTS fructose-specific enzyme IIA, B and C component
<b>Imo0631-0633</b>		LicR (Imo0630)	<i>::hprK</i>	similar to PTS system, fructose-specific IIA, B and C component
<b>Imo2135-2137</b>		MtlR (Imo2138)		similar to PTS system, fructose-specific enzyme IIC, B and A component
<b>Imo2733</b>				similar to PTS system, fructose-specific IABC component
<b>Imo2797/2799</b>			<i>::ccpA</i> und <i>::hprK</i>	similar to phosphotransferase system mannitol-specific enzyme IIA and BC
<b>Imo2335</b>				fruA - highly similar to phosphotransferase system (PTS) fructose-specific enzyme IABC component
<b>5. The PTS Glucitol (Gut) Family (1)</b>				
<b>Imo0542-0544</b>				similar to PTS system, glucitol/sorbitol-specific enzyme IIA, B and C component

PTS	Anti-terminator	Aktivator	in <i>::ccpA</i> oder <i>::hprK</i> ↑	Annotation nach <a href="http://genolist.pasteur.fr/ListiList/">http://genolist.pasteur.fr/ListiList/</a>
<b>6. The PTS Galactitol (Gat) Family (3)</b>				
<b>lmo0503/0507/0508</b>		MtlR (lmo0501)	<i>::ccpA</i> und <i>::hprK</i>	similar to PTS fructose-specific enzyme IIA, B and C component
<b>lmo2096-2098</b>		LicR (lmo2099)		similar to PTS system galactitol-specific enzyme IIC, B and A component
<b>lmo2665-2667</b>		MtlR (lmo2668)	<i>::ccpA</i> und <i>::hprK</i>	similar to PTS system galactitol-specific enzyme IIC, B and A component
<b>7. The PTS L-Ascorbate (L-Asc) Family (2)</b>				
<b>lmo1971-1973</b>				similar to pentitol PTS system enzyme IIC, B and A component
<b>lmo2649-2651</b>		ManR/MtlR (lmo2652)	<i>::ccpA</i> und <i>::hprK</i>	similar to hypothetical PTS enzyme IIC, B and A component

**Tabelle 19** Vergleichende Transkriptomanalyse der Gene codierend für *prfA*, die PrfA-abhängigen Virulenzgene und aller PTS-Gene in *L. monocytogenes* EGD-e Δlmo0096-0098, EGD-e Δlmo0781-0784 und der PTS<sup>Man</sup> Deletionsmutante ManPTS im Vergleich zum Wildtyp EGD-e nach Wachstum in MM mit 10 mM Glucose versetzt, n.a. steht für unter den Bedingungen nicht detektierbare Gene.

Genename	d0096-8/ EGD-e	d0781-4/ EGD-e	ManPTS/ EGD-e	Funktion
<b>Lmo0200</b>	1.33	1.09	1.26	<i>prfA</i> - listeriolysin positive regulatory protein
<b>Lmo0201</b>	1.45	1.01	1.24	<i>plcA</i> - phosphatidylinositol-specific phospholipase c
<b>Lmo0202</b>	1.62	1.32	1.38	<i>hly</i> - listeriolysin O precursor
<b>Lmo0203</b>	1.14	0.88	2.86	<i>mpl</i> - Zinc metalloproteinase precursor
<b>Lmo0204</b>	1.43	1.19	1.77	<i>actA</i> - actin-assembly inducing protein precursor
<b>Lmo0205</b>	1.48	1.17	1.93	<i>plcB</i> - phospholipase C
<b>Lmo0433</b>	1.49	1.16	1.60	<i>inlA</i> - InternalinA
<b>Lmo0434</b>	1.58	1.33	2.57	<i>inlB</i> - InternalinB
<b>Lmo0838</b>	4.32	3.69	8.51	<i>uhpT</i> - highly similar to hexose phosphate transport protein
<b>Lmo1786</b>	1.77	1.03	4.86	<i>inlC</i> - Internalin C
<b>Lmo0021</b>	1.93	1.77	0.42	similar to PTS system, fructose-specific IIA component
<b>Lmo0022</b>	2.49	2.19	n.a.	similar to PTS system, fructose-specific IIB component
<b>Lmo0023</b>	n.a.	n.a.	n.a.	similar to PTS system, fructose-specific IIC component
<b>Lmo0024</b>	n.a.	n.a.	n.a.	similar to PTS system, mannose-specific IID component
<b>Lmo0027</b>	59.42	50.35	41.26	similar to PTS system, beta-glucosides specific enzyme IIABC
<b>Lmo0034</b>	n.a.	n.a.	n.a.	similar to PTS system, cellobiose-specific IIC component
<b>Lmo0096</b>	0.01	0.01	0.05	similar to PTS system mannose-specific, factor IIAB
<b>Lmo0097</b>	0.01	0.02	0.05	similar to PTS system mannose-specific, factor IIC
<b>Lmo0098</b>	0.00	0.02	0.04	similar to PTS system mannose-specific, factor IID
<b>Lmo0169</b>	0.10	0.94	0.49	similar to a glucose uptake protein
<b>Lmo0176</b>	1.33	0.73	1.11	similar to a glucose uptake protein
<b>Lmo0258</b>	1.01	0.90	1.02	<i>rpoB</i> - RNA polymerase (beta subunit)
<b>Lmo0298</b>	n.a.	n.a.	n.a.	similar to PTS beta-glucoside-specific enzyme IIC component
<b>Lmo0299</b>	1.47	n.a.	n.a.	similar to PTS beta-glucoside-specific enzyme IIB component
<b>Lmo0301</b>	n.a.	n.a.	n.a.	similar to PTS beta-glucoside-specific enzyme IIA component
<b>Lmo0344</b>	1.39	n.a.	1.90	similar to dehydrogenase/reductase

Genename	d0096-8/ EGD-e	d0781-4/ EGD-e	ManPTS/ EGD-e	Funktion
Lmo0347	n.a.	n.a.	n.a.	similar to dihydroxyacetone kinase
Lmo0348	n.a.	n.a.	n.a.	similar to dihydroxyacetone kinase
Lmo0357	n.a.	n.a.	n.a.	similar to PTS system, enzyme IIA component
Lmo0358	n.a.	n.a.	n.a.	similar to PTS system, enzyme IIBC component
Lmo0373	2.76	n.a.	1.56	similar to PTS betaglucoside-specific enzyme IIC component
Lmo0374	n.a.	n.a.	n.a.	similar to PTS betaglucoside-specific enzyme IIB component
Lmo0398	0.48	0.81	1.01	similar to phosphotransferase system enzyme IIA
Lmo0399	0.63	n.a.	n.a.	similar to fructose-specific phosphotransferase enzyme IIB
Lmo0400	n.a.	n.a.	n.a.	similar to fructose-specific phosphotransferase enzyme IIC
Lmo0424	n.a.	n.a.	n.a.	similar to Staphylococcus xylosus glucose uptake protein
Lmo0426	3.72	2.35	2.33	similar to PTS fructose-specific enzyme IIA component
Lmo0427	3.78	2.74	2.54	similar to PTS fructose-specific enzyme IIB component
Lmo0428	4.29	2.59	2.83	similar to PTS fructose-specific enzyme IIC component
Lmo0503	2.01	n.a.	1.51	similar to PTS fructose-specific enzyme IIA component
Lmo0507	2.58	n.a.	n.a.	similar to PTS system, Galactitol-specific IIB component
Lmo0508	n.a.	n.a.	n.a.	similar to PTS system, Galactitol-specific IIC component
Lmo0542	n.a.	n.a.	n.a.	similar to PTS system, glucitol/sorbitol-specific enzyme IIA component
Lmo0543	1.97	1.10	n.a.	similar to PTS system, glucitol/sorbitol-specific enzyme IIBC component
Lmo0544	n.a.	n.a.	n.a.	similar to PTS system, glucitol/sorbitol-specific enzyme IICII component
Lmo0631	2.75	n.a.	n.a.	similar to PTS system, fructose-specific IIA component
Lmo0632	n.a.	n.a.	n.a.	similar to PTS system, fructose-specific IIB component
Lmo0633	n.a.	n.a.	n.a.	similar to PTS system, fructose-specific IIC component
Lmo0738	n.a.	n.a.	n.a.	similar to phosphotransferase system (PTS) beta-glucoside-specific enzyme IIABC component
Lmo0781	2.47	0.04	0.16	similar to mannose-specific phosphotransferase system (PTS) component IID
Lmo0782	2.65	0.01	0.05	similar to mannose-specific phosphotransferase system (PTS) component IIC
Lmo0783	2.16	0.01	0.04	similar to mannose-specific phosphotransferase system (PTS) component IIB
Lmo0784	1.85	0.01	0.06	similar to mannose-specific phosphotransferase system (PTS) component IIA
Lmo0859	2.19	0.91	3.30	similar to putative sugar ABC transporter, periplasmic sugar-binding protein
Lmo0874	n.a.	n.a.	n.a.	similar to PTS system enzyme IIA component
Lmo0875	1.47	n.a.	n.a.	similar to PTS system, beta-glucoside enzyme IIB component
Lmo0876	n.a.	n.a.	n.a.	similar to PTS system, Lichenan-specific enzyme IIC component
Lmo0901	0.94	n.a.	n.a.	similar to PTS system, cellobiose-specific IIC component
Lmo0914	0.82	0.78	1.05	similar to PTS system, IIB component
Lmo0915	2.57	n.a.	1.75	similar to phosphotransferase system enzyme IIC
Lmo0916	1.78	1.28	2.35	similar to phosphotransferase system enzyme IIA
Lmo1003	1.32	1.29	1.61	phosphotransferase system enzyme I
Lmo1017	1.01	0.73	1.16	similar to phosphotransferase system glucose-specific enzyme IIA
Lmo1034	2.95	1.12	1.43	similar to glycerol kinase
Lmo1035	2.04	n.a.	1.37	similar to phosphotransferase system (PTS) beta-glucoside-specific enzyme IIABC
Lmo1095	0.89	0.79	1.06	similar to PTS system, cellobiose-specific IIB component (cel A)
Lmo1167	1.27	n.a.	n.a.	glpF - similar to glycerol uptake facilitator protein
Lmo1255	1.06	n.a.	n.a.	similar to PTS system trehalose specific enzyme IIBC

Genename	d0096-8/ EGD-e	d0781-4/ EGD-e	ManPTS/ EGD-e	Funktion
Lmo1293	0.29	1.22	1.08	glpD - similar to glycerol 3 phosphate dehydrogenase
Lmo1538	0.93	1.93	1.44	similar to glycerol kinase
Lmo1539	0.98	2.19	1.93	similar to glycerol uptake facilitator
Lmo1719	0.24	0.25	0.74	similar to phosphotransferase system (PTS) lichenan-specific enzyme IIA component
Lmo1720	0.14	0.12	0.45	similar to phosphotransferase system (PTS) lichenan-specific enzyme IIB component
Lmo1737	1.45	1.04	1.41	similar to glycerol dehydrogenase
Lmo1971	5.79	n.a.	n.a.	similar to pentitol PTS system enzyme II C component
Lmo1972	2.23	n.a.	1.28	similar to pentitol PTS system enzyme II B component
Lmo1973	2.98	n.a.	1.57	similar to PTS system enzyme II A component
Lmo1997	2.73	n.a.	n.a.	similar to PTS mannose-specific enzyme IIA component
Lmo2000	3.31	3.48	n.a.	similar to PTS mannose-specific enzyme IID component
Lmo2001	2.97	3.40	n.a.	similar to PTS mannose-specific enzyme IIC component
Lmo2002	2.84	2.26	n.a.	similar to PTS mannose-specific enzyme IIB component
Lmo2096	1.63	1.20	n.a.	similar to PTS system galactitol-specific enzyme IIC component
Lmo2097	3.88	1.78	n.a.	similar to PTS system galactitol-specific enzyme IIB component
Lmo2098	5.19	n.a.	n.a.	similar to PTS system galactitol-specific enzyme IIA component
Lmo2135	n.a.	n.a.	n.a.	similar to PTS system, fructose-specific enzyme IIC component
Lmo2136	n.a.	n.a.	n.a.	similar to PTS system, fructose-specific enzyme IIB component
Lmo2137	n.a.	n.a.	n.a.	similar to PTS system, fructose-specific enzyme IIA component
Lmo2259	1.16	0.87	1.17	similar to phosphotransferase system (PTS) beta-glucoside-specific enzyme IIA
Lmo2335	2.07	1.72	1.80	fruA - highly similar to phosphotransferase system (PTS) fructose-specific enzyme IIABC component
Lmo2373	1.14	0.86	1.09	similar to phosphotransferase system (PTS) beta-glucoside-specific enzyme IIB component
Lmo2649	n.a.	n.a.	n.a.	similar to hypothetical PTS enzyme IIC component
Lmo2650	0.70	n.a.	n.a.	similar to hypothetical PTS enzyme IIB component
Lmo2651	0.58	n.a.	n.a.	similar to mannitol-specific PTS enzyme IIA component
Lmo2665	2.72	1.91	2.11	similar to PTS system galactitol-specific enzyme IIC component
Lmo2666	2.93	1.63	2.62	similar to PTS system galactitol-specific enzyme IIB component
Lmo2667	2.62	1.58	2.54	similar to PTS system galactitol-specific enzyme IIA component
Lmo2683	0.05	0.01	0.14	similar to cellobiose phosphotransferase enzyme IIB component
Lmo2684	0.24	0.04	1.53	similar to cellobiose phosphotransferase enzyme IIC component
Lmo2685	1.52	0.44	1.78	similar to cellobiose phosphotransferase enzyme IIA component
Lmo2695	0.21	0.91	0.57	similar to dihydroxyacetone kinase
Lmo2696	0.22	0.90	0.56	similar to hypothetical dihydroxyacetone kinase
Lmo2708	2.37	n.a.	n.a.	similar to PTS system, cellobiose-specific enzyme IIC
Lmo2733	n.a.	1.95	n.a.	similar to PTS system, fructose-specific IIABC component
Lmo2762	n.a.	n.a.	n.a.	similar to PTS cellobiose-specific enzyme IIB
Lmo2763	n.a.	n.a.	n.a.	similar to PTS cellobiose-specific enzyme IIC
Lmo2765	n.a.	n.a.	n.a.	similar to PTS cellobiose-specific enzyme IIA
Lmo2772	2.27	1.87	n.a.	similar to beta-glucoside-specific enzyme IIABC
Lmo2780	n.a.	n.a.	n.a.	similar to cellobiose PTS enzyme IIA
Lmo2782	n.a.	n.a.	n.a.	similar to PTS, cellobiose-specific IIB component
Lmo2783	1.56	0.82	n.a.	similar to cellobiose phosphotransferase system enzyme IIC
Lmo2787	n.a.	n.a.	n.a.	beta-glucoside-specific phosphotransferase enzyme II ABC component
Lmo2797	4.76	4.11	2.92	similar to phosphotransferase system mannitol-specific enzyme IIA

Genename	d0096-8/ EGD-e	d0781-4/ EGD-e	ManPTS/ EGD-e	Funktion
Lmo2799	8.99	n.a.	3.67	similar to phosphotransferase system mannitol-specific enzyme IIBC
Lmo2850	n.a.	n.a.	n.a.	similar to sugar transport proteins

**Tabelle 20** Vergleichende Transkriptomanalyse der Gene codierend für *prfA*, die PrfA-abhängigen Virulenzgene und aller PTS-Gene in *L. monocytogenes* EGD-e  $\Delta$ lmo0027, EGD-e  $\Delta$ lmo0096-0098  $\Delta$ lmo0027, EGD-e  $\Delta$ lmo0096-0098  $\Delta$ lmo0781-0784  $\Delta$ lmo0027 und der PTS<sup>Man</sup> Deletionsmutante ManPTS  $\Delta$ lmo0027 im Vergleich zum Wildtyp EGD-e nach Wachstum in MM mit 10 mM Glucose, n.a. steht für unter den Bedingungen nicht detektierbare Gene.

Genname	d0027/ EGD- e	d0096-8 d0027/ EGD-e	d0096-8 d0781-4 d0027/ EGD-e	ManPTS d0027/ EGD- e
Lmo0200	1.38	1.64	2.23	3.93
Lmo0201	1.30	1.36	2.29	13.56
Lmo0202	0.92	1.91	2.07	26.10
Lmo0203	1.04	1.45	1.97	8.26
Lmo0204	1.03	1.66	2.29	23.09
Lmo0205	1.08	1.52	2.29	26.36
Lmo0433	0.98	1.56	2.33	1.98
Lmo0434	1.29	1.40	1.25	1.38
Lmo0838	1.33	5.13	4.60	14.15
Lmo1786	1.24	1.17	3.15	7.34
Lmo0021	n.a.	1.74	1.87	n.a.
Lmo0022	n.a.	2.27	n.a.	n.a.
Lmo0023	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Lmo0024	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Lmo0027	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Lmo0034	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Lmo0096	1.12	0.01	0.10	0.02
Lmo0097	1.13	0.01	0.08	0.01
Lmo0098	1.22	0.01	0.10	0.01
Lmo0169	1.08	0.11	0.38	0.20
Lmo0176	0.96	1.32	0.75	0.66
Lmo0258	1.15	1.11	0.84	0.92
Lmo0298	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Lmo0299	1.07	1.62	n.a.	n.a.
Lmo0301	n.a.	n.a.	1.44	n.a.
Lmo0344	1.11	1.22	1.54	n.a.
Lmo0347	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Lmo0348	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Lmo0357	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Lmo0358	n.a.	n.a.	n.a.	1.68
Lmo0373	n.a.	n.a.	n.a.	2.15
Lmo0374	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Lmo0398	1.12	0.55	0.90	3.05
Lmo0399	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Lmo0400	n.a.	2.77	n.a.	n.a.
Lmo0424	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Lmo0426	n.a.	3.28	n.a.	3.52

Genname	d0027/ EGD- e	d0096-8 d0027/ EGD-e	d0096-8 d0781-4 d0027/ EGD-e	ManPTS d0027/ EGD- e
Lmo0427	n.a.	3.70	1.65	4.11
Lmo0428	0.99	3.29	1.96	5.22
Lmo0503	1.04	1.46	n.a.	2.31
Lmo0507	n.a.	1.80	n.a.	2.44
Lmo0508	n.a.	1.19	n.a.	2.46
Lmo0542	n.a.	2.44	n.a.	n.a.
Lmo0543	1.00	2.66	n.a.	n.a.
Lmo0544	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Lmo0631	n.a.	2.38	n.a.	n.a.
Lmo0632	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Lmo0633	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Lmo0738	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Lmo0781	1.23	3.07	0.48	0.09
Lmo0782	1.26	3.63	0.09	0.02
Lmo0783	1.07	3.69	0.08	0.01
Lmo0784	0.90	3.26	0.08	0.03
Lmo0859	1.05	1.58	2.70	4.51
Lmo0874	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Lmo0875	1.14	1.11	n.a.	n.a.
Lmo0876	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Lmo0901	n.a.	0.82	n.a.	n.a.
Lmo0914	1.10	0.81	0.89	1.33
Lmo0915	0.90	n.a.	1.90	3.34
Lmo0916	0.93	1.30	2.59	n.a.
Lmo1003	1.15	1.45	1.55	1.08
Lmo1017	1.04	0.79	0.92	0.38
Lmo1034	n.a.	1.43	n.a.	1.65
Lmo1035	n.a.	2.06	n.a.	0.80
Lmo1095	1.00	0.80	0.72	0.65
Lmo1167	n.a.	n.a.	n.a.	1.25
Lmo1255	0.87	n.a.	n.a.	2.16
Lmo1293	1.14	0.33	1.83	1.76
Lmo1538	1.26	1.08	5.62	5.14
Lmo1539	1.16	1.07	10.53	9.23
Lmo1719	1.48	0.28	0.99	1.09
Lmo1720	1.14	0.17	0.41	0.77
Lmo1737	1.13	1.23	0.78	1.26
Lmo1971	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Lmo1972	n.a.	1.57	0.95	n.a.
Lmo1973	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Lmo1997	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Lmo2000	n.a.	2.21	1.76	n.a.
Lmo2001	n.a.	2.69	2.27	n.a.
Lmo2002	n.a.	1.92	1.47	n.a.
Lmo2096	1.05	1.77	1.31	4.45
Lmo2097	n.a.	3.81	2.02	6.92
Lmo2098	n.a.	4.09	3.21	7.36

Genname	d0027/ EGD-e	d0096-8 d0027/ EGD-e	d0096-8 d0781-4 d0027/ EGD-e	ManPTS d0027/ EGD-e
Lmo2135	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Lmo2136	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Lmo2137	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Lmo2259	1.02	1.01	1.10	0.90
Lmo2335	1.22	1.19	1.23	2.16
Lmo2373	1.35	0.80	0.99	1.07
Lmo2649	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Lmo2650	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Lmo2651	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Lmo2665	n.a.	2.75	1.70	4.57
Lmo2666	1.08	2.38	2.09	4.57
Lmo2667	0.94	2.36	1.89	4.89
Lmo2683	1.40	0.06	0.90	2.97
Lmo2684	1.74	0.27	6.41	16.21
Lmo2685	1.59	1.47	6.51	35.94
Lmo2695	1.16	0.21	1.00	1.63
Lmo2696	1.13	0.22	0.83	1.54
Lmo2708	1.14	1.94	24.46	383.86
Lmo2733	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Lmo2762	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Lmo2763	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Lmo2765	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Lmo2772	n.a.	7.76	6.48	19.87
Lmo2780	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Lmo2782	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Lmo2783	1.27	1.07	n.a.	n.a.
Lmo2787	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Lmo2797	n.a.	4.31	n.a.	5.72
Lmo2799	n.a.	5.22	n.a.	n.a.
Lmo2850	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.

**Tabelle 21** Vergleichende Transkriptomanalyse der Gene codierend für *prfA*, die PrfA-abhängigen Virulenzgene und einiger PTS-Gene in *L. monocytogenes* EGD-e  $\Delta$ ManPTS  $\Delta$ 0027  $\Delta$  2683-5 und EGD-e  $\Delta$ ManPTS  $\Delta$ 0027  $\Delta$  2683-5  $\Delta$ 2708 im Vergleich zum Wildtyp EGD-e nach Wachstum in MM mit 10 mM Glucose, n.a. steht für unter den Bedingungen nicht detektierbare Gene.

Genname	ManPTS d0027 d2683-5/ EGD-e	ManPTS d0027 d2683-5 d2708/ EGD-e	Funktion
Lmo0200	2.44	43.57	<i>prfA</i> - listeriolysin positive regulatory protein
Lmo0201	4.34	22.38	<i>plcA</i> - phosphatidylinositol-specific phospholipase c
Lmo0202	5.04	50.10	<i>hly</i> - listeriolysin O precursor
Lmo0203	4.06	13.78	<i>mpl</i> - Zinc metalloproteinase precursor
Lmo0204	4.92	28.59	<i>actA</i> - actin-assembly inducing protein precursor
Lmo0205	5.81	4.25	<i>plcB</i> - phospholipase C
Lmo0433	2.63	0.39	<i>inlA</i> - InternalinA
Lmo0434	2.52	0.48	<i>inlB</i> - InternalinB
Lmo0838	15.92	5.69	<i>uhpT</i> - highly similar to hexose phosphate transport protein
Lmo1786	9.43	2.64	<i>inlC</i> - Internalin C

Genname	ManPTS d0027 d2683-5/ EGD-e	ManPTS d0027 d2683-5 d2708/ EGD-e	Funktion
Lmo0021	n.a.	n.a.	similar to PTS system, fructose-specific IIA component
Lmo0022	n.a.	n.a.	similar to PTS system, fructose-specific IIB component
Lmo0023	n.a.	n.a.	similar to PTS system, fructose-specific IIC component
Lmo0024	n.a.	n.a.	similar to PTS system, mannose-specific IID component
Lmo0027	n.a.	n.a.	similar to PTS system, beta-glucosides specific enzyme IIABC
Lmo0034	n.a.	n.a.	similar to PTS system, cellobiose-specific IIC component
Lmo0096	0.03	0.01	similar to PTS system mannose-specific, factor IIAB
Lmo0097	0.02	0.01	similar to PTS system mannose-specific, factor IIC
Lmo0098	0.02	0.01	similar to PTS system mannose-specific, factor IID
Lmo0169	0.22	0.33	similar to a glucose uptake protein
Lmo0176	1.06	0.47	similar to a glucose uptake protein
Lmo0258	0.92	1.06	rpoB - RNA polymerase (beta subunit)
Lmo0298	n.a.	n.a.	similar to PTS beta-glucoside-specific enzyme IIC component
Lmo0299	n.a.	n.a.	similar to PTS beta-glucoside-specific enzyme IIB component
Lmo0301	n.a.	n.a.	similar to PTS beta-glucoside-specific enzyme IIA component
Lmo0344	n.a.	1.78	similar to dehydrogenase/reductase
Lmo0347	n.a.	n.a.	similar to dihydroxyacetone kinase
Lmo0348	n.a.	n.a.	similar to dihydroxyacetone kinase
Lmo0357	n.a.	n.a.	similar to PTS system, enzyme IIA component
Lmo0358	n.a.	n.a.	similar to PTS system, enzyme IIBC component
Lmo0373	n.a.	n.a.	similar to PTS betaglucoside-specific enzyme IIC component
Lmo0374	n.a.	n.a.	similar to PTS betaglucoside-specific enzyme IIB component
Lmo0398	n.a.	0.35	similar to phosphotransferase system enzyme IIA
Lmo0399	n.a.	n.a.	similar to fructose-specific phosphotransferase enzyme IIB
Lmo0400	n.a.	n.a.	similar to fructose-specific phosphotransferase enzyme IIC
Lmo0424	n.a.	n.a.	similar to Staphylococcus xylosus glucose uptake protein
Lmo0426	4.24	3.80	similar to PTS fructose-specific enzyme IIA component
Lmo0427	4.91	6.12	similar to PTS fructose-specific enzyme IIB component
Lmo0428	6.86	6.49	similar to PTS fructose-specific enzyme IIC component
Lmo0503	n.a.	n.a.	similar to PTS fructose-specific enzyme IIA component
Lmo0507	4.18	n.a.	similar to PTS system, Galactitol-specific IIB component
Lmo0508	n.a.	7.01	similar to PTS system, Galactitol-specific IIC component
Lmo0542	n.a.	n.a.	similar to PTS system, glucitol/sorbitol-specific enzyme IIA component
Lmo0543	n.a.	n.a.	similar to PTS system, glucitol/sorbitol-specific enzyme IIBC component
Lmo0544	n.a.	n.a.	similar to PTS system, glucitol/sorbitol-specific enzyme IICII component
Lmo0631	n.a.	n.a.	similar to PTS system, fructose-specific IIA component
Lmo0632	n.a.	n.a.	similar to PTS system, fructose-specific IIB component
Lmo0633	n.a.	n.a.	similar to PTS system, fructose-specific IIC component
Lmo0738	n.a.	68.82	similar to phosphotransferase system (PTS) beta-glucoside-specific enzyme IIABC component
Lmo0781	0.10	0.14	similar to mannose-specific phosphotransferase system (PTS) component IID
Lmo0782	0.03	0.03	similar to mannose-specific phosphotransferase system (PTS) component IIC
Lmo0783	0.01	0.01	similar to mannose-specific phosphotransferase system (PTS) component IIB
Lmo0784	0.02	0.02	similar to mannose-specific phosphotransferase system (PTS) component IIA



Genname	ManPTS d0027 d2683-5/ EGD-e	ManPTS d0027 d2683-5 d2708/ EGD-e	Funktion
Lmo0859	5.70	0.43	similar to putative sugar ABC transporter, periplasmic sugar-binding protein
Lmo0874	n.a.	n.a.	similar to PTS system enzyme IIA component
Lmo0875	n.a.	n.a.	similar to PTS system, beta-glucoside enzyme IIB component
Lmo0876	n.a.	n.a.	similar to PTS system, Lichenan-specific enzyme IIC component
Lmo0901	n.a.	n.a.	similar to PTS system, cellobiose-specific IIC component
Lmo0914	3.85	0.76	similar to PTS system, IIB component
Lmo0915	6.13	n.a.	similar to phosphotransferase system enzyme IIC
Lmo0916	6.76	n.a.	similar to phosphotransferase system enzyme IIA
Lmo1003	1.92	0.46	phosphotransferase system enzyme I
Lmo1017	1.10	0.29	similar to phosphotransferase system glucose-specific enzyme IIA
Lmo1034	n.a.	n.a.	similar to glycerol kinase
Lmo1035	n.a.	n.a.	similar to phosphotransferase system (PTS) beta-glucoside-specific enzyme IIABC
Lmo1095	1.14	0.38	similar to PTS system, cellobiose-specific IIB component (cel A)
Lmo1167	n.a.	n.a.	glpF - similar to glycerol uptake facilitator protein
Lmo1255	n.a.	n.a.	similar to PTS system trehalose specific enzyme IIBC
Lmo1293	1.18	2.09	glpD - similar to glycerol 3 phosphate dehydrogenase
Lmo1538	2.89	3.93	similar to glycerol kinase
Lmo1539	3.56	4.92	similar to glycerol uptake facilitator
Lmo1719	3.86	0.54	similar to phosphotransferase system (PTS) lichenan-specific enzyme IIA component
Lmo1720	2.69	0.47	similar to phosphotransferase system (PTS) lichenan-specific enzyme IIB component
Lmo1737	1.78	1.09	similar to glycerol dehydrogenase
Lmo1971	n.a.	n.a.	similar to pentitol PTS system enzyme II C component
Lmo1972	n.a.	n.a.	similar to pentitol PTS system enzyme II B component
Lmo1973	n.a.	n.a.	similar to PTS system enzyme II A component
Lmo1997	n.a.	n.a.	similar to PTS mannose-specific enzyme IIA component
Lmo2000	n.a.	n.a.	similar to PTS mannose-specific enzyme IID component
Lmo2001	n.a.	n.a.	similar to PTS mannose-specific enzyme IIC component
Lmo2002	n.a.	n.a.	similar to PTS mannose-specific enzyme IIB component
Lmo2096	6.49	32.26	similar to PTS system galactitol-specific enzyme IIC component
Lmo2097	9.07	38.86	similar to PTS system galactitol-specific enzyme IIB component
Lmo2098	9.24	34.50	similar to PTS system galactitol-specific enzyme IIA component
Lmo2135	n.a.	n.a.	similar to PTS system, fructose-specific enzyme IIC component
Lmo2136	n.a.	n.a.	similar to PTS system, fructose-specific enzyme IIB component
Lmo2137	n.a.	n.a.	similar to PTS system, fructose-specific enzyme IIA component
Lmo2259	1.36	0.51	similar to phosphotransferase system (PTS) beta-glucoside-specific enzyme IIA
Lmo2335	4.03	3.28	fruA - highly similar to phosphotransferase system (PTS) fructose-specific enzyme IIABC component
Lmo2373	1.75	0.89	similar to phosphotransferase system (PTS) beta-glucoside-specific enzyme IIB component
Lmo2649	n.a.	n.a.	similar to hypothetical PTS enzyme IIC component
Lmo2650	n.a.	n.a.	similar to hypothetical PTS enzyme IIB component
Lmo2651	n.a.	n.a.	similar to mannitol-specific PTS enzyme IIA component
Lmo2665	5.53	7.51	similar to PTS system galactitol-specific enzyme IIC component
Lmo2666	5.62	6.61	similar to PTS system galactitol-specific enzyme IIB component
Lmo2667	5.07	8.25	similar to PTS system galactitol-specific enzyme IIA component

Genname	ManPTS d0027 d2683-5/ EGD-e	ManPTS d0027 d2683-5 d2708/ EGD-e	Funktion
Lmo2683	0.07	0.01	similar to cellobiose phosphotransferase enzyme IIB component
Lmo2684	0.08	0.02	similar to cellobiose phosphotransferase enzyme IIC component
Lmo2685	0.57	n.a.	similar to cellobiose phosphotransferase enzyme IIA component
Lmo2695	0.64	1.04	similar to dihydroxyacetone kinase
Lmo2696	0.61	1.24	similar to hypothetical dihydroxyacetone kinase
Lmo2708	303.96	n.a.	similar to PTS system, cellobiose-specific enzyme IIC
Lmo2733	n.a.	n.a.	similar to PTS system, fructose-specific IABC component
Lmo2762	n.a.	n.a.	similar to PTS cellobiose-specific enzyme IIB
Lmo2763	n.a.	n.a.	similar to PTS cellobiose-specific enzyme IIC
Lmo2765	n.a.	n.a.	similar to PTS cellobiose-specific enzyme IIA
Lmo2772	26.54	11.08	similar to beta-glucoside-specific enzyme IABC
Lmo2780	n.a.	n.a.	similar to cellobiose PTS enzyme IIA
Lmo2782	n.a.	n.a.	similar to PTS, cellobiose-specific IIB component
Lmo2783	n.a.	n.a.	similar to cellobiose phosphotransferase system enzyme IIC
Lmo2787	n.a.	n.a.	beta-glucoside-specific phosphotransferase enzyme II ABC component
Lmo2797	n.a.	n.a.	similar to phosphotransferase system mannitol-specific enzyme IIA
Lmo2799	n.a.	n.a.	similar to phosphotransferase system mannitol-specific enzyme IIE
Lmo2850	n.a.	n.a.	similar to sugar transport proteins

**Tabelle 22** Vergleichende Transkriptomanalyse der Gene codierend für *prfA*, die PrfA-abhängigen Virulenzgene und einiger PTS-Gene in *L. monocytogenes* EGD-e  $\Delta$  2683-5 im Vergleich zum Wildtyp EGD-e nach Wachstum in MM mit 5 mM Cellobiose, n.a. steht für unter den Bedingungen nicht detektierbare Gene.

Genname	d2683-5/ EGD-e	Funktion
Lmo0200	2.12	prfA - listeriolysin positive regulatory protein
Lmo0201	1.94	plcA - phosphatidylinositol-specific phospholipase c
Lmo0202	1.74	hly - listeriolysin O precursor
Lmo0203	1.66	mpl - Zinc metalloproteinase precursor
Lmo0204	1.82	actA - actin-assembly inducing protein precursor
Lmo0205	2.38	plcB - phospholipase C
Lmo0433	1.03	inlA - InternalinA
Lmo0434	1.73	inlB - InternalinB
Lmo0838	4.17	uhpT - highly similar to hexose phosphate transport protein
Lmo1786	1.37	inlC - Internalin C
Lmo0021	1.15	similar to PTS system, fructose-specific IIA component
Lmo0022	n.a.	similar to PTS system, fructose-specific IIB component
Lmo0023	n.a.	similar to PTS system, fructose-specific IIC component
Lmo0024	n.a.	similar to PTS system, mannose-specific IID component
Lmo0027	61.40	similar to PTS system, beta-glucosides specific enzyme IABC
Lmo0034	n.a.	similar to PTS system, cellobiose-specific IIC component
Lmo0096	5.14	similar to PTS system mannose-specific, factor IIAB
Lmo0097	5.87	similar to PTS system mannose-specific, factor IIC
Lmo0098	7.23	similar to PTS system mannose-specific, factor IID
Lmo0169	0.92	similar to a glucose uptake protein
Lmo0176	0.85	similar to a glucose uptake protein
Lmo0258	0.94	rpoB - RNA polymerase (beta subunit)

Genname	d2683-5/ EGD-e	Funktion
Lmo0298	n.a.	similar to PTS beta-glucoside-specific enzyme IIC component
Lmo0299	n.a.	similar to PTS beta-glucoside-specific enzyme IIB component
Lmo0301	n.a.	similar to PTS beta-glucoside-specific enzyme IIA component
Lmo0344	1.29	similar to dehydrogenase/reductase
Lmo0347	n.a.	similar to dihydroxyacetone kinase
Lmo0348	n.a.	similar to dihydroxyacetone kinase
Lmo0357	n.a.	similar to PTS system, enzyme IIA component
Lmo0358	n.a.	similar to PTS system, enzyme IIBC component
Lmo0373	n.a.	similar to PTS betaglucoside-specific enzyme IIC component
Lmo0374	n.a.	similar to PTS betaglucoside-specific enzyme IIB component
Lmo0398	1.04	similar to phosphotransferase system enzyme IIA
Lmo0399	n.a.	similar to fructose-specific phosphotransferase enzyme IIB
Lmo0400	n.a.	similar to fructose-specific phosphotransferase enzyme IIC
Lmo0424	n.a.	similar to Staphylococcus xylosus glucose uptake protein
Lmo0426	1.80	similar to PTS fructose-specific enzyme IIA component
Lmo0427	1.89	similar to PTS fructose-specific enzyme IIB component
Lmo0428	1.86	similar to PTS fructose-specific enzyme IIC component
Lmo0503	n.a.	similar to PTS fructose-specific enzyme IIA component
Lmo0507	n.a.	similar to PTS system, Galactitol-specific IIB component
Lmo0508	n.a.	similar to PTS system, Galactitol-specific IIC component
Lmo0542	n.a.	similar to PTS system, glucitol/sorbitol-specific enzyme IIA component
Lmo0543	0.61	similar to PTS system, glucitol/sorbitol-specific enzyme IIBC component
Lmo0544	n.a.	similar to PTS system, glucitol/sorbitol-specific enzyme IICII component
Lmo0631	n.a.	similar to PTS system, fructose-specific IIA component
Lmo0632	n.a.	similar to PTS system, fructose-specific IIB component
Lmo0633	n.a.	similar to PTS system, fructose-specific IIC component
Lmo0738	n.a.	similar to phosphotransferase system (PTS) beta-glucoside-specific enzyme IIABC component
Lmo0781	1.53	similar to mannose-specific phosphotransferase system (PTS) component IID
Lmo0782	1.73	similar to mannose-specific phosphotransferase system (PTS) component IIC
Lmo0783	0.99	similar to mannose-specific phosphotransferase system (PTS) component IIB
Lmo0784	0.83	similar to mannose-specific phosphotransferase system (PTS) component IIA
Lmo0859	0.95	similar to putative sugar ABC transporter, periplasmic sugar-binding protein
Lmo0874	n.a.	similar to PTS system enzyme IIA component
Lmo0875	n.a.	similar to PTS system, beta-glucoside enzyme IIB component
Lmo0876	n.a.	similar to PTS system, Lichenan-specific enzyme IIC component
Lmo0901	n.a.	similar to PTS system, cellobiose-specific IIC component
Lmo0914	0.83	similar to PTS system, IIB component
Lmo0915	n.a.	similar to phosphotransferase system enzyme IIC
Lmo0916	n.a.	similar to phosphotransferase system enzyme IIA
Lmo1003	1.41	phosphotransferase system enzyme I
Lmo1017	1.06	similar to phosphotransferase system glucose-specific enzyme IIA
Lmo1034	n.a.	similar to glycerol kinase
Lmo1035	n.a.	similar to phosphotransferase system (PTS) beta-glucoside-specific enzyme IIABC
Lmo1095	1.20	similar to PTS system, cellobiose-specific IIB component (cel A)
Lmo1167	n.a.	glpF - similar to glycerol uptake facilitator protein
Lmo1255	n.a.	similar to PTS system trehalose specific enzyme IIBC
Lmo1293	1.36	glpD - similar to glycerol 3 phosphate dehydrogenase

<b>Genname</b>	<b>d2683-5/ EGD-e</b>	<b>Funktion</b>
<b>Lmo1538</b>	1.84	similar to glycerol kinase
<b>Lmo1539</b>	1.55	similar to glycerol uptake facilitator
<b>Lmo1719</b>	0.22	similar to phosphotransferase system (PTS) lichenan-specific enzyme IIA component
<b>Lmo1720</b>	0.13	similar to phosphotransferase system (PTS) lichenan-specific enzyme IIB component
<b>Lmo1737</b>	1.18	similar to glycerol dehydrogenase
<b>Lmo1971</b>	n.a.	similar to pentitol PTS system enzyme II C component
<b>Lmo1972</b>	n.a.	similar to pentitol PTS system enzyme II B component
<b>Lmo1973</b>	n.a.	similar to PTS system enzyme II A component
<b>Lmo1997</b>	n.a.	similar to PTS mannose-specific enzyme IIA component
<b>Lmo2000</b>	1.93	similar to PTS mannose-specific enzyme IID component
<b>Lmo2001</b>	1.57	similar to PTS mannose-specific enzyme IIC component
<b>Lmo2002</b>	1.27	similar to PTS mannose-specific enzyme IIB component
<b>Lmo2096</b>	0.94	similar to PTS system galactitol-specific enzyme IIC component
<b>Lmo2097</b>	n.a.	similar to PTS system galactitol-specific enzyme IIB component
<b>Lmo2098</b>	n.a.	similar to PTS system galactitol-specific enzyme IIA component
<b>Lmo2135</b>	n.a.	similar to PTS system, fructose-specific enzyme IIC component
<b>Lmo2136</b>	n.a.	similar to PTS system, fructose-specific enzyme IIB component
<b>Lmo2137</b>	n.a.	similar to PTS system, fructose-specific enzyme IIA component
<b>Lmo2259</b>	1.34	similar to phosphotransferase system (PTS) beta-glucoside-specific enzyme IIA
<b>Lmo2335</b>	1.62	fruA - highly similar to phosphotransferase system (PTS) fructose-specific enzyme IIABC component
<b>Lmo2373</b>	1.98	similar to phosphotransferase system (PTS) beta-glucoside-specific enzyme IIB component
<b>Lmo2649</b>	n.a.	similar to hypothetical PTS enzyme IIC component
<b>Lmo2650</b>	n.a.	similar to hypothetical PTS enzyme IIB component
<b>Lmo2651</b>	n.a.	similar to mannitol-specific PTS enzyme IIA component
<b>Lmo2665</b>	3.07	similar to PTS system galactitol-specific enzyme IIC component
<b>Lmo2666</b>	2.37	similar to PTS system galactitol-specific enzyme IIB component
<b>Lmo2667</b>	1.99	similar to PTS system galactitol-specific enzyme IIA component
<b>Lmo2683</b>	0.00	similar to cellobiose phosphotransferase enzyme IIB component
<b>Lmo2684</b>	0.00	similar to cellobiose phosphotransferase enzyme IIC component
<b>Lmo2685</b>	0.01	similar to cellobiose phosphotransferase enzyme IIA component
<b>Lmo2695</b>	1.06	similar to dihydroxyacetone kinase
<b>Lmo2696</b>	1.15	similar to hypothetical dihydroxyacetone kinase
<b>Lmo2708</b>	2.04	similar to PTS system, cellobiose-specific enzyme IIC
<b>Lmo2733</b>	0.96	similar to PTS system, fructose-specific IIABC component
<b>Lmo2762</b>	n.a.	similar to PTS cellobiose-specific enzyme IIB
<b>Lmo2763</b>	n.a.	similar to PTS cellobiose-specific enzyme IIC
<b>Lmo2765</b>	n.a.	similar to PTS cellobiose-specific enzyme IIA
<b>Lmo2772</b>	n.a.	similar to beta-glucoside-specific enzyme IIABC
<b>Lmo2780</b>	n.a.	similar to cellobiose PTS enzyme IIA
<b>Lmo2782</b>	n.a.	similar to PTS, cellobiose-specific IIB component
<b>Lmo2783</b>	n.a.	similar to cellobiose phosphotransferase system enzyme IIC
<b>Lmo2787</b>	n.a.	beta-glucoside-specific phosphotransferase enzyme II ABC component
<b>Lmo2797</b>	n.a.	similar to phosphotransferase system mannitol-specific enzyme IIA
<b>Lmo2799</b>	n.a.	similar to phosphotransferase system mannitol-specific enzyme IIBC
<b>Lmo2850</b>	n.a.	similar to sugar transport proteins

## F.2 Abkürzungen

$\alpha$	anti (für Antikörper)
A	Adenosin
Abb.	Abbildung
ActA/ <i>actA</i>	Aktin-bindender Faktor A/-Gen
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
Amp <sup>R</sup>	Ampicillinresistenz
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosintriphosphat
<i>B.</i>	<i>Bacillus</i>
BHI	Brain Heart Infusion
bp	Basenpaare
BPB	Bromphenolblau
BSA	Bovine Serum Albumine (Rinderserumalbumin)
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
ca.	circa
cDNA	komplementäre DNA
Da	Dalton
DEPC	Diethylpyrocarbonat
deion.	deionisiert
dest.	destilliert
d.h.	das heißt
DMFA	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphat
ds	doppelsträngig
DTT	Dithiothreitol
<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Em	Erythromycin
Em <sup>R</sup>	Erythromycinresistenz
<i>et al.</i>	und andere
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
evtl.	eventuell
F-Aktin	filamentöses Aktin
FCS	fötales Kälberserum
g	Gramm
G	Guanosin
G-Aktin	globuläres Aktin
h	Stunde
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinethansulfonsäure
i.d.R.	in der Regel
I-inl/ <i>i-inl</i>	Internalin/-Gen von <i>L. ivanovii</i>
InlA/ <i>inlA</i>	Internalin A/-Gen
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-Thiogalaktosid
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
KE	Klett-Einheiten
Km	Kanamycin
Km <sup>R</sup>	Kanamycinresistenz
kV	Kilovolt
l	Liter

<i>L.</i>	<i>Listeria</i>
LB	Luria-Bertani
LIPI-1	<i>Listeria</i> Pathogenitätsinsel 1 (Virulenzgencluster)
LLO/ <i>hly</i>	Listeriolysin O/-Gen
log.	logarithmisch
LRRs	Leucin-reiche Repeats
Lsg.	Lösung
LZZ	Lebendzellzahl
μ	mikro (10 <sup>-6</sup> )
m	milli (10 <sup>-3</sup> )
M	Molar
MCS	Multiple Cloning Site
MM	Minimal-Medium
min.	Minute
MOI	Multiplizität der Infektion
Mpl/ <i>mpl</i>	Metalloprotease/-Gen
mRNA	Messenger RNA
MW	Molekulargewicht
n	nano (10 <sup>-9</sup> )
OD...	optische Dichte bei ... nm
ORF	Open Reading Frame
p	pico (10 <sup>-12</sup> )
p60/ <i>iap</i>	60 kDa-Protein/-Gen
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PC-PLC/ <i>plcB</i>	Phosphatidylcholin-spezifische Phospholipase C/-Gen
PCR	Polymerase Chain Reaction
PI-PLC/ <i>plcA</i>	Phosphatidylinositol-spezifische Phospholipase C/-Gen
PNK	Polynukleotidkinase
PrfA/ <i>prfA</i>	Positiver Regulationsfaktor A/-Gen
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur; Reverse Transkription
sek	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
s.o.	siehe oben
SOD/ <i>sod</i>	Superoxid-Dismutase/-Gen
sog.	sogenannt
ss	einzelsträngig
Sv	Serovar
T	Thymidin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
T <sub>m</sub>	Schmelztemperatur
Tris	Tetramethyl Rhodamine Isocyanat
U	Unit (Einheit)
u.a.	unter anderem
ÜN	über Nacht
ÜNK	Übernachtkultur
UV	Ultraviolett
vgl.	vergleiche
Vol.	Volumen
v/v	"volume to volume"
W	Watt
w/v	"weight to volume"
WT	Wildtyp
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-D-Galaktosid
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil
ZZ	Zellzahl

## G Literatur

- Abram, M., Schluter, D., Vuckovic, D., Wraber, B., Doric, M., and Deckert, M. (2003) Murine model of pregnancy-associated *Listeria monocytogenes* infection. *FEMS Immunol Med Microbiol* **35**: 177-182.
- Ali, N.O., Bignon, J., Rapoport, G., and Debarbouille, M. (2001) Regulation of the acetoin catabolic pathway is controlled by sigma L in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **183**: 2497-2504.
- Alvarez-Dominguez, C., Vazquez-Boland, J.A., Carrasco-Marin, E., Lopez-Mato, P., and Leyva-Cobian, F. (1997) 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.
- Andrews, N.W., and Portnoy, D.A. (1994) Cytolysins from intracellular pathogens. *Trends Microbiol* **2**: 261-263.
- Arous, S., Buchrieser, C., Folio, P., Glaser, P., Namane, A., Hebraud, M., and Hechard, Y. (2004a) Global analysis of gene expression in an rpoN mutant of *Listeria monocytogenes*. *Microbiology* **150**: 1581-1590.
- Arous, S., Dalet, K., and Hechard, Y. (2004b) Involvement of the mpo operon in resistance to class IIa bacteriocins in *Listeria monocytogenes*. *FEMS Microbiol Lett* **238**: 37-41.
- Barabote, R.D., and Saier, M.H., Jr. (2005) Comparative genomic analyses of the bacterial phosphotransferase system. *Microbiol Mol Biol Rev* **69**: 608-634.
- Barrios, H., Valderrama, B., and Morett, E. (1999) Compilation and analysis of sigma(54)-dependent promoter sequences. *Nucleic Acids Res* **27**: 4305-4313.
- Beauregard, K.E., Lee, K.D., Collier, R.J., and Swanson, J.A. (1997) pH-dependent perforation of macrophage phagosomes by listeriolysin O from *Listeria monocytogenes*. *J Exp Med* **186**: 1159-1163.
- Beckerling, C.L., Steil, L., Weber, M.H., Volker, U., and Marahiel, M.A. (2002) Genomewide transcriptional analysis of the cold shock response in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **184**: 6395-6402.
- Behari, J., and Youngman, P. (1998) A homolog of CcpA mediates catabolite control in *Listeria monocytogenes* but not carbon source regulation of virulence genes. *J Bacteriol* **180**: 6316-6324.
- Bergmann, B., Raffelsbauer, D., Kuhn, M., Goetz, M., Hom, S., and 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., Sabet, C., Personnic, N., and Cossart, P. (2007) Internalins: a complex family of leucine-rich repeat-containing proteins in *Listeria monocytogenes*. *Microbes Infect* **9**: 1156-1166.
- Böckmann, R., Dickneite, C., Middendorf, B., Goebel, W., and 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., and 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., and Goebel, W. (1994) Transcriptional regulation of prfA and PrfA-regulated virulence genes in *Listeria monocytogenes*. *Mol Microbiol* **11**: 1141-1150.
- Bourassa, S., and Vadeboncoeur, C. (1992) Expression of an inducible enzyme II fructose and activation of a cryptic enzyme II glucose in glucose-grown cells of spontaneous

- mutants of *Streptococcus salivarius* lacking the low-molecular-mass form of III<sub>man</sub>, a component of the phosphoenolpyruvate:mannose phosphotransferase system. *J Gen Microbiol* **138**: 769-777.
- Brehm, K., Haas, A., Goebel, W., and Kreft, J. (1992) A gene encoding a superoxide dismutase of the facultative intracellular bacterium *Listeria monocytogenes*. *Gene* **118**: 121-125.
- Brehm, K., Ripio, M.T., Kreft, J., and Vazquez-Boland, J.A. (1999) The *bvr* locus of *Listeria monocytogenes* mediates virulence gene repression by beta-glucosides. *J Bacteriol* **181**: 5024-5032.
- Brundage, R.A., Smith, G.A., Camilli, A., Theriot, J.A., and Portnoy, D.A. (1993) Expression and phosphorylation of the *Listeria monocytogenes* ActA protein in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 11890-11894.
- Buchrieser, C. (2007) Biodiversity of the species *Listeria monocytogenes* and the genus *Listeria*. *Microbes Infect* **9**: 1147-1155.
- Busby, S., and Ebright, R.H. (1999) Transcription activation by catabolite activator protein (CAP). *J Mol Biol* **293**: 199-213.
- Cabanes, D., Dussurget, O., Dehoux, P., and Cossart, P. (2004) Auto, a surface associated autolysin of *Listeria monocytogenes* required for entry into eukaryotic cells and virulence. *Mol Microbiol* **51**: 1601-1614.
- Cabanes, D., Sousa, S., Cebria, A., Lecuit, M., Garcia-del Portillo, F., and Cossart, P. (2005) Gp96 is a receptor for a novel *Listeria monocytogenes* virulence factor, Vip, a surface protein. *Embo J* **24**: 2827-2838.
- Calogero, S., Gardan, R., Glaser, P., Schweizer, J., Rapoport, G., and Debarbouille, M. (1994) RocR, a novel regulatory protein controlling arginine utilization in *Bacillus subtilis*, belongs to the NtrC/NifA family of transcriptional activators. *J Bacteriol* **176**: 1234-1241.
- Camilli, A., Goldfine, H., and Portnoy, D.A. (1991) *Listeria monocytogenes* mutants lacking phosphatidylinositol-specific phospholipase C are avirulent. *J Exp Med* **173**: 751-754.
- Chaillou, S., Postma, P.W., and Pouwels, P.H. (2001) Contribution of the phosphoenolpyruvate:mannose phosphotransferase system to carbon catabolite repression in *Lactobacillus pentosus*. *Microbiology* **147**: 671-679.
- Chakraborty, T., Leimeister-Wächter, M., Domann, E., Hartl, M., Goebel, W., Nichterlein, T., and Notermans, S. (1992a) Coordinate regulation of virulence genes in *Listeria monocytogenes* requires the product of the *prfA* gene. *J Bacteriol* **174**: 568-574.
- Chakraborty, T., Leimeister-Wächter, M., Domann, E., Hartl, M., Goebel, W., Nichterlein, T., and Notermans, S. (1992b) Coordinate regulation of virulence genes in *Listeria monocytogenes* requires the product of the *prfA* gene. *J Bacteriol* **174**: 568-574.
- Chastanet, A., Derre, I., Nair, S., and Msadek, T. (2004) *clpB*, a novel member of the *Listeria monocytogenes* CtsR regulon, is involved in virulence but not in general stress tolerance. *J Bacteriol* **186**: 1165-1174.
- Chico-Calero, I., Suarez, M., Gonzalez-Zorn, B., Scotti, M., Slaghuis, J., Goebel, W., and Vazquez-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., and Wilfinger, W. (1997) DNAzol: a reagent for the rapid isolation of genomic DNA. *Biotechniques* **22**: 550-553.
- Christensen, D.P., and Hutkins, R.W. (1994) Glucose uptake by *Listeria monocytogenes* Scott A and inhibition by pediocin JD. *Appl Environ Microbiol* **60**: 3870-3873.
- Cline, G.W., Jucker, B.M., Trajanoski, Z., Rennings, A.J., and Shulman, G.I. (1998) A novel <sup>13</sup>C NMR method to assess intracellular glucose concentration in muscle, *in vivo*. *Am J Physiol* **274**: E381-389.



- Collins, M.D., Wallbanks, S., Lane, D.J., Shah, J., Nietupski, R., Smida, J., Dorsch, M., and 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., and Mengaud, J. (1989) *Listeria monocytogenes*. A model system for the molecular study of intracellular parasitism. *Mol Biol Med* **6**: 463-474.
- Cossart, P., and 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. (2007) Listeriology (1926-2007): the rise of a model pathogen. *Microbes Infect* **9**: 1143-1146.
- Cowart, R.E., and 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.
- Dabiri, G.A., Sanger, J.M., Portnoy, D.A., and 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.
- Dalet, K., Cenatiempo, Y., Cossart, P., and Hechard, Y. (2001) A sigma(54)-dependent PTS permease of the mannose family is responsible for sensitivity of *Listeria monocytogenes* to mesentericin Y105. *Microbiology* **147**: 3263-3269.
- Dalet, K., Arous, S., Cenatiempo, Y., and Hechard, Y. (2003) Characterization of a unique sigma54-dependent PTS operon of the lactose family in *Listeria monocytogenes*. *Biochimie* **85**: 633-638.
- Dalton, C.B., Austin, C.C., Sobel, J., Hayes, P.S., Bibb, W.F., Graves, L.M., Swaminathan, B., Proctor, M.E., and Griffin, P.M. (1997) An outbreak of gastroenteritis and fever due to *Listeria monocytogenes* in milk. *N Engl J Med* **336**: 100-105.
- Darbon, E., Servant, P., Poncet, S., and Deutscher, J. (2002) Antitermination by GlpP, catabolite repression via CcpA and inducer exclusion triggered by P-GlpK dephosphorylation control *Bacillus subtilis* glpFK expression. *Mol Microbiol* **43**: 1039-1052.
- Datta, A.R., and Kothary, M.H. (1993) Effects of glucose, growth temperature, and pH on listeriolysin O production in *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol* **59**: 3495-3497.
- Debarbouille, M., Martin-Verstraete, I., Klier, A., and Rapoport, G. (1991) The transcriptional regulator LevR of *Bacillus subtilis* has domains homologous to both sigma 54- and phosphotransferase system-dependent regulators. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 2212-2216.
- Debarbouille, M., Gardan, R., Arnaud, M., and Rapoport, G. (1999) Role of bkdR, a transcriptional activator of the sigL-dependent isoleucine and valine degradation pathway in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **181**: 2059-2066.
- Demuth, A., Chakraborty, T., Krohne, G., and Goebel, W. (1994) Mammalian cells transfected with the listeriolysin gene exhibit enhanced proliferation and focus formation. *Infect Immun* **62**: 5102-5111.
- Deutscher, J., Kuster, E., Bergstedt, U., Charrier, V., and Hillen, W. (1995) Protein kinase-dependent HPr/CcpA interaction links glycolytic activity to carbon catabolite repression in gram-positive bacteria. *Mol Microbiol* **15**: 1049-1053.
- Deutscher, J., Francke, C., and Postma, P.W. (2006) How phosphotransferase system-related protein phosphorylation regulates carbohydrate metabolism in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* **70**: 939-1031.
- Deutscher, J. (2008) The mechanisms of carbon catabolite repression in bacteria. *Curr Opin Microbiol*.

- Dickneite, C., Böckmann, R., Spory, A., Goebel, W., and 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., and Chakraborty, T. (1989) Nucleotide sequence of the listeriolysin gene from a *Listeria monocytogenes* serotype 1/2a strain. *Nucleic Acids Res* **17**: 6406.
- Domann, E., Wehland, J., Niebuhr, K., Haffner, C., Leimeister-Wachter, M., and 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.
- Doumith, M., Cazalet, C., Simoes, N., Frangeul, L., Jacquet, C., Kunst, F., Martin, P., Cossart, P., Glaser, P., and Buchrieser, C. (2004) New aspects regarding evolution and virulence of *Listeria monocytogenes* revealed by comparative genomics and DNA arrays. *Infect Immun* **72**: 1072-1083.
- Dramsi, S., Kocks, C., Forestier, C., and 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., and 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., Levi, S., Triller, A., and Cossart, P. (1998) Entry of *Listeria monocytogenes* into neurons occurs by cell-to-cell spread: an in vitro study. *Infect Immun* **66**: 4461-4468.
- Dramsi, S., Bourdichon, F., Cabanes, D., Lecuit, M., Fsihi, H., and Cossart, P. (2004) FbpA, a novel multifunctional *Listeria monocytogenes* virulence factor. *Mol Microbiol* **53**: 639-649.
- Drevets, D.A., Sawyer, R.T., Potter, T.A., and Campbell, P.A. (1995) *Listeria monocytogenes* infects human endothelial cells by two distinct mechanisms. *Infect Immun* **63**: 4268-4276.
- Dussurget, O., Cabanes, D., Dehoux, P., Lecuit, M., Buchrieser, C., Glaser, P., and 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.
- Dussurget, O., Pizarro-Cerda, J., and Cossart, P. (2004) Molecular determinants of *Listeria monocytogenes* virulence. *Annu Rev Microbiol* **58**: 587-610.
- Ecke, R. (2004) Faktoren und Bedingungen zur Modulation der Aktivität von PrfA, dem Hauptregulator der Virulenzgene von *Listeria monocytogenes*. *Diplomarbeit*.
- Ecke, R., Mauder, N., Mertins, S., Loeffler, D.I., Seidel, G., Sprehe, M., Hillen, W., Goebel, W., and Müller-Altrock, S. (2006) Species-specific differences in the activity of PrfA, the key regulator of listerial virulence genes. *J Bacteriol* **188**: 7941-7956.
- Eisenreich, W., Slaghuis, J., Laupitz, R., Bussemer, J., Stritzker, J., Schwarz, C., Schwarz, R., Dandekar, T., Goebel, W., and Bacher, A. (2006) <sup>13</sup>C isotopologue perturbation studies of *Listeria monocytogenes* carbon metabolism and its modulation by the virulence regulator PrfA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 2040-2045.
- Eiting, M., Hagelucken, G., Schubert, W.D., and 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., and 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., Dominguez-Bernal, G., Hess, J., Dickneite, C., Greiffenberg, L., Lampidis, R., Raffelsbauer, D., Daniels, J.J., Kreft, J., Kaufmann, S.H., Vazquez-Boland, J.A.,

- and Goebel, W. (1998) 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., and 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., Scotti, M., and Vázquez-Boland, J.A. (2004) Negative control of *Listeria monocytogenes* virulence genes by a diffusible autorepressor. *Mol Microbiol* **52**: 601-611.
- Eylert, E., Schär, J., Mertins, S., Stoll, R., Bacher, A., Goebel, W., and Eisenreich, W. (2008) Carbon metabolism of *Listeria monocytogenes* growing inside macrophages. *Mol Microbiol*.
- Farber, J.M., and Peterkin, P.I. (1991) *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiol Rev* **55**: 476-511.
- Freitag, N.E., Youngman, P., and Portnoy, D.A. (1992) Transcriptional activation of the *Listeria monocytogenes* hemolysin gene in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **174**: 1293-1298.
- Freitag, N.E., Rong, L., and 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., and 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.
- Galnier, A., Haiech, J., Kilhoffer, M.C., Jaquinod, M., Stulke, J., Deutscher, J., and Martin-Verstraete, I. (1997) The *Bacillus subtilis* *crh* gene encodes a HPr-like protein involved in carbon catabolite repression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 8439-8444.
- Gandhi, M., and Chikindas, M.L. (2007) *Listeria*: A foodborne pathogen that knows how to survive. *Int J Food Microbiol* **113**: 1-15.
- Garges, S., and Adhya, S. (1985) Sites of allosteric shift in the structure of the cyclic AMP receptor protein. *Cell* **41**: 745-751.
- Gedde, M.M., Higgins, D.E., Tilney, L.G., and Portnoy, D.A. (2000) Role of listeriolysin O in cell-to-cell spread of *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun* **68**: 999-1003.
- Gellin, B.G., and Broome, C.V. (1989) Listeriosis. *Jama* **261**: 1313-1320.
- Geoffroy, C., Gaillard, J.L., Alouf, J.E., and Berche, P. (1987) Purification, characterization, and toxicity of the sulfhydryl-activated hemolysin listeriolysin O from *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun* **55**: 1641-1646.
- Geoffroy, C., Gaillard, J.L., Alouf, J.E., and Berche, P. (1989) Production of thiol-dependent haemolysins by *Listeria monocytogenes* and related species. *J Gen Microbiol* **135**: 481-487.
- Geoffroy, C., Raveneau, J., Beretti, J.L., Lecroisey, A., Vazquez-Boland, J.A., Alouf, J.E., and Berche, P. (1991) Purification and characterization of an extracellular 29-kilodalton phospholipase C from *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun* **59**: 2382-2388.
- Gilbreth, S.E., Benson, A.K., and Hutkins, R.W. (2004) Catabolite repression and virulence gene expression in *Listeria monocytogenes*. *Curr Microbiol* **49**: 95-98.
- Glaser, P., Frangeul, L., Buchrieser, C., Rusniok, C., Amend, A., Baquero, F., Berche, P., Bloecker, H., Brandt, P., Chakraborty, T., Charbit, A., Chetouani, F., Couvé, 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., Gómez-López, 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., Pérez-Díaz, J.C., Purcell, R., Rimmel, B., Rose, M., Schlueter, T., Simoes, N., Tierrez, A., Vázquez-Boland, J.A., Voss, H., Wehland, J., and Cossart, P. (2001) Comparative genomics of *Listeria* species. *Science* **294**: 849-852.
- Goebel, W., Kathariou, S., Kuhn, M., Sokolovic, Z., Kreft, J., Kohler, S., Funke, D., Chakraborty, T., and Leimeister-Wächter, M. (1988) Hemolysin from *Listeria*--biochemistry, genetics and function in pathogenesis. *Infection* **16 Suppl 2**: S149-156.
- Goebel, W., Müller-Altrock, S., and Kreft, J. (2006) Regulation of virulence genes in pathogenic *Listeria* spp. In *Gram-Positive Pathogens*. Fischetti, V.A., Novick, R.P., Ferretti, J.J., Portnoy, D.A. and Rood, J.I. (eds). Washington, DC: ASM Press, pp. 499–506.
- Goetz, M., Bubert, A., Wang, G., Chico-Calero, I., Vazquez-Boland, J.A., Beck, M., Slaghuis, J., Szalay, A.A., and Goebel, W. (2001) Microinjection and growth of bacteria in the cytosol of mammalian host cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 12221-12226.
- Goldfine, H., and Wadsworth, S.J. (2002) Macrophage intracellular signaling induced by *Listeria monocytogenes*. *Microbes Infect* **4**: 1335-1343.
- Gonzy-Treboul, G., de Waard, J.H., Zagorec, M., and Postma, P.W. (1991) The glucose permease of the phosphotransferase system of *Bacillus subtilis*: evidence for IIGlc and IIIGlc domains. *Mol Microbiol* **5**: 1241-1249.
- Görke, B., and Stülke, J. (2008) Carbon catabolite repression in bacteria: many ways to make the most out of nutrients. *Nat Rev Microbiol* **6**: 613-624.
- Gouin, E., Mengaud, J., and 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.
- Gravesen, A., Warthoe, P., Knochel, S., and Thirstrup, K. (2000) Restriction fragment differential display of pediocin-resistant *Listeria monocytogenes* 412 mutants shows consistent overexpression of a putative beta-glucoside-specific PTS system. *Microbiology* **146 ( Pt 6)**: 1381-1389.
- Gray, M.J., Freitag, N.E., and Boor, K.J. (2006) How the bacterial pathogen *Listeria monocytogenes* mediates the switch from environmental Dr. Jekyll to pathogenic Mr. Hyde. *Infect Immun* **74**: 2505-2512.
- Greenberg, D.B., Stülke, J., and Saier, M.H., Jr. (2002) Domain analysis of transcriptional regulators bearing PTS regulatory domains. *Res Microbiol* **153**: 519-526.
- Gregory, S.H., Sagnimeni, A.J., and Wing, E.J. (1996) Expression of the *inlAB* operon by *Listeria monocytogenes* is not required for entry in hepatic cells in vivo. *Infect Immun* **64**: 3983-3986.
- Gulati, A., and Mahadevan, S. (2000) Mechanism of catabolite repression in the *bgl* operon of *Escherichia coli*: involvement of the anti-terminator BglG, CRP-cAMP and EIIAGlc in mediating glucose effect downstream of transcription initiation. *Genes Cells* **5**: 239-250.
- Guzman, C.A., Domann, E., Rohde, M., Bruder, D., Darji, A., Weiss, S., Wehland, J., Chakraborty, T., and Timmis, K.N. (1996) Apoptosis of mouse dendritic cells is triggered by listeriolysin, the major virulence determinant of *Listeria monocytogenes*. *Mol Microbiol* **20**: 119-126.
- Hain, T., Steinweg, C., Kuenne, C.T., Billion, A., Ghai, R., Chatterjee, S.S., Domann, E., Karst, U., Goesmann, A., Bekel, T., Bartels, D., Kaiser, O., Meyer, F., Puhler, A., Weisshaar, B., Wehland, J., Liang, C., Dandekar, T., Lampidis, R., Kreft, J., Goebel, W., and Chakraborty, T. (2006) Whole-genome sequence of *Listeria welshimeri* reveals common steps in genome reduction with *Listeria innocua* as compared to *Listeria monocytogenes*. *J Bacteriol* **188**: 7405-7415.

- Hain, T., Chatterjee, S.S., Ghai, R., Kuenne, C.T., Billion, A., Steinweg, C., Domann, E., Karst, U., Jansch, L., Wehland, J., Eisenreich, W., Bacher, A., Joseph, B., Schar, J., Kreft, J., Klumpp, J., Loessner, M.J., Dorscht, J., Neuhaus, K., Fuchs, T.M., Scherer, S., Doumith, M., Jacquet, C., Martin, P., Cossart, P., Rusniok, C., Glaser, P., Buchrieser, C., Goebel, W., and Chakraborty, T. (2007) Pathogenomics of *Listeria* spp. *Int J Med Microbiol* **297**: 541-557.
- Hamon, M., Bierne, H., and Cossart, P. (2006) *Listeria monocytogenes*: a multifaceted model. *Nat Rev Microbiol* **4**: 423-434.
- Harman, J.G. (2001) Allosteric regulation of the cAMP receptor protein. *Biochim Biophys Acta* **1547**: 1-17.
- Herler, M., Bubert, A., Goetz, M., Vega, Y., Vázquez-Boland, J.A., and 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., and Deutscher, J. (2005) How seryl-phosphorylated HPr inhibits PrfA, a transcription activator of *Listeria monocytogenes* virulence genes. *J Mol Microbiol Biotechnol* **9**: 224-234.
- Hof, H. (2004) An update on the medical management of listeriosis. *Expert Opin Pharmacother* **5**: 1727-1735.
- Hogema, B.M., Arents, J.C., Bader, R., Eijkemans, K., Yoshida, H., Takahashi, H., Aiba, H., and Postma, P.W. (1998) Inducer exclusion in *Escherichia coli* by non-PTS substrates: the role of the PEP to pyruvate ratio in determining the phosphorylation state of enzyme IIAGlc. *Mol Microbiol* **30**: 487-498.
- Huang, M., Oppermann-Sanio, F.B., and Steinbuchel, A. (1999) Biochemical and molecular characterization of the *Bacillus subtilis* acetoin catabolic pathway. *J Bacteriol* **181**: 3837-3841.
- Iretton, K., Payraastre, B., and 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., and 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., and Cossart, P. (2002) An RNA thermosensor controls expression of virulence genes in *Listeria monocytogenes*. *Cell* **110**: 551-561.
- Joseph, B., Przybilla, K., Stühler, C., Schauer, K., Slaghuis, J., Fuchs, T.M., and Goebel, W. (2006) Identification of *Listeria monocytogenes* genes contributing to intracellular replication by expression profiling and mutant screening. *J Bacteriol* **188**: 556-568.
- Joseph, B., and Goebel, W. (2007) Life of *Listeria monocytogenes* in the host cells' cytosol. *Microbes Infect* **9**: 1188-1195.
- Joseph, B., Mertins, S., Stoll, R., Schar, J., Umesha, K.R., Luo, Q., Muller-Altrock, S., and Goebel, W. (2008) Glycerol-metabolism and PrfA activity in *Listeria monocytogenes*. *J Bacteriol*.
- Junttila, J.R., Niemela, S.I., and Hirn, J. (1988) Minimum growth temperatures of *Listeria monocytogenes* and non-haemolytic *Listeria*. *J Appl Bacteriol* **65**: 321-327.
- Karunasagar, I., Lampidis, R., Goebel, W., and 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.
- Kathariou, S., Metz, P., Hof, H., and Goebel, W. (1987) Tn916-induced mutations in the hemolysin determinant affecting virulence of *Listeria monocytogenes*. *J Bacteriol* **169**: 1291-1297.

- Kathariou, S. (2002) *Listeria monocytogenes* virulence and pathogenicity, a food safety perspective. *J Food Prot* **65**: 1811-1829.
- Kayal, S., and Charbit, A. (2006) Listeriolysin O: a key protein of *Listeria monocytogenes* with multiple functions. *FEMS Microbiol Rev* **30**: 514-529.
- Kolb, A., Igarashi, K., Ishihama, A., Lavigne, M., Buckle, M., and Buc, H. (1993) *E. coli* RNA polymerase, deleted in the C-terminal part of its alpha-subunit, interacts differently with the cAMP-CRP complex at the lacP1 and at the galP1 promoter. *Nucleic Acids Res* **21**: 319-326.
- Körner, H., Sofia, H.J., and 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.
- Kravanja, M., Engelmann, R., Dossonnet, V., Bluggel, M., Meyer, H.E., Frank, R., Galinier, A., Deutscher, J., Schnell, N., and Hengstenberg, W. (1999) The hprK gene of *Enterococcus faecalis* encodes a novel bifunctional enzyme: the HPr kinase/phosphatase. *Mol Microbiol* **31**: 59-66.
- Kreft, J. (1992) *Listeria monocytogenes*-ein Modell für fakultativ intrazelluläre Bakterien. *BioEng* **1**: 65-70.
- Kreft, J., and Vázquez-Boland, J.A. (2001) Regulation of virulence genes in *Listeria*. *Int J Med Microbiol* **291**: 145-157.
- Kreft, J., and Vázquez-Boland, J.A. (2001) Regulation of virulence genes in *Listeria*. *Int J Med Microbiol* **291**: 145-157.
- Kreft, J., Vázquez-Boland, J.A., Altrock, S., Domínguez-Bernal, G., and Goebel, W. (2002) Pathogenicity islands and other virulence elements in *Listeria*. *Curr Top Microbiol Immunol* **264**: 109-125.
- Kühn, M., Kathariou, S., and Goebel, W. (1988) Hemolysin supports survival but not entry of the intracellular bacterium *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun* **56**: 79-82.
- Kuhn, M., Kathariou, S., and Goebel, W. (1988) Hemolysin supports survival but not entry of the intracellular bacterium *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun* **56**: 79-82.
- Kuhn, M., and Goebel, W. (1989) Identification of an extracellular protein of *Listeria monocytogenes* possibly involved in intracellular uptake by mammalian cells. *Infect Immun* **57**: 55-61.
- Kuhn, M., and Goebel, W. (1994) Induction of cytokines in phagocytic mammalian cells infected with virulent and avirulent *Listeria* strains. *Infect Immun* **62**: 348-356.
- Kundig, W., Ghosh, S., and Roseman, S. (1964) Phosphate Bound to Histidine in a Protein as an Intermediate in a Novel Phospho-Transferase System. *Proc Natl Acad Sci U S A* **52**: 1067-1074.
- Lalic-Mülthaler, M., Bohne, J., and Goebel, W. (2001) *In vitro* transcription of PrfA-dependent and -independent genes of *Listeria monocytogenes*. *Mol Microbiol* **42**: 111-120.
- Lambrechts, A., Gevaert, K., Cossart, P., Vandekerckhove, J., and Van Troys, M. (2008) *Listeria* comet tails: the actin-based motility machinery at work. *Trends Cell Biol* **18**: 220-227.
- Lampidis, R., Gross, R., Sokolovic, Z., Goebel, W., and 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.
- Larsen, M.H., Kallipolitis, B.H., Christiansen, J.K., Olsen, J.E., and Ingmer, H. (2006) The response regulator ResD modulates virulence gene expression in response to carbohydrates in *Listeria monocytogenes*. *Mol Microbiol* **61**: 1622-1635.

- Le Monnier, A., Autret, N., Join-Lambert, O.F., Jaubert, F., Charbit, A., Berche, P., and Kayal, S. (2007) ActA is required for crossing of the fetoplacental barrier by *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun* **75**: 950-957.
- Lecuit, M., Ohayon, H., Braun, L., Mengaud, J., and 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., and 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.
- Leimeister-Wächter, M., Haffner, C., Domann, E., Goebel, W., and Chakraborty, T. (1990) Identification of a gene that positively regulates expression of listeriolysin, the major virulence factor of *Listeria monocytogenes*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**: 8336-8340.
- Leimeister-Wächter, M., Domann, E., and Chakraborty, T. (1991) Detection of a gene encoding a phosphatidylinositol-specific phospholipase C that is co-ordinately expressed with listeriolysin in *Listeria monocytogenes*. *Mol Microbiol* **5**: 361-366.
- Lenz, L.L., Mohammadi, S., Geissler, A., and Portnoy, D.A. (2003) SecA2-dependent secretion of autolytic enzymes promotes *Listeria monocytogenes* pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 12432-12437.
- Lingnau, A., Domann, E., Hudel, M., Bock, M., Nichterlein, T., Wehland, J., and 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., and Wehland, J. (1996) Identification and purification of novel internalin-related proteins in *Listeria monocytogenes* and *Listeria ivanovii*. *Infect Immun* **64**: 1002-1006.
- Loisel, T.P., Boujemaa, R., Pantaloni, D., and Carlier, M.F. (1999) Reconstitution of actin-based motility of *Listeria* and *Shigella* using pure proteins. *Nature* **401**: 613-616.
- Lorber, B. (1997) Listeriosis. *Clin Infect Dis* **24**: 1-9; quiz 10-11.
- Lou, Y., and Yousef, A.E. (1997) Adaptation to sublethal environmental stresses protects *Listeria monocytogenes* against lethal preservation factors. *Appl Environ Microbiol* **63**: 1252-1255.
- Luking, A., Stahl, U., and Schmidt, U. (1998) The protein family of RNA helicases. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **33**: 259-296.
- Luo, Q., Rauch, M., Marr, A.K., Müller-Altrock, S., and 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., and 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., and Cossart, P. (2005) VirR, a response regulator critical for *Listeria monocytogenes* virulence. *Mol Microbiol* **57**: 1367-1380.
- Marquez, J., Reinelt, S., Koch, B., Engelmann, R., Hengstenberg, W., and Scheffzek, K. (2006) Structure of the full-length enzyme I of the phosphoenolpyruvate-dependent sugar phosphotransferase system. *J Biol Chem* **281**: 32508-32515.
- Marquis, H., Doshi, V., and Portnoy, D.A. (1995) The broad-range phospholipase C and a metalloprotease mediate listeriolysin O-independent escape of *Listeria monocytogenes* from a primary vacuole in human epithelial cells. *Infect Immun* **63**: 4531-4534.
- Marr, A.K., Joseph, B., Mertins, S., Ecke, R., Müller-Altrock, S., and Goebel, W. (2006) Overexpression of PrfA leads to growth inhibition of *Listeria monocytogenes* in

- glucose-containing culture media by interfering with glucose uptake. *J Bacteriol* **188**: 3887-3901.
- Martin, I., Debarbouille, M., Klier, A., and Rapoport, G. (1989) Induction and metabolite regulation of levanase synthesis in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **171**: 1885-1892.
- Mengaud, J., Chenevert, J., Geoffroy, C., Gaillard, J.L., and Cossart, P. (1987) Identification of the structural gene encoding the SH-activated hemolysin of *Listeria monocytogenes*: listeriolysin O is homologous to streptolysin O and pneumolysin. *Infect Immun* **55**: 3225-3227.
- Mengaud, J., Vicente, M.F., Chenevert, J., Pereira, J.M., Geoffroy, C., Gicquel-Sanzey, B., Baquero, F., Perez-Diaz, J.C., and Cossart, P. (1988) Expression in *Escherichia coli* and sequence analysis of the listeriolysin O determinant of *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun* **56**: 766-772.
- Mengaud, J., Vicente, M.F., and 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., and Cossart, P. (1991) Pleiotropic control of *Listeria monocytogenes* virulence factors by a gene that is autoregulated. *Mol Microbiol* **5**: 2273-2283.
- Mengaud, J., Ohayon, H., Gounon, P., Mege, R.M., and 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.
- Mertins, S., Joseph, B., Goetz, M., Ecke, R., Seidel, G., Sprehe, M., Hillen, W., Goebel, W., and Müller-Altrock, S. (2007) Interference of Components of the Phosphoenolpyruvate Phosphotransferase System with the Central Virulence Gene Regulator PrfA of *Listeria monocytogenes*. *J Bacteriol* **189**: 473-490.
- Mertins, S. (2008) Einfluss des Kohlenstoff-Metabolismus auf die Aktivität des Virulenzfaktors PrfA von *Listeria monocytogenes*.
- Milenbachs-Lukowiak, A., Mueller, K.J., Freitag, N.E., and Youngman, P. (2004) Dereglulation of *Listeria monocytogenes* virulence gene expression by two distinct and semi-independent pathways. *Microbiology* **150**: 321-333.
- Milenbachs, A.A., Brown, D.P., Moors, M., and Youngman, P. (1997) Carbon-source regulation of virulence gene expression in *Listeria monocytogenes*. *Mol Microbiol* **23**: 1075-1085.
- Milohanic, E., Pron, B., Berche, P., and Gaillard, J.L. (2000) Identification of new loci involved in adhesion of *Listeria monocytogenes* to eukaryotic cells. European *Listeria* Genome Consortium. *Microbiology* **146** ( Pt 3): 731-739.
- Milohanic, E., Jonquieres, R., Cossart, P., Berche, P., and Gaillard, J.L. (2001) The autolysin Ani contributes to the adhesion of *Listeria monocytogenes* to eukaryotic cells via its cell wall anchor. *Mol Microbiol* **39**: 1212-1224.
- Milohanic, E., Glaser, P., Coppée, J.Y., Frangeul, L., Vega, Y., Vázquez-Boland, J.A., Kunst, F., Cossart, P., and Buchrieser, C. (2003) Transcriptome analysis of *Listeria monocytogenes* identifies three groups of genes differently regulated by PrfA. *Mol Microbiol* **47**: 1613-1625.
- Milohanic, E., Jonquieres, R., Glaser, P., Dehoux, P., Jacquet, C., Berche, P., Cossart, P., and Gaillard, J.L. (2004) Sequence and binding activity of the autolysin-adhesin Ami from epidemic *Listeria monocytogenes* 4b. *Infect Immun* **72**: 4401-4409.
- Morett, E., and Buck, M. (1989) In vivo studies on the interaction of RNA polymerase-sigma 54 with the *Klebsiella pneumoniae* and *Rhizobium meliloti* nifH promoters. The role of NifA in the formation of an open promoter complex. *J Mol Biol* **210**: 65-77.



- Mounier, J., Ryter, A., Coquis-Rondon, M., and Sansonetti, P.J. (1990) Intracellular and cell-to-cell spread of *Listeria monocytogenes* involves interaction with F-actin in the enterocytelike cell line Caco-2. *Infect Immun* **58**: 1048-1058.
- Mueller, K.J., and Freitag, N.E. (2005) Pleiotropic enhancement of bacterial pathogenesis resulting from the constitutive activation of the *Listeria monocytogenes* regulatory factor PrfA. *Infect Immun* **73**: 1917-1926.
- Murray, E.G.D., Webb, R.A., and Swann, M.B.R. (1926) A disease of rabbits characterised by large mononuclear leucocytosis, is involved in cell division and virulence of *Listeria monocytogenes*. *Mol Microbiol* **31**: 185-196.
- Myers, E.R., Dallmier, A.W., and 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., and Boor, K.J. (2002) Sigma B contributes to PrfA-mediated virulence in *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun* **70**: 3948-3952.
- Nair, S., Frehel, C., Nguyen, L., Escuyer, V., and Berche, P. (1999) ClpE, a novel member of the HSP100 family, is involved in cell division and virulence of *Listeria monocytogenes*. *Mol Microbiol* **31**: 185-196.
- Nair, S., Derre, I., Msadek, T., Gaillot, O., and Berche, P. (2000) CtsR controls class III heat shock gene expression in the human pathogen *Listeria monocytogenes*. *Mol Microbiol* **35**: 800-811.
- Nam, T.W., Cho, S.H., Shin, D., Kim, J.H., Jeong, J.Y., Lee, J.H., Roe, J.H., Peterkofsky, A., Kang, S.O., Ryu, S., and Seok, Y.J. (2001) The *Escherichia coli* glucose transporter enzyme IICB(Glc) recruits the global repressor Mlc. *Embo J* **20**: 491-498.
- Nguyen, T.X., Yen, M.R., Barabote, R.D., and Saier, M.H., Jr. (2006) Topological predictions for integral membrane permeases of the phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system. *J Mol Microbiol Biotechnol* **11**: 345-360.
- Niebuhr, K., Chakraborty, T., Rohde, M., Gazlig, T., Jansen, B., Kollner, P., and Wehland, J. (1993) Localization of the ActA polypeptide of *Listeria monocytogenes* in infected tissue culture cell lines: ActA is not associated with actin "comets". *Infect Immun* **61**: 2793-2802.
- Niebuhr, K., Ebel, F., Frank, R., Reinhard, M., Domann, E., Carl, U.D., Walter, U., Gertler, F.B., Wehland, J., and Chakraborty, T. (1997) A novel proline-rich motif present in ActA of *Listeria monocytogenes* and cytoskeletal proteins is the ligand for the EVH1 domain, a protein module present in the Ena/VASP family. *Embo J* **16**: 5433-5444.
- Nishibori, T., Xiong, H., Kawamura, I., Arakawa, M., and Mitsuyama, M. (1996) Induction of cytokine gene expression by listeriolysin O and roles of macrophages and NK cells. *Infect Immun* **64**: 3188-3195.
- Okada, Y., Okada, N., Makino, S., Asakura, H., Yamamoto, S., and Igimi, S. (2006) The sigma factor RpoN (sigma<sup>54</sup>) is involved in osmotolerance in *Listeria monocytogenes*. *FEMS Microbiol Lett* **263**: 54-60.
- Parida, S.K., Domann, E., Rohde, M., Muller, S., Darji, A., Hain, T., Wehland, J., and Chakraborty, T. (1998) Internalin B is essential for adhesion and mediates the invasion of *Listeria monocytogenes* into human endothelial cells. *Mol Microbiol* **28**: 81-93.
- Park, S.F., and Kroll, R.G. (1993) Expression of listeriolysin and phosphatidylinositol-specific phospholipase C is repressed by the plant-derived molecule cellobiose in *Listeria monocytogenes*. *Mol Microbiol* **8**: 653-661.
- Park, Y.H., Lee, B.R., Seok, Y.J., and Peterkofsky, A. (2006) In vitro reconstitution of catabolite repression in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **281**: 6448-6454.
- Parker, C., and Hutkins, R.W. (1997) *Listeria monocytogenes* Scott A transports glucose by high-affinity and low-affinity glucose transport systems. *Appl Environ Microbiol* **63**: 543-546.

- Peel, M., Donachie, W., and 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.
- Pistor, S., Chakraborty, T., Niebuhr, K., Domann, E., and Wehland, J. (1994) The ActA protein of *Listeria monocytogenes* acts as a nucleator inducing reorganization of the actin cytoskeleton. *Embo J* **13**: 758-763.
- Pistor, S., Chakraborty, T., Walter, U., and Wehland, J. (1995) The bacterial actin nucleator protein ActA of *Listeria monocytogenes* contains multiple binding sites for host microfilament proteins. *Curr Biol* **5**: 517-525.
- Plumbridge, J. (2002) Regulation of gene expression in the PTS in *Escherichia coli*: the role and interactions of Mlc. *Curr Opin Microbiol* **5**: 187-193.
- Portnoy, D.A., Jacks, P.S., and 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., and Cossart, P. (1992) Molecular determinants of *Listeria monocytogenes* pathogenesis. *Infect Immun* **60**: 1263-1267.
- Postma, P.W., Broekhuizen, C.P., and Geerse, R.H. (1989) The role of the PEP: carbohydrate phosphotransferase system in the regulation of bacterial metabolism. *FEMS Microbiol Rev* **5**: 69-80.
- Postma, P.W., Lengeler, J.W., and Jacobson, G.R. (1993) Phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase systems of bacteria. *Microbiol Rev* **57**: 543-594.
- Powers, D.A., and Roseman, S. (1984) The primary structure of *Salmonella typhimurium* HPr, a phosphocarrier protein of the phosphoenolpyruvate:glycose phosphotransferase system. A correction. *J Biol Chem* **259**: 15212-15214.
- Poyart, C., Abachin, E., Razafimanantsoa, I., and Berche, P. (1993) The zinc metalloprotease of *Listeria monocytogenes* is required for maturation of phosphatidylcholine phospholipase C: direct evidence obtained by gene complementation. *Infect Immun* **61**: 1576-1580.
- Premaratne, R.J., Lin, W.J., and Johnson, E.A. (1991) Development of an improved chemically defined minimal medium for *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol* **57**: 3046-3048.
- Ramnath, M., Beukes, M., Tamura, K., and Hastings, J.W. (2000) Absence of a putative mannose-specific phosphotransferase system enzyme IIAB component in a leucocin A-resistant strain of *Listeria monocytogenes*, as shown by two-dimensional sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Appl Environ Microbiol* **66**: 3098-3101.
- Rauch, M. (2003) In vitro Transkription von Virulenzgenen aus *Listeria monocytogenes* unter der Kontrolle des Transkriptionsregulators PrfA. In *Lehrstuhl für Mikrobiologie Würzburg: Bayerische Julius-Maximilians-Universität Würzburg*, pp. 128.
- Raveneau, J., Geoffroy, C., Beretti, J.L., Gaillard, J.L., Alouf, J.E., and Berche, P. (1992) Reduced virulence of a *Listeria monocytogenes* phospholipase-deficient mutant obtained by transposon insertion into the zinc metalloprotease gene. *Infect Immun* **60**: 916-921.
- Redline, R.W., and 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.
- Reizer, J., Sutrina, S.L., Saier, M.H., Stewart, G.C., Peterkofsky, A., and Reddy, P. (1989) Mechanistic and physiological consequences of HPr(ser) phosphorylation on the activities of the phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system in gram-positive bacteria: studies with site-specific mutants of HPr. *Embo J* **8**: 2111-2120.

- Renzoni, A., Klarsfeld, A., Dramsi, S., and 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.
- Renzoni, A., Cossart, P., and Dramsi, S. (1999) PrfA, the transcriptional activator of virulence genes, is upregulated during interaction of *Listeria monocytogenes* with mammalian cells and in eukaryotic cell extracts. *Mol Microbiol* **34**: 552-561.
- Ripio, M.T., Domínguez-Bernal, G., Suárez, M., Brehm, K., Berche, P., and 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., Domínguez-Bernal, G., Lara, M., Suárez, M., and Vázquez-Boland, J.A. (1997) A Gly145Ser substitution in the transcriptional activator PrfA causes constitutive overexpression of virulence factors in *Listeria monocytogenes*. *J Bacteriol* **179**: 1533-1540.
- Robillard, G.T., and Broos, J. (1999) Structure/function studies on the bacterial carbohydrate transporters, enzymes II, of the phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system. *Biochim Biophys Acta* **1422**: 73-104.
- Rouquette, C., Ripio, M.T., Pellegrini, E., Bolla, J.M., Tascon, R.I., Vazquez-Boland, J.A., and Berche, P. (1996) Identification of a ClpC ATPase required for stress tolerance and in vivo survival of *Listeria monocytogenes*. *Mol Microbiol* **21**: 977-987.
- Rouquette, C., de Chastellier, C., Nair, S., and Berche, P. (1998) The ClpC ATPase of *Listeria monocytogenes* is a general stress protein required for virulence and promoting early bacterial escape from the phagosome of macrophages. *Mol Microbiol* **27**: 1235-1245.
- Ruhland, G.J., Hellwig, M., Wanner, G., and Fiedler, F. (1993) Cell-surface location of *Listeria*-specific protein p60--detection of *Listeria* cells by indirect immunofluorescence. *J Gen Microbiol* **139 ( Pt 3)**: 609-616.
- Sabet, C., Toledo-Arana, A., Personnic, N., Lecuit, M., Dubrac, S., Poupel, O., Gouin, E., Nahori, M.A., Cossart, P., and Bierne, H. (2008) The *Listeria monocytogenes* virulence factor InlJ is specifically expressed in vivo and behaves as an adhesin. *Infect Immun* **76**: 1368-1378.
- Sallen, B., Rajoharison, A., Desvarenne, S., Quinn, F., and Mabilat, C. (1996) Comparative analysis of 16S and 23S rRNA sequences of *Listeria* species. *Int J Syst Bacteriol* **46**: 669-674.
- Sanger, J.M., Sanger, J.W., and Southwick, F.S. (1992) Host cell actin assembly is necessary and likely to provide the propulsive force for intracellular movement of *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun* **60**: 3609-3619.
- Schlech, W.F., 3rd, Lavigne, P.M., Bortolussi, R.A., Allen, A.C., Haldane, E.V., Wort, A.J., Hightower, A.W., Johnson, S.E., King, S.H., Nicholls, E.S., and Broome, C.V. (1983) Epidemic listeriosis--evidence for transmission by food. *N Engl J Med* **308**: 203-206.
- Schmid, M.W., Ng, E.Y., Lampidis, R., Emmerth, M., Walcher, M., Kreft, J., Goebel, W., Wagner, M., and Schleifer, K.H. (2005) Evolutionary history of the genus *Listeria* and its virulence genes. *Syst Appl Microbiol* **28**: 1-18.
- Schnupf, P., Zhou, J., Varshavsky, A., and Portnoy, D.A. (2007) Listeriolysin O secreted by *Listeria monocytogenes* into the host cell cytosol is degraded by the N-end rule pathway. *Infect Immun* **75**: 5135-5147.
- Schoen, C., Loeffler, D.I., Frentzen, A., Pilgrim, S., Goebel, W., and Stritzker, J. (2008) *Listeria monocytogenes* as novel carrier system for the development of live vaccines. *Int J Med Microbiol* **298**: 45-58.
- Schönhuber, W., Le Bourhis, G., Tremblay, J., Amann, R., and Kulakauskas, S. (2001) Utilization of tmRNA sequences for bacterial identification. *BMC Microbiol* **1**: 20.

- Schuchat, A., Swaminathan, B., and Broome, C.V. (1991) Epidemiology of human listeriosis. *Clin Microbiol Rev* **4**: 169-183.
- Scotti, M., Monzo, H.J., Lacharme-Lora, L., Lewis, D.A., and Vazquez-Boland, J.A. (2007) The PrfA virulence regulon. *Microbes Infect* **9**: 1196-1207.
- Seeliger, H.P. (1988) Listeriosis--history and actual developments. *Infection* **16 Suppl 2**: S80-84.
- Sheehan, B., Kocks, C., Dramsi, S., Gouin, E., Klarsfeld, A.D., Mengaud, J., and Cossart, P. (1994) Molecular and genetic determinants of the *Listeria monocytogenes* infectious process. *Curr Top Microbiol Immunol* **192**: 187-216.
- Sheehan, B., Klarsfeld, A., Msadek, T., and 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., and 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., and 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., and 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.
- Shingler, V. (1996) Signal sensing by sigma 54-dependent regulators: derepression as a control mechanism. *Mol Microbiol* **19**: 409-416.
- Siebold, C., Flukiger, K., Beutler, R., and Erni, B. (2001) Carbohydrate transporters of the bacterial phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase system (PTS). *FEBS Lett* **504**: 104-111.
- Smith, G.A., Marquis, H., Jones, S., Johnston, N.C., Portnoy, D.A., and Goldfine, H. (1995a) 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.
- Smith, G.A., Portnoy, D.A., and Theriot, J.A. (1995b) Asymmetric distribution of the *Listeria monocytogenes* ActA protein is required and sufficient to direct actin-based motility. *Mol Microbiol* **17**: 945-951.
- Sokolovic, Z., and Goebel, W. (1989) Synthesis of listeriolysin in *Listeria monocytogenes* under heat shock conditions. *Infect Immun* **57**: 295-298.
- Sokolovic, Z., Fuchs, A., and Goebel, W. (1990) Synthesis of species-specific stress proteins by virulent strains of *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun* **58**: 3582-3587.
- Spiro, S., and Guest, J.R. (1990) FNR and its role in oxygen-regulated gene expression in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Rev* **6**: 399-428.
- Stoll, R., Mertins, S., Joseph, B., Müller-Altrock, S., and Goebel, W. (2008) Modulation of PrfA activity in *Listeria monocytogenes* upon growth in different culture media. *Microbiology* **accepted**.
- Stritzker, J., Janda, J., Schoen, C., Taupp, M., Pilgrim, S., Gentschev, I., Schreier, P., Geginat, G., and Goebel, W. (2004) Growth, virulence, and immunogenicity of *Listeria monocytogenes* aro mutants. *Infect Immun* **72**: 5622-5629.
- Studholme, D.J., and Buck, M. (2000) Novel roles of sigmaN in small genomes. *Microbiology* **146 ( Pt 1)**: 4-5.
- Studholme, D.J., and Dixon, R. (2003) Domain architectures of sigma54-dependent transcriptional activators. *J Bacteriol* **185**: 1757-1767.
- Stülke, J., Martin-Verstraete, I., Charrier, V., Klier, A., Deutscher, J., and Rapoport, G. (1995) The HPr protein of the phosphotransferase system links induction and catabolite repression of the *Bacillus subtilis* levanase operon. *J Bacteriol* **177**: 6928-6936.

- Stülke, J., Arnaud, M., Rapoport, G., and Martin-Verstraete, I. (1998) PRD--a protein domain involved in PTS-dependent induction and carbon catabolite repression of catabolic operons in bacteria. *Mol Microbiol* **28**: 865-874.
- Stülke, J., and Hillen, W. (2000) Regulation of carbon catabolism in *Bacillus* species. *Annu Rev Microbiol* **54**: 849-880.
- Suarez, M., Gonzalez-Zorn, B., Vega, Y., Chico-Calero, I., and Vazquez-Boland, J.A. (2001) A role for ActA in epithelial cell invasion by *Listeria monocytogenes*. *Cell Microbiol* **3**: 853-864.
- Sue, D., Fink, D., Wiedmann, M., and Boor, K.J. (2004) sigmaB-dependent gene induction and expression in *Listeria monocytogenes* during osmotic and acid stress conditions simulating the intestinal environment. *Microbiology* **150**: 3843-3855.
- Sun, A.N., Camilli, A., and Portnoy, D.A. (1990) Isolation of *Listeria monocytogenes* small-plaque mutants defective for intracellular growth and cell-to-cell spread. *Infect Immun* **58**: 3770-3778.
- Tanaka, Y., Itoh, F., Kimata, K., and Aiba, H. (2004) Membrane localization itself but not binding to IICB is directly responsible for the inactivation of the global repressor Mlc in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **53**: 941-951.
- Theriot, J.A., Mitchison, T.J., Tilney, L.G., and Portnoy, D.A. (1992) The rate of actin-based motility of intracellular *Listeria monocytogenes* equals the rate of actin polymerization. *Nature* **357**: 257-260.
- Tilney, L.G., and 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.
- Vadeboncoeur, C., Brochu, D., and Reizer, J. (1991) Quantitative determination of the intracellular concentration of the various forms of HPr, a phosphocarrier protein of the phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase system in growing cells of oral streptococci. *Anal Biochem* **196**: 24-30.
- van Tilbeurgh, H., and Declerck, N. (2001) Structural insights into the regulation of bacterial signalling proteins containing PRDs. *Curr Opin Struct Biol* **11**: 685-693.
- Vazquez-Boland, J.A., Kocks, C., Dramsi, S., Ohayon, H., Geoffroy, C., Mengaud, J., and Cossart, P. (1992) Nucleotide sequence of the lecithinase operon of *Listeria monocytogenes* and possible role of lecithinase in cell-to-cell spread. *Infect Immun* **60**: 219-230.
- Vazquez-Boland, J.A., Kuhn, M., Berche, P., Chakraborty, T., Dominguez-Bernal, G., Goebel, W., Gonzalez-Zorn, B., Wehland, J., and Kreft, J. (2001) *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clin Microbiol Rev* **14**: 584-640.
- Vázquez-Boland, J.A., Domínguez-Bernal, G., González-Zorn, B., Kreft, J., and 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., and 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., and 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., Scotti, M., Goebel, W., and Vazquez-Boland, J.A. (2004a) New *Listeria monocytogenes* prfA\* mutants, transcriptional properties of PrfA\* proteins and structure-function of the virulence regulator PrfA. *Mol Microbiol* **52**: 1553-1565.

- Vega, Y., Rauch, M., Banfield, M.J., Ermolaeva, S., Scotti, M., Goebel, W., and Vázquez-Boland, J.A. (2004b) New *Listeria monocytogenes* *prfA*\* mutants, transcriptional properties of PrfA\* proteins and structure-function of the virulence regulator PrfA. *Mol Microbiol* **52**: 1553-1565.
- Walker, J.K., Morgan, J.H., McLauchlin, J., Grant, K.A., and Shallcross, J.A. (1994) *Listeria innocua* isolated from a case of ovine meningoencephalitis. *Vet Microbiol* **42**: 245-253.
- Wang, G., Sondej, M., Garrett, D.S., Peterkofsky, A., and Clore, G.M. (2000) A common interface on histidine-containing phosphocarrier protein for interaction with its partner proteins. *J Biol Chem* **275**: 16401-16403.
- Warner, J.B., and Lolkema, J.S. (2003) CcpA-dependent carbon catabolite repression in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* **67**: 475-490.
- Wawrzynow, A., Banecki, B., and Zylicz, M. (1996) The Clp ATPases define a novel class of molecular chaperones. *Mol Microbiol* **21**: 895-899.
- Weiglein, I., Goebel, W., Troppmair, J., Rapp, U.R., Demuth, A., and Kuhn, M. (1997) *Listeria monocytogenes* infection of HeLa cells results in listeriolysin O-mediated transient activation of the Raf-MEK-MAP kinase pathway. *FEMS Microbiol Lett* **148**: 189-195.
- Welch, M.D., Rosenblatt, J., Skoble, J., Portnoy, D.A., and Mitchison, T.J. (1998) Interaction of human Arp2/3 complex and the *Listeria monocytogenes* ActA protein in actin filament nucleation. *Science* **281**: 105-108.
- Wong, K.K., and 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.
- Wood, S., Maroushek, N., and Czuprinski, C.J. (1993) Multiplication of *Listeria monocytogenes* in a murine hepatocyte cell line. *Infect Immun* **61**: 3068-3072.
- Wuenscher, M.D., Kohler, S., Goebel, W., and Chakraborty, T. (1991) Gene disruption by plasmid integration in *Listeria monocytogenes*: insertional inactivation of the listeriolysin determinant *lisA*. *Mol Gen Genet* **228**: 177-182.
- Xue, J., and Miller, K.W. (2007) Regulation of the *mpt* operon in *Listeria innocua* by the ManR protein. *Appl Environ Microbiol* **73**: 5648-5652.
- Yan, L., Qiu, J., Chen, J., Ryan-Payseur, B., Huang, D., Wang, Y., Rong, L., Melton-Witt, J.A., Freitag, N.E., and Chen, Z.W. (2008) Selected *prfA*\* mutations in recombinant attenuated *Listeria monocytogenes* strains augment expression of foreign immunogens and enhance vaccine-elicited humoral and cellular immune responses. *Infect Immun* **76**: 3439-3450.
- Zalevsky, J., Grigorova, I., and Mullins, R.D. (2001) Activation of the Arp2/3 complex by the *Listeria* ActA protein. ActA binds two actin monomers and three subunits of the Arp2/3 complex. *J Biol Chem* **276**: 3468-3475.

# H Lebenslauf

## Persönliche Daten

Geboren am 31. Januar 1980 in Hoyerswerda als Regina Ecke  
Verheiratet, keine Kinder

## Berufserfahrung

- Seit 07/2008                      Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Lehrstuhl für Mikrobiologie an der Universität Würzburg (AG Prof. Dr. J. Kreft und AG Prof. Dr. W. Goebel)
- 10/2004 - 06/2008              Doktorarbeit am Lehrstuhl für Mikrobiologie (AG Prof. Dr. W. Goebel) an der Universität Würzburg:  
„Einfluss der Phosphoenolpyruvat-Phosphotransferasesysteme auf die Aktivität des Virulenzgenregulators PrfA von *Listeria monocytogenes*“

## Ausbildung

- 10/2003 – 09/2004              Diplomarbeit am Lehrstuhl für Mikrobiologie (AG Prof. Dr. W. Goebel) an der Universität Würzburg:  
„Faktoren und Bedingungen zur Modulation der Aktivität von PrfA, dem Hauptregulator der Virulenzgene von *Listeria monocytogenes*“
- 10/1999 – 09/2004              Studium der Biologie an der Universität Würzburg.  
Hauptfach: Mikrobiologie (Abschlussnote 1,7)  
Nebenfächer: Biochemie (Abschlussnote: 1,7), Zell- und Entwicklungsbiologie (Abschlussnote: 2,0)
- 09/1994 - 06/1999              Besuch des 8. Gymnasiums Berlin Marzahn, später: Karl-Schiller Oberschule (Abschlussnote: 2,1)
- 09/1992 - 08/1994              Besuch des 1. Gymnasiums Berlin Marzahn

## Internationale Symposien und Workshops

- 25<sup>th</sup> Symposium on Mechanisms of Gene Regulation, 30.3. - 1.4.2005, Blaubeuren (mit Posterpräsentation)
- The EuroPathoGenomics Graduate Academy course and workshop at Umeå, Sweden, 10.-17.5.2006
- 26<sup>th</sup> Symposium on Mechanisms of Gene Regulation, 27.-29.9.2006, Königswinter (mit Posterpräsentation)
- Young Investigator Symposium on Infection Biology, 2.-3.3.2007, Würzburg (mit Posterpräsentation)
- Course in Technologies and Applications of Microarrays, 9.-10.5.2007, Scineon

AG, Berlin

- Genomes 2008 Symposium mit Workshop “Systems Biology for beginners” 09.04. - 11.04.2008, Paris (mit Posterpräsentation)

## Publikationen

- A. K. Marr<sup>†</sup>, B. Joseph<sup>†</sup>, S. Mertins, R. Ecke, S. Müller-Altrock and W. Goebel (<sup>†</sup> contributed equally to this work)  
**Overexpression of PrfA leads to growth inhibition of *Listeria monocytogenes* in glucose-containing culture media by interfering with glucose uptake**  
J. Bacteriol. 2006 Jun; 188(11):3887-901
- R. Ecke<sup>†</sup>, N. Mauder<sup>†</sup>, S. Mertins, D.I.M. Loeffler, G. Seidel, M. Sprehe, W. Hillen, W. Goebel and S. Müller-Altrock (<sup>†</sup> contributed equally to this work)  
**Species-specific differences in the activity of PrfA, the key regulator of listerial virulence genes**  
J. Bacteriol. 2006 Nov; 188(22):7941-56. Epub 2006 Sep 15
- S. Mertins, B. Joseph, M. Goetz, R. Ecke, G. Seidel, M. Sprehe, W. Hillen, W. Goebel and S. Müller-Altrock  
**Interference of components of the phosphoenolpyruvate phosphotransferase system with the central virulence gene regulator PrfA of *Listeria monocytogenes***  
J. Bacteriol, 2007 Jan; 189(2):473-90. Epub 2006 Nov 3
- B. Joseph<sup>†</sup>, S. Mertins<sup>†</sup>, R. Stoll, J. Schär, K.R. Umesha, Q. Luo, W. Goebel and S. Müller-Altrock (<sup>†</sup> contributed equally to this work)  
**Glycerol-metabolism and PrfA activity in *Listeria monocytogenes***  
J Bacteriol. 2008 Aug;190(15):5412-30. Epub 2008 May 23.
- E. Eylert<sup>†</sup>, J. Schär<sup>†</sup>, S. Mertins, R. Stoll, A. Bacher, W. Goebel and W. Eisenreich (<sup>†</sup> contributed equally to this work)  
**Carbon metabolism of *Listeria monocytogenes* growing inside macrophages.**  
Mol Microbiol. 2008 Jun 27. [Epub ahead of print]
- R. Stoll, S. Mertins, S. Müller-Altrock and W. Goebel  
**Modulation of PrfA activity in *Listeria monocytogenes* upon growth in different culture media**  
Microbiology, accepted
- J. Schär, D.I.M. Loeffler, B. Joseph, R. Stoll and W. Goebel  
**Pyruvate carboxylase plays a crucial role in carbon metabolism of extra- and intracellularly replicating *Listeria monocytogenes***  
Submitted
- M. Sprehe, J. Haag, G. Seidel, S. Müller-Altrock, S. Mertins, R. Stoll, W. Goebel and W. Hillen  
**The effect of carbon sources on *actA* promoter activation in *Bacillus subtilis* with graded PrfA expression**  
Submitted



## **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 2008

Regina Stoll

Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender:

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

Zweitgutachter: **Prof. Dr. Roland Benz**

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am: