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

**Genetische Organisation und Transkription
eines Virulenz-assoziierten, instabilen
Chromosomenabschnitts von *Listeria ivanovii***

Dissertation

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

vorgelegt von

**Stefanie Altrock
aus Würzburg**

Würzburg, 2002

Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender:

1. Gutachter: Prof. Dr. Jürgen Kreft

2. Gutachter: Prof. Dr. Jörg Hacker

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Ich versichere, dass die vorliegende Arbeit nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt und von mir selbständig durchgeführt und verfasst wurde.

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

Neben dem akademischen Grad "Diplom-Biologin Univ." habe ich keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Würzburg, 30. Januar 2002

Der experimentelle Teil dieser Arbeit wurde von Februar 1998 bis Juli 2001 am Lehrstuhl für Mikrobiologie (Prof. Dr. W. Goebel) am Theodor-Boveri-Institut für Biowissenschaften der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg durchgeführt.

Von März 1998 bis Februar 2000 wurde die Dissertation durch das Promotionsstipendium nach dem Gesetz zur Förderung des wissenschaftlichen und künstlerischen Nachwuchses unterstützt.

VIELEN DANK!!!

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Jürgen Kreft für die hervorragende Betreuung dieser Arbeit und das erstklassige Arbeitsklima in seiner Arbeitsgruppe bedanken. Seine ständige Hilfsbereitschaft und Unterstützung haben entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Mein Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. Werner Goebel für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und Herrn Prof. Dr. Jörg Hacker für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Bedanken möchte ich mich weiter bei Herrn Prof. Dr. José-Antonio Vázquez-Boland von der Universidad Complutense de Madrid und seiner Arbeitsgruppe, vor allem aber bei Gustavo Domínguez-Bernal für die gute Kooperation und Überlassung der LIPI-2-Daten.

Ein besonders herzliches Dankeschön geht an Silke Weber ("Siwe"), die mir nicht nur mit zahlreichen Infektionsversuchen weitergeholfen hat, sondern mit ihrer guten Laune auch für ein angenehmes Arbeitsklima im Labor gesorgt hat.

Bedanken möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Instituts, die in irgendeiner Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Besonderer Dank gilt dabei Dr. Biju Joseph, Petra Herrmann und Stefanie Link, die mir durch eigene Versuche und anregende Diskussionen weitergeholfen haben.

Ein besonders großes Dankeschön geht an Manfred, der mich vor allem in der Endphase dieser Arbeit mit viel Geduld und Aufmunterung unterstützt hat.

Nicht zuletzt gilt mein tiefster Dank meiner Familie, vor allem aber meinen Eltern, die mich während des gesamten Studiums unterstützt und diese Arbeit erst möglich gemacht haben.

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
2	Einleitung	5
2.1	Allgemeine Mikrobiologie der Listerien	5
2.2	Pathogenese	6
2.3	Intrazellulärer Infektionszyklus und Virulenzfaktoren von <i>L. monocytogenes</i> und <i>L. ivanovii</i>	8
2.3.1	Eindringen in die Wirtszelle	11
2.3.2	Überleben im und Entkommen aus dem Phagosom	16
2.3.3	Vermehrung und Verbreitung im Zytoplasma	20
2.3.4	Zell-zu-Zell-Ausbreitung	22
2.4	Genetische Organisation und Evolution der Virulenzdeterminanten	24
2.5	Regulation der Virulenzgenexpression	28
3	Material	33
3.1	Geräte	33
3.2	Verbrauchsmaterial	33
3.3	Medien und Agarplatten	34
3.4	Antibiotika	34
3.5	Zelllinien	35
3.6	Plasmide	35
3.7	Bakterienstämme	36
3.8	Oligonukleotide	37
3.9	Molekulargewichtsstandard	41
3.10	Kits	41
4	Methoden	42
4.1	Molekulargenetische Methoden	42
4.1.1	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	42
4.1.2	Isolierung chromosomaler DNA aus Listerien	42
4.1.3	RNase-Behandlung von DNA	44
4.1.4	Reinigung von DNA	44
4.1.5	DNA-Fällung	44
4.1.6	Konzentrationsbestimmung von DNA	44
4.1.7	Elektrophoretische Auftrennung von DNA	45
4.1.8	Polymerase Chain Reaction (PCR)	46
4.1.9	Reamplifikation von PCR-Produkten	47

4.1.10	Rekombinante PCR (272)	49
4.1.11	Restriktionsverdau von DNA	50
4.1.12	Klenow / PNK-Behandlung	51
4.1.13	Dephosphorylierung von DNA	51
4.1.14	Ligation von DNA-Fragmenten	51
4.1.15	Transformation in <i>E. coli</i>	52
4.1.16	Elektroporation in Listerien (203).....	53
4.1.17	Protoplastierung von <i>Listeria</i> (270)	53
4.1.18	Mutagenese durch homologe Rekombination von <i>L. monocytogenes</i> (23, 270) ...	55
4.1.19	Genome Walking.....	55
4.1.20	DNA-Sequenzierung	59
4.1.21	Herstellung von Glycerinkulturen.....	60
4.1.22	Isolierung von RNA aus Listerien.....	60
4.1.23	DNase-Behandlung von RNA.....	61
4.1.24	Konzentrationsbestimmung von RNA	61
4.1.25	Elektrophoretische Auftrennung von RNA im Formaldehydgel	62
4.1.26	Reverse Transkription (RT) und PCR mit cDNA	62
4.2	Zellkultur.....	64
4.2.1	Auftauen und Einfrieren von eukaryotischen Zellen (77).....	64
4.2.2	Subkultivierung von eukaryotischen Zellen.....	65
4.2.3	Bestimmung der Lebendzellzahl (LZZ).....	65
4.2.4	Infektion von Säugerzellen mit Listerien	65
4.2.5	Intrazelluläre RNA-Isolierung (53).....	67
4.3	Untersuchung des Wachstumsverhaltens von <i>Listeria ivanovii</i>	67
4.3.1	Wachstum bei 20°C und 37°C	67
4.3.2	Wachstum mit und ohne MEM ("MEM-Shift")	67
4.3.3	MIC-Test.....	67
5	Ergebnisse.....	68
5.1	Sequenzierung des unbekanntes, in der Mutante GD-3 deletierten Bereichs upstream (rechts) von <i>smcL</i>	69
5.1.1	Suche nach dem rechten Ende der Deletion mittels Genome Walking.....	69
5.1.2	Sequenzierung des rechts von <i>smcL</i> liegenden Bereichs	71
5.1.3	Sequenzanalyse des upstream von <i>smcL</i> liegenden Bereichs	75
5.1.4	Vorkommen des analysierten Bereichs in anderen <i>Listeria</i> -Arten: Homologievergleich mit <i>L. monocytogenes</i> und <i>L. innocua</i>	78
5.1.5	Bestimmung des rechten Endes der Deletion.....	86
5.2	Eigenschaften des deletierten Bereichs downstream (links) von <i>smcL</i>	87
5.2.1	Charakterisierung des links von <i>smcL</i> liegenden Bereichs	87

5.2.2	Eigenschaften der neu identifizierten Internaline von <i>L. ivanovii</i>	88
5.2.3	Untersuchung des "zusammengesetzten" kleinen Internalins i-InlG	91
5.2.4	Bestimmung des linken Endes der Deletion	95
5.3	<i>Listeria ivanovii</i> Pathogenitätsinsel 2 (LIPI-2)	97
5.4	Vorkommen von LIPI-2 in verschiedenen <i>L. ivanovii</i> -Stämmen und anderen <i>Listeria</i> -Arten	99
5.4.1	Vorhandensein und Struktur von LIPI-2 in verschiedenen <i>L. ivanovii</i> -Stämmen ...	99
5.4.2	Vorkommen von LIPI-2 in anderen <i>Listeria</i> -Arten	100
5.4.3	Analyse des Bereichs <i>ysnB-ydeI</i> in <i>L. seeligeri</i> und <i>L. welshimeri</i>	110
5.5	Vergleich der Expression verschiedener Gene von <i>L. ivanovii</i> mittels RT-PCR...	117
5.5.1	Vorversuche	118
5.5.2	Nachweis polycistronischer Transkripte der Internalingene	120
5.5.3	RT-PCR: Vergleich der Transkription verschiedener Gene von <i>L. ivanovii</i> nach Wachstum bei 20°C und 37°C	121
5.5.4	RT-PCR: Vergleich der Expression diverser Gene von <i>L. ivanovii</i> nach Kultur in Minimal- und Vollmedium.....	133
5.5.5	Vergleich der Transkription verschiedener Gene von <i>L. ivanovii</i> nach Infektion der Zelllinien MDBK, J774 und TIB-73	143
5.6	Untersuchung der Deletionshäufigkeit von LIPI-1 und LIPI-2	151
5.6.1	Entwicklung eines positiven Selektionsverfahrens	151
5.6.2	Herstellung der Insertionsplasmide	152
6	Diskussion.....	156
6.1	Charakterisierung der <i>L. ivanovii</i> Mutante GD-3.....	157
6.2	Analyse der Genexpression in <i>L. ivanovii</i> mittels RT-PCR.....	163
6.3	Ausblick	171
7	Literatur	172
8	Anhang.....	184
8.1	Sequenzen.....	184
8.1.1	Sequenz des analysierten Bereichs upstream (rechts) von <i>smcL</i>	184
8.1.2	Sequenz von <i>i-inlG</i> in verschiedenen <i>L. ivanovii</i> -Stämmen	200
8.1.3	<i>purH</i> -Sequenz von <i>L. ivanovii</i>	201
8.2	Abkürzungen	202

1 Zusammenfassung

Unter den sechs Arten der Gattung *Listeria* finden sich nur zwei pathogene Spezies. Während *L. monocytogenes* pathogen sowohl für den Menschen als auch für verschiedene Tierarten ist, verursacht *L. ivanovii* nur bei Tieren die sog. Listeriose. Beide pathogenen Arten besitzen ein Virulenzgencluster, das auch als Pathogenitätsinsel LIPI-1 bezeichnet wird (146, 148, 261).

Pathogenitätsinseln (PAIs) sind in gram-negativen Bakterien weit verbreitet, wohingegen sie bisher bei gram-positiven Pathogenen selten beschrieben wurden. Sie zeichnen sich durch eine Reihe von charakteristischen Eigenschaften aus, so besitzen diese oft großen Regionen neben (meist mehreren) Virulenzgenen häufig Mobilitätsgene (IS-Elemente, Integrasen, Transposasen) und werden von charakteristischen Sequenzen (Direct Repeats, tRNA-Gene) flankiert. Zudem sind diese Bereiche häufig instabil und es kann zu einem Verlust durch Deletion kommen (110, 111).

In *L. ivanovii* wurde nun ein weiterer Virulenz-assoziiertes, instabiler Chromosomenabschnitt entdeckt, der in einem Teilbereich Eigenschaften einer Pathogenitätsinsel besitzt. Ausgehend von einem spontanen, aber reproduzierbaren Deletionsereignis eines großen Genomabschnitts von 17,5 kb, der einige schon bekannte Virulenz-assoziierte Gene umfasst (*i-inlE*, *i-inlF*, *smcL*, [60, 69, 96]), wurden in Zusammenarbeit mit den Kooperationspartnern an der "Universidad Complutense de Madrid", insbesondere mit G. Domínguez-Bernal (60) die komplette deletierte Region sowie flankierende Genombereiche genauer analysiert.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten rechts von dem bereits charakterisierten Gen *smcL* dreizehn neue Open Reading Frames (ORFs) bzw. Gene von *L. ivanovii* identifiziert werden, die größtenteils in der Deletionsmutante *L. ivanovii* GD-3 deletiert waren. Zu diesen Genen zählen *ydeI*, das für ein zu *B. subtilis* homologes Protein unbekannter Funktion codiert. Als weiteres Protein konnte eine RNA-Helicase (Gen *rnaH*), die am Abbau von mRNA beteiligt ist, identifiziert werden, sowie eine Effluxpumpe, die möglicherweise Antibiotikum-Resistenz vermittelt (Gen *norA*). Für die meisten Open Reading Frames konnten Homologien zu ORFs in den Genomsequenzen von *L. monocytogenes* und der apathogenen Art *L. innocua* gefunden werden. Eigene experimentelle Analysen zeigten zudem, dass diese ORFs in ähnlicher Anordnung auch in den apathogenen Arten *L. seeligeri* und *L. welshimeri* vorhanden sind, was wahrscheinlich macht, dass sie nicht an der Virulenz von Listerien beteiligt sind.

G. Domínguez-Bernal (Madrid) fand im links von *smcL* liegenden Bereich acht neue Internalingene, die alle spezifisch für *L. ivanovii* sind, aber hohe Ähnlichkeit zu bekannten Genen für kleine Internaline (*i-inlFE*) bzw., erstmals für *L. ivanovii* beschrieben, großen, Zellwand-verankerten Internalinen aufweisen. Für die Gene *i-inlE*, *i-inlF* und *smcL* ist bereits bekannt, dass diese Virulenz-assoziiert sind (60, 69, 96).

Dies führte zur Definition einer neuen, LIPI-2 genannten Pathogenitätsinsel in *L. ivanovii*, die außer *smcL* und *i-inlFE* auch alle neu gefundenen Internalingene umfasst. Für die PAI-Natur von LIPI-2 spricht u.a., dass sie von einem tRNA-Gen flankiert wird und einen abweichenden G+C-Gehalt aufweist.

In Zusammenarbeit mit P. Herrmann durchgeführte PCR-Kartierungen zeigten, dass LIPI-2 trotz seines sehr repetitiven Aufbaus in *L. ivanovii*-Isolaten unterschiedlicher Herkunft in identischer oder sehr ähnlicher Struktur vorhanden ist (114).

In dieser Arbeit durchgeführte Untersuchungen der LIPI-2 flankierenden Bereiche zeigten, dass diese in *L. monocytogenes* und auch den apathogenen Arten *L. innocua*, *L. seeligeri* und *L. welshimeri* bemerkenswert konserviert sind. Benachbart zu dem konservierten Gen *ysnB* fanden sich sowohl in *L. innocua* als auch in *L. welshimeri* Gene mit Ähnlichkeit zu Genen für große Internaline, was nahe legt, dass diese während der Evolution der Gattung aus einer Vorläuferart als Rekombinationsort für LIPI-2 gedient haben könnten.

Durch Transkriptionsuntersuchungen mittels RT-PCR wurde die Expression der neu identifizierten Gene analysiert. Hierbei wurden verschiedene Kulturbedingungen ("MEM-Shift", Wachstumstemperatur) untersucht sowie die Transkription nach Infektion mehrerer Zelllinien (MDBK, J774, TIB-73) analysiert.

Für die Internalingene konnte gezeigt werden, dass diese Gene nicht nur monocistronisch transkribiert werden, sondern dass auch polycistronische mRNA nachweisbar ist. Bei der Sequenzanalyse wurde für alle Internalingene, bis auf *i-inlB*, eine PrfA-Box identifiziert (60) und es bestätigte sich in dieser Arbeit, dass die meisten der Internalingene PrfA-abhängig exprimiert werden. Allerdings wiesen die einzelnen Gene kein einheitliches Transkriptionsprofil unter verschiedenen in vitro-Bedingungen auf. Eine Analyse der Genexpression nach Infektion verschiedener Zelllinien zeigte schließlich, dass die Internalingene während einer Infektion – teilweise sogar stark – und differentiell transkribiert werden und folglich möglicherweise am Infektionsgeschehen beteiligt sind.

Das Expressionsmuster der zu LIPI-2 benachbarten Open Reading Frames bestätigte, dass diese Gene PrfA-unabhängig und unter verschiedenen Bedingungen konstitutiv exprimiert werden. Auch während einer Infektion war die Transkription dieser ORFs nur teilweise und schwach nachweisbar. Das Expressionsmuster dieser Gene lässt den Schluss zu, dass sie vermutlich an Stoffwechselfvorgängen beteiligt sind und nicht zur Virulenz von *L. ivanovii* beitragen. Das bei verschiedenen in vitro-Bedingungen und auch in verschiedenen Zelllinien unterschiedliche Transkriptionsmuster zeigte, dass außer PrfA noch weitere Faktoren an der Regulation beteiligt sein müssen.

Die Untersuchung der Virulenzclustergene in LIPI-1 schließlich zeigte eine deutliche PrfA-Abhängigkeit der Genexpression. Es konnte bestätigt werden, dass deren Transkription unter PrfA-induzierenden Bedingungen wie "MEM-Shift" oder Wachstum bei 37°C verstärkt wird. Zudem fand sich auch nach Infektion eine deutliche Expression dieser Gene.

Summary

Among the six species of *Listeria* only two are pathogenic. Whereas *L. monocytogenes* is pathogenic for men and different species of animals, *L. ivanovii* only causes Listeriosis in animals. Both pathogenic species possess a virulence gene cluster, which is also designated as pathogenicity island LIPI-1 (146, 148, 261).

Pathogenicity islands (PAIs) are widespread among gram-negative bacteria, but so far have rarely been described for gram-positive pathogens. They display a series of characteristic features, e.g. these often large regions frequently possess, in addition to (mostly several) virulence genes, mobility genes (IS elements, integrases, transposases) and are flanked by sequences like direct repeats and tRNA genes. Besides these areas are often unstable and deletions may occur which result in a loss of the pathogenicity island (110, 111).

In *L. ivanovii*, an additional virulence-associated unstable part of the chromosome has recently been discovered, parts of which have some characteristics of a pathogenicity island. Starting from a spontaneous but reproducible deletion event of a big part of the genome (around 17,5 kb) which carries some known virulence associated genes (*i-inlE*, *i-inlF*, *smcL*, [60, 69, 96]), the complete deleted area plus flanking regions were analysed in co-operation with G. Domínguez-Bernal (60) from the "Universidad Complutense de Madrid".

Within this work 13 new open reading frames (ORFs) resp. genes on the right side of the *smcL* gene could be identified in *L. ivanovii*. Most of them were deleted in the deletion mutant *L. ivanovii* GD-3. One of them is *ydeI*, which codes for a protein homologue to *B. subtilis* YdeI of unknown function. Additional proteins are a RNA helicase (gene *rnaH*), which takes part in the degradation of mRNA, and an efflux pump, which possibly mediates antibiotic resistance (gene *norA*). Most of the open reading frames show homologies to ORFs also found in the genome sequences of *L. monocytogenes* and the apathogenic species *L. innocua*. Own experimental analyses showed, that the genes identified in this work are also present in the apathogenic species *L. seeligeri* and *L. welshimeri*. From this it can be concluded that they presumably are not involved in *L. ivanovii* virulence.

G. Domínguez-Bernal (Madrid) discovered eight new internalin genes on the left side of the *smcL* gene. All these genes are specific for *L. ivanovii* but exhibit high similarity to known genes for small internalins (*i-inlFE*) or, for the first time described in *L. ivanovii*, to large, cell wall-anchored internalins, respectively. For *i-inlE*, *i-inlF* and *smcL* it has already been shown that they are virulence associated (60, 69, 96).

This lead to the definition of a new pathogenicity island (LIPI-2) in *L. ivanovii*, which, in addition to *smcL* and *i-inlFE*, comprises all newly found internalin genes. The definition of LIPI-2 as a PAI is supported by the presence of a flanking tRNA gene and it differing G+C content.

In co-operation with P. Herrmann it could be shown by PCR mapping that, despite its highly repetitive composition, LIPI-2 is present with an identical or very similar structure in *L. ivanovii* isolates of different origin.

Study of the regions flanking LIPI-2 showed that these are considerably conserved in *L. monocytogenes* as well as in the apathogenic species *L. innocua*, *L. seeligeri* and *L. welshimeri*. Next to the conserved *ysnB* gene, genes with similarity to genes for large internalins could be identified in *L. innocua* and in *L. welshimeri*. This suggests that such genes could have served as recombination hotspots for LIPI-2 in an ancestral *Listeria* species.

By means of RT-PCR the expression of the new identified genes was analysed. For this, different culture conditions ("MEM-Shift", growth temperature) and transcription after infection of several cell lines (MDBK, J774, TIB-73) were examined.

For the internalin genes it could be shown, that these genes are not only transcribed monocistronically but also polycistronic mRNA could be detected. By sequence analysis, a PrfA-box has been identified in front of all internalin genes, except *i-inlB* (60). This work confirmed, that the expression of most internalin genes is PrfA-dependent. However, the transcription pattern was not uniform under the different in vitro conditions. Finally, the analysis of gene expression after infection of several cell lines showed, that the internalin genes are transcribed (a part of them strongly) differentially during infection. From this it can be concluded that they have a role in the infection process.

The expression pattern of the open reading frames flanking LIPI-2 confirmed, that these genes are transcribed PrfA independently and constitutively in vitro. During infection only a weak transcription of these ORFs could be shown and for a part of these genes no mRNA could be detected. This suggests that they do not contribute to virulence of *L. ivanovii*.

Examination of the virulence cluster genes finally showed, that there is a strong PrfA dependency in gene expression. It could be confirmed, that the transcription of these genes is increased under PrfA inducing conditions like "MEM-Shift" or growth at 37°C. In addition, after infection also a strong expression could be detected.

2 Einleitung

2.1 Allgemeine Mikrobiologie der Listerien

Listerien sind Gram-positive, nicht sporulierende, bewegliche, Katalase-positive Bakterien mit fakultativ anaerober Lebensweise. Die in der Natur ubiquitär vorkommenden kurzen Stäbchen (0,4 x 1-1,5 µm) können nicht nur aus Pflanzenmaterial, Wasser, Abwasser und Bodenproben isoliert werden, sondern sind auch in zahlreichen Nahrungsmitteln, sowie im Gastrointestinaltrakt des Menschen, verschiedener Säugetiere (Schaf, Ziege) und Vögel zu finden. Etwa 10 % der Bevölkerung tragen *Listeria monocytogenes* als Bestandteil ihrer Darmflora, ohne dass dies zu einer Beeinträchtigung ihrer Gesundheit führt (99). Als natürliches Habitat wird jedoch verfaulendes Pflanzenmaterial angesehen, wo *Listeria* spp. saprophytisch lebt (70, 126, 241, 260). Die Bakterien sind peritrich begeißelt und zeichnen sich durch charakteristische Taumelbewegung bei Wachstum im Temperaturbereich von 20 - 25°C aus. Bei optimalen Wachstumstemperaturen von 30 - 37°C lässt sich allerdings keine Bewegung mehr feststellen und die Flagellinproduktion ist stark reduziert (204, 236, 241).

Derzeit umfasst die Gattung *Listeria* sechs Arten: *Listeria monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, *L. innocua*, *L. welshimeri* und *L. grayi*. Die früher eigenständige Art *L. murrayi* wurde als Subspezies von *L. grayi* neu eingeordnet (125). Die Gattung *Listeria* ist eng verwandt mit den Gattungen *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterococcus*, *Streptococcus* und *Staphylococcus* (40, 230, 241) und lässt sich durch ihre unterschiedlichen biochemischen (Fermentation verschiedener Zucker, Säurebildung) und hämolytischen Eigenschaften klassifizieren. Inzwischen wurden auch DNA-basierte Klassifizierungsmethoden entwickelt (siehe unten).

Listerien tolerieren einen weiten Temperaturbereich und können bei -0,4 - 50°C (129, 263) wachsen, ihr Temperaturoptimum liegt bei 30 - 37°C. Zudem vermehren sie sich 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 (99, 124, 239, 241). Aufgrund ihrer Fähigkeit, konventionelle Methoden der Nahrungsmittelkonservierung überleben zu können, stellen Listerien eine nicht zu unterschätzende Gefahr als potentiell pathogene Nahrungsmittelkeime dar.

Listerien lassen sich durch die sog. Kälteanreicherungstechnik isolieren, da sie sich auch noch bei niedrigen Temperaturen vermehren. Außerdem können sie durch Selektivmedien wie PALCAM, Oxford- oder LPM-Agar angereichert zu werden (70, 99, 144). Ein schnellerer und wesentlich zuverlässigerer Nachweis erfolgt über 16S rRNA-Analyse, DNA/DNA-Hybridisierung mit Listerien-spezifischen Gensonden, Antikörperdetektion oder DNA-Amplifikation mittels PCR (26, 28, 144, 236).

2.2 Pathogenese

Von den sechs bekannten Arten sind nur *L. monocytogenes* und *L. ivanovii* pathogen, die restlichen vier Arten sind harmlose Umweltkeime. Die durch *L. monocytogenes* und *L. ivanovii* verursachte Infektionskrankheit wird als Listeriose bezeichnet und kann neben dem Menschen eine Vielzahl anderer Vertebraten einschließlich Vögel und Säuger betreffen.

1926 beschrieben Murray et al. (189) erstmals eine Listeriose in Labortieren. Aufgrund der charakteristischen Vermehrung von Monozyten im Blut der infizierten Kaninchen und Meerschweinchen wurde der die Krankheit auslösende Organismus *Bacterium monocytogenes* genannt und erhielt 1940 zu Ehren von Lister seinen heutigen Namen (126, 207). *Listeria monocytogenes* ist jedoch nicht nur tierpathogen, sondern verursacht als einzige Art auch die humane Listeriose, deren erste Fälle 1929 in Dänemark beschrieben wurden (199).

Im Gegensatz dazu handelt es sich bei *L. ivanovii* um einen tierpathogenen Keim, der bei Säugetieren (v.a. Schafen) ebenso wie *L. monocytogenes* Fehlgeburten, neonatale Sepsis und die sog. "circling disease" (Meningoencephalitis) verursacht (122, 241). Hierbei können auch gesunde Tiere als Überträger auftreten (85). Nur in einzelnen Fällen wurden *L. ivanovii* und *L. seeligeri* aus an Listeriose erkrankten Patienten isoliert (47, 226).

Obwohl Listerien in der Natur weit verbreitet sind, ist die humane Listeriose eine seltene Erkrankung mit sporadischem Auftreten bei gesunden Menschen. Sie ist jedoch von einer hohen Mortalitätsrate gekennzeichnet, die trotz frühzeitiger Antibiotikumbehandlung ca. 30 % beträgt (v.a. bei Meningitiden). Somit ist die Listeriose unter den bekannten bakteriellen Infektionskrankheiten eine der tödlichsten Erkrankungen (85, 99, 236, 260). In den letzten 20 Jahren konnte ein beträchtlicher Anstieg der Listeriosefälle in den Industriestaaten, v.a. in Europa beobachtet werden. Von den 13 verschiedenen *L. monocytogenes*-Serotypen verursachen 1/2a, 1/2b und 4b mehr als 90 % aller Listeriosefälle beim Menschen (und Tier) und zeigten sich zudem virulenter als andere Serotypen (70, 85, 124, 179, 236).

Das klinische Bild reicht bei infizierten Erwachsenen von einer mild verlaufenden, grippeähnlichen Krankheit, Gastroenteritis bis hin zu Meningitis, Meningoencephalitis und Sepsis (49, 99, 233, 236). In 55 - 70 % der Fälle ist das zentrale Nervensystem (ZNS) betroffen und es kommt zu schweren Bewusstseins- und Bewegungsstörungen, sowie in manchen Fällen zu einer Lähmung der Gesichtsnerven. Bei Schwangeren zeigt sich meist eine leichte, grippeähnliche Erkrankung mit Symptomen wie Schüttelfrost, Müdigkeit, Kopf- und Gliederschmerzen. Durch intrauterine Infektion des Fötus kann es aber zu spontanen Fehl- und Totgeburten oder der Geburt eines erkrankten Kindes (neonatale Listeriose) kommen, wobei die Mortalitätsrate zwischen 25 und 50% liegt (70, 85, 174).

Als Hauptübertragungsweg 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 aber auch im Kot von gesunden Erwachsenen (und Tieren) nachweisbar, weshalb der Gastrointestinaltrakt ein weiteres Reservoir für den pathogenen Keim darstellt (70, 85, 236, 260).

Nur in vereinzelt Fällen tritt die Listeriose bei gesunden Erwachsenen auf. Zu den Risikogruppen zählen Schwangere, Neugeborene, ältere Menschen und immungeschwächte Personen. Durch den erfolgreichen Einsatz von Immunsuppressiva bei Krebsbehandlungen, Organtransplantationen und gehäuft auftretende AIDS-Infektionen kommt es in letzter Zeit zu einer Vergrößerung der immungeschwächten Bevölkerung mit einem erhöhten Listerioserisiko (85, 196, 236). Der Gesundheitszustand der infizierten Person entscheidet dabei über den Verlauf und Ausgang der Listeriose. So überleben Patienten mit intaktem Immunsystem meist eine Infektion mit *L. monocytogenes*, während immungeschwächte Personen aus den oben erwähnten Risikogruppen oft an Listeriose sterben (durchschnittliche Mortalitätsrate > 30 – 40 %, [260]).

Die Behandlung der Listeriose erfolgt durch Antibiotikagabe (Ampicillin oder Penicillin G, evtl. kombiniert mit einem Aminoglykosidantibiotikum) (118, 236, 242). Praktisch einsetzbare Impfstoffe für den Menschen sind bisher noch nicht verfügbar und auch die Diagnostik der Listerien ist teilweise problematisch, da diese Bakterien einige physiologische Besonderheiten besitzen (144).

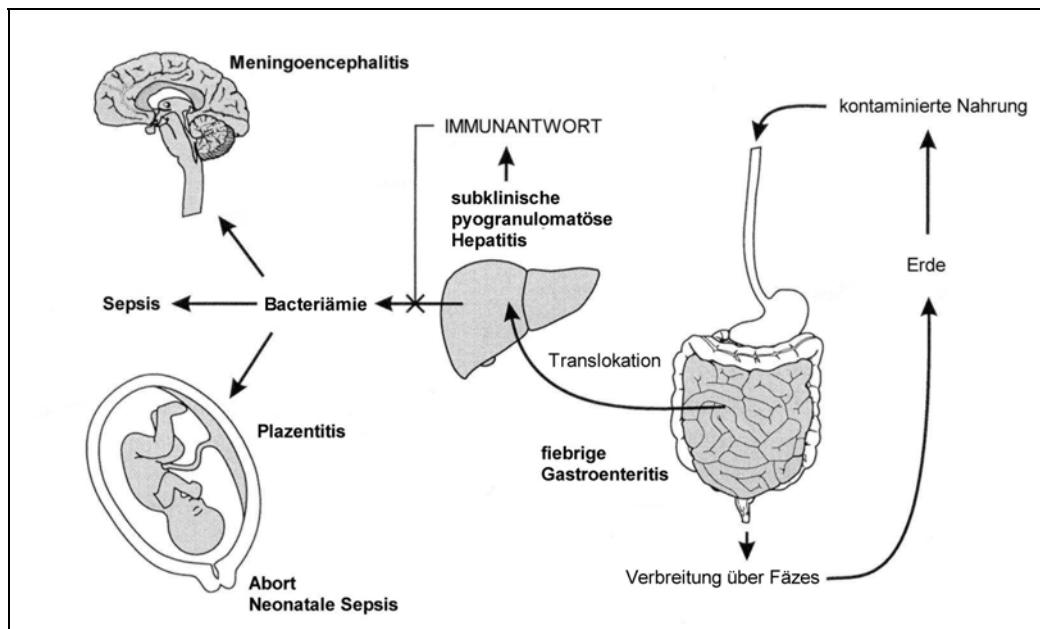


Abb. 2.1: Schematische Darstellung des Verlaufs einer Infektion mit *Listeria*
(modifiziert nach Vázquez-Boland et al. [260], Beschreibung siehe Text)

Bei Mensch und Tier verläuft die Infektionsroute normalerweise über den Gastrointestinaltrakt (Abb. 2.1). Da kontaminierte Lebens- bzw. Futtermittel die Hauptursache für eine Infektion mit *L. monocytogenes* (bzw. *L. ivanovii*) darstellen (70), geht man davon aus, dass die Bakterien oral aufgenommen werden. Nach Überwinden des widrigen Milieus im Magen gelangen die Listerien schließlich in den Darm. Dort dringen sie vermutlich in verschiedene Darmzelltypen wie die M-Zellen der Peyerschen Platten und Darmepithelzellen ein (123, 132, 175, 214) und können auf noch nicht geklärte Weise eine Gastroenteritis auslösen. Anschließend überschreiten die pathogenen Bakterien die Darmbarriere und werden in der darunter liegenden Lamina propria von phagozytischen Zellen aufgenommen. Über die Lymphe und Blutbahn erfolgt eine Ausbreitung zu den Mesenteriallymphknoten, Milz und Leber, wobei diese bevorzugte Orte einer Primärinfektion

sind (213, 259). Bei intaktem Immunsystem kommt es schnell zu einem Abtöten der Listerien durch Makrophagen in Milz und Leber. Vor allem die Kupfferschen Zellen der Leber bewirken einen Rückgang der Bakterienzahl innerhalb der ersten sechs Stunden nach Infektion und initiieren die Entwicklung einer antilisteriellen Immunantwort (100).

Bei immungeschwächten Personen jedoch können sich die pathogenen Bakterien ungehindert in den Hepatozyten der Leber vermehren. Hier durchläuft *L. monocytogenes* den vollständigen intrazellulären Infektionszyklus (Kap. 2.3) und gelangt schließlich über den Blutkreislauf in eine Vielzahl von Organen. So können Plazenta oder die Blut-Hirn-Schranke überwunden und die für eine Meningitis typischen Symptome ausgelöst werden (260).

Das Auftreten einer Listeriose ist von folgenden Faktoren abhängig: (i) der Dosis der mit der Nahrung aufgenommenen Bakterien, (ii) den pathogenen Eigenschaften des *Listeria*-Stammes, und (iii) dem Zustand des Immunsystems des infizierten Wirts.

In Personen mit intaktem Immunsystem hat die Aufnahme geringer Dosen von *L. monocytogenes* vermutlich keinen Effekt und es kommt nur zur Entwicklung einer antilisteriellen Immunantwort. Die Aufnahme großer Mengen an Bakterien hingegen führt eventuell zu einer Gastroenteritis und Fieber.

Immungeschwächte Personen dagegen können selbst bei Aufnahme geringer Dosen keine ausreichende Immunantwort gegen die Vermehrung von *Listeria* in der Leber entwickeln. Somit kommt es zu einem Anstieg der Bakterienzahl in den Hepatozyten und ihrer Freisetzung in die Blutbahn, was zu lokalen Infektionen der sekundären Zielorgane (Gehirn und Plazenta) oder Sepsis führen kann (260).

2.3 Intrazellulärer Infektionszyklus und Virulenzfaktoren von *L. monocytogenes* und *L. ivanovii*

Pathogene Listerien (*L. monocytogenes* und *L. ivanovii*) werden zur Gruppe der fakultativ intrazellulären Bakterien gerechnet. Wie etliche andere Vertreter dieser Gruppe (z.B. *Mycobacterium*, *Salmonella*, *Shigella*, *Legionella* und *Yersinia*) können sie in eukaryotische Wirtszellen eindringen, dort überleben, sich vermehren und über die Zellgrenzen hinweg ausbreiten. Diese Lebensweise ist jedoch nicht obligat und die krankheitserregenden Bakterien sind auch in der freien Natur anzutreffen (36, 41, 144).

Aufgrund ihrer leichten Kultivierbarkeit im Labor und der geringen Virulenz gegenüber gesunden Personen eignet sich die Gattung *Listeria* gut als Modellsystem für die Untersuchung von Infektions- und Vermehrungsstrategien fakultativ intrazellulärer Bakterien. Zudem ermöglicht das Vorkommen von sowohl pathogenen als auch apathogenen Arten innerhalb der Gattung vergleichende Untersuchungen.

Listeria bevorzugt Makrophagen als Wirtszellen, kann aber seine eigene Phagozytose auch in einer Reihe nicht-professionell phagozytischer Zellen induzieren. Hierzu zählen unter anderem Epithelzellen (79, 186, 210), Fibroblasten (149, 252), Hepatozyten (62, 101, 269), Endothelzellen (65, 104, 202) und verschiedene Typen von Nervenzellen einschließlich Neuronen (64). Für *in vivo*-Untersuchungen können deshalb permanente Zelllinien wie MDBK (Epithelzellen), TIB-73 (Hepatozyten) oder J774 (Makrophagen) eingesetzt werden. Im Inneren all dieser Zellen – egal ob Makrophagen oder nicht-professionell phagozytische Zellen – entwickelt *Listeria* einen intrazellulären Infektionszyklus, der bei *L. monocytogenes* bisher am detailliertesten untersucht und beschrieben worden ist (Abb. 2.2):

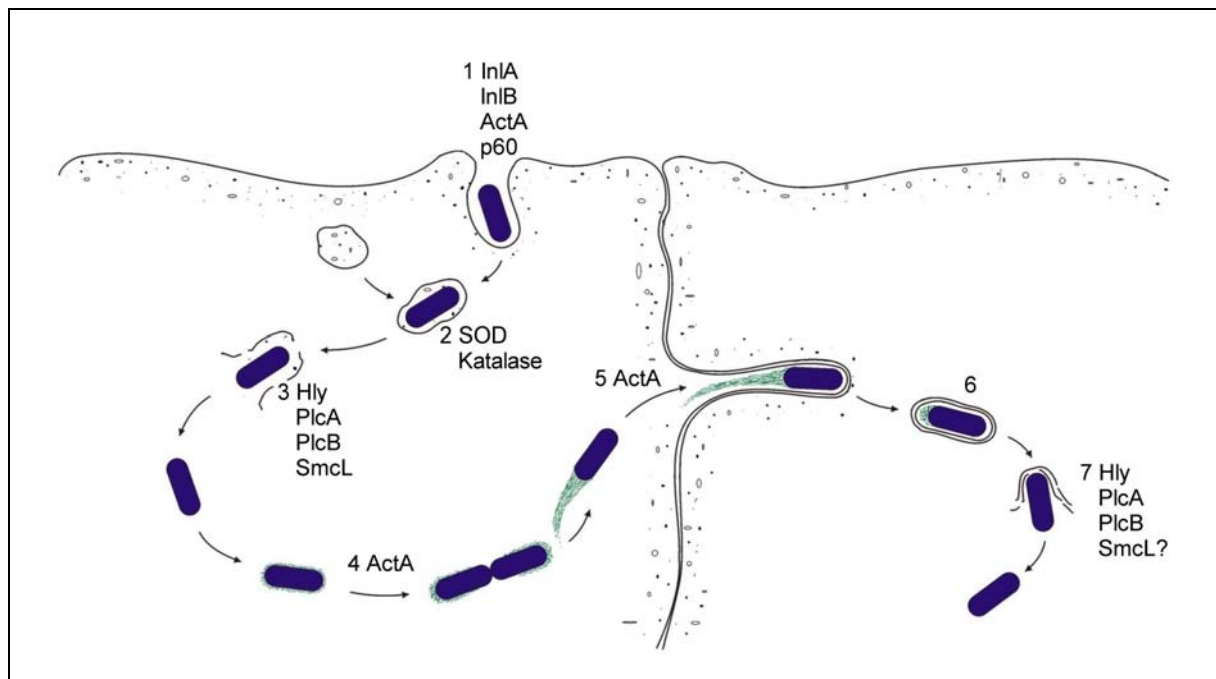


Abb. 2.2: Infektionszyklus und daran beteiligte Virulenzfaktoren von *L. monocytogenes* und *L. ivanovii*

(modifiziert nach Tilney und Portnoy [257]; Kreft [145])

Neben den einzelnen Schritten des Infektionszyklus sind die daran beteiligten Virulenzfaktoren dargestellt. Genauere Erläuterungen dazu finden sich im nachfolgenden Text.

1 Adhäsion und Invasion in die Wirtszelle (Kap. 2.3.1)

2 Einschluss und Überleben im Phagosom (Kap. 2.3.2)

3 Lyse des Phagosoms und Freisetzung der Listerien in das Zytoplasma (Kap. 2.3.2)

4 Vermehrung im Zytoplasma und Aktinpolymerisation (Kap. 2.3.3)

5 Ausbildung von Aktinschweifchen, intra- und interzelluläre Ausbreitung der Bakterien (Kap. 2.3.3)

6 Einschluss und Überleben im sekundären Phagosom mit Doppelmembran

7 Zerstörung der Doppelmembran, Freisetzung in das Zytoplasma und Wiederholung des Zyklus (Kap. 2.3.4)

Die Infektion von *L. monocytogenes* beginnt mit der Adhäsion an die eukaryotische Wirtszelle gefolgt vom Eindringen in diese. Dabei kann *L. monocytogenes* sowohl in phagozytierende Zellen wie Makrophagen, als auch in nicht-professionelle Phagozyten aufgenommen werden. Es konnten verschiedene eukaryotische Zellrezeptoren nachgewiesen werden, die der Wirtszellerkennung durch *Listeria* spp. dienen. Hierzu zählen verschiedene Komplementrezeptoren (20), das Glykoprotein E-Cadherin (186), der Met-Rezeptor für den Hepatozytenwachstumsfaktor (245) sowie Bestandteile der extrazellulären Matrix wie z.B.

Heparansulfat-Proteoglykane (4) und Fibronectin (90). Die bisher identifizierten listeriellen Liganden sind allesamt Oberflächenproteine, die die Aufnahme in nicht-phagozytische Zellen induzieren. Zu diesen Proteinen zählen die Internaline InlA und InlB, der Aktinpolymerisierende Faktor ActA und das p60-Protein (Kap. 2.3.1).

Nach dem Eindringen in die Wirtszelle sind die Bakterien zunächst in einem Phagosom eingeschlossen und müssen die antibakteriellen Abwehrmechanismen ("oxidativer burst", Ansäuerung) überstehen (79). *L. monocytogenes* verhindert die Phagosomenreifung zum Phagolysosom (5) und entkommt nach ca. 30 min. in das Zytoplasma der Wirtszelle (79). Innerhalb von zwei Stunden liegen ca. 50 % der Bakterien frei im Zytoplasma vor (256) und vermehren sich mit einer Verdopplungszeit von ca. einer Stunde (79, 210). Das Entkommen aus dem Phagosom ist essentiell für das Überleben und die Vermehrung von *L. monocytogenes* in der Wirtszelle (92) und wird durch ein Hämolysin in Kombination mit einer Phospholipase vermittelt (Kap. 2.3.2).

Im Zytoplasma werden die Bakterienzellen sofort von diffusem Wirtszellaktin umgeben, bis es nach zwei Stunden zur Reorganisation der Aktinfilamente in einen kometenähnlichen Schweif von bis zu 40 µm Länge an einem Zellpol kommt. Dieser Aktinschweif besteht aus zwei Arten von quervernetzten Aktinfilamenten, zum einen relativ lange, längs angeordnete Aktinbündel, zum anderen kürzere, zufällig angeordnete Filamente. Mit Hilfe dieses Aktinschweifs werden die Listerien mit einer Durchschnittsgeschwindigkeit von ca. 0,3 µm/s durch das Zytoplasma bewegt. Ein an diesem Prozess beteiligtes listerielles Oberflächenprotein ist der Aktinpolymerisierende Faktor ActA (Kap. 2.3.3).

Die Bewegung ist jedoch nicht gerichtet, sondern erfolgt rein zufällig. Gelangt das Bakterium hierbei an die Zellperipherie, induziert es dort eine pseudopodienartige Ausstülpung der Wirtszellmembran, die von der Nachbarzelle erkannt und phagozytiert wird. *L. monocytogenes* ist nun in der neu infizierten Zelle von einer Doppelmembran umgeben, lysiert diese wieder und entkommt schnell (innerhalb von fünf Minuten) in das Zytoplasma der neuen Wirtszelle. Dort kann ein neuer intrazellulärer Vermehrungs- und Ausbreitungszyklus stattfinden, ohne dass die Listerien in Kontakt mit dem extrazellulären Milieu kommen. Auf diese Weise entkommen die pathogenen Bakterien durch die Zell-zu-Zell-Ausbreitung den extrazellulären Abwehrmechanismen des Wirts (48, 138, 225, 238, 242, 254, 256).

L. ivanovii infiziert in gleicher Weise wie *L. monocytogenes* kultivierte Epithelzellen (131). Nach induzierter Aufnahme in die eukaryotische Wirtszelle erfolgt die Lyse des Phagosoms durch das Zytolysin Ivanolysin (ILO), das eng verwandt zu Listeriolysin O (LLO) von *L. monocytogenes* ist (142, 166, 258). Anschließend wird auch *L. ivanovii* im Zytoplasma von einem Saum aus Aktinfilamenten umgeben und kann diese mit Hilfe des ActA-ähnlichen Proteins i-ActA zu einem Schweif reorganisieren, mit dem es sich intra- und interzellulär fortbewegt (98, 131, 145).

2.3.1 Eindringen in die Wirtszelle

Um in nicht-professionelle Phagozyten wie z.B. Epithelzellen eindringen zu können, benötigt *L. monocytogenes* verschiedene bakterielle Faktoren. Hierzu zählen die sog. Internaline sowie die Proteine p60 und ActA. Auch in *L. ivanovii* findet man diese Proteine (i-ActA, p60) und es konnte zudem eine Reihe von Internalinen identifiziert werden.

Internaline

An der Invasion von *Listeria monocytogenes* in nicht-professionell phagozytierende Zellen wie Darmepithelzellen sind verschiedene Internaline beteiligt. Die Internaline zählen zur Multigenfamilie der Leucin-reichen Repeat-Proteine und lassen sich in zwei Gruppen einteilen, die kleinen, sekretierten Internaline und die großen, oberflächenassoziierten Internaline (Abb. 2.3).

Große Internaline wurden bisher nur bei *L. monocytogenes* identifiziert (siehe aber Kap. 5.2.2) und besitzen einen charakteristischen Aufbau. Am N-Terminus findet sich ein Signalpeptid auf das zwei Repeat-Regionen A und B folgen. Die Repeat-Region A enthält Leucin-reiche Repeats (LRR) und ist durch eine hoch konservierte Interrepeat-Region von der Repeat-Region B getrennt. Die Leucin-reichen Repeats der Region A sind charakteristisch für alle Internaline und sind vermutlich an Protein-Protein-Interaktionen beteiligt. Am C-terminalen Ende schließlich befindet sich ein Zellwandanker, der bei allen großen Internalinen außer InlB über ein LPXTG-Motiv kovalent mit dem bakteriellen Peptidoglykan verknüpft ist. Diese Region besitzt strukturelle Homologien zu verschiedenen Oberflächenproteinen Gram-positiver Kokken, die zur Gruppe der Adhäsine gerechnet werden (61, 80). InlB allerdings besitzt einen Zelloberflächenanker (Cell surface anchor, Csa) und ist so mit Teichon- oder Lipoteichonsäuren der bakteriellen Zellwand verbunden (17, 127).

Mittlerweile konnten in *L. monocytogenes* acht Vertreter der großen Internaline (Abb. 2.3) identifiziert und deren Funktion teilweise aufgeklärt werden (63, 80, 215).

Die ersten beiden großen Internaline, die charakterisiert wurden, waren InlA und InlB. Diese zwei Proteine werden vom *inlAB*-Operon codiert und wurden durch Transposon-induzierte Mutanten identifiziert, die in ihrer Invasivität vermindert waren. Sowohl für InlA als auch für InlB konnte gezeigt werden, dass *L. monocytogenes* in vitro diese beiden Invasine benötigt, um erfolgreich in normalerweise nicht-phagozytische Zellen eindringen zu können (59, 62, 80, 81, 82, 101, 104, 171).

Bei **Internalin A** (InlA), das vom *inlA*-Gen codiert wird, handelt es sich um ein 88 kDa schweres Oberflächenprotein, das den für die großen Internaline charakteristischen Aufbau aus einem N-terminalen Signalpeptid, einer Repeat-Region A aus Leucin-reichen Repeats, einer Repeat-Region B und einem Zellwandanker mit LPXTG-Motiv besitzt. Hierbei ist die N-terminale Region aus Leucin-reichen Repeats und die sich daran anschließende Interrepeat-Region notwendig und ausreichend für die Invasion geeigneter Zellen (162, 186, 260). Für InlA konnte gezeigt werden, dass dieses Protein für das Eindringen in normalerweise nicht-

phagozytische Epithelzellen benötigt wird. So verloren *inlA*-negative Mutanten von *L. monocytogenes* die Fähigkeit, Caco-2-Enterozyten zu penetrieren. Brachte man das *inlA*-Gen in die nicht-invasive, apathogene Art *L. innocua*, so war diese ebenfalls zur Invasion in Caco-2-Zellen befähigt (80). Weitere Versuche ergaben, dass das sich im C-terminalen Zellwandanker befindliche LPXTG-Motiv für die Anheftung von InlA an die bakterielle Zellwand verantwortlich ist und das Enzym Sortase an diesem Prozess beteiligt ist (45, 71, 161, 192). E-Cadherin wurde als spezifischer eukaryotischer Rezeptor für das Protein InlA identifiziert. Das Ca^{2+} -abhängige Adhäsionsmolekül E-Cadherin ist ein Mitglied der Cadherinfamilie, einer Gruppe von Glykoproteinen, und wird vor allem in epithelialen Geweben wie Haut, Leber und 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 (163). Zudem konnte gezeigt werden, dass ein Prolin-Rest an Position 16 von E-Cadherin essentiell für die Interaktion mit InlA ist (163). Die Invasion aber wird durch die intrazytoplasmatische Domäne von E-Cadherin vermittelt und führt vermutlich zu Rearrangements des Aktinzytoskeletts über α - und β -Catenine (164, 260).

Internalin B (InlB) besitzt ein Molekulargewicht von 65 kDa und zeigt große strukturelle Homologie zu InlA (62). Die für Internaline typische hydrophobe C-terminale Region einschließlich LPXTG-Motiv fehlt allerdings. Dafür findet man im C-Terminus von InlB mehrere hintereinander angeordnete Repeats, die jeweils mit der Sequenz GW beginnen. Diese Domäne ist auch als Zelloberflächenanker (Csa) bekannt und vermittelt die Anheftung von InlB an die bakterielle Oberfläche (17). Hierbei taucht InlB teilweise in die Zellwand ein und interagiert mit der Zytoplasmamembran indem es Lipoteichonsäuren als Ligand verwendet (127). Untersuchungen *inlB*-negativer Mutanten haben gezeigt, dass InlB notwendig für die Aufnahme von *L. monocytogenes* in kultivierte Hepatozyten ist (17, 62). Zudem zeichnen sich diese Mutanten durch eine verringerte Virulenz aus und können auch in einige Epithellinien nicht mehr eindringen (171). Auch bei InlB ist die LRR-Region ausreichend, um ein effizientes Eindringen in eukaryotische Wirtszellen zu vermitteln (19, 121). InlB führt zu einer Aktivierung der Phosphatidylinositol (PI) 3-Kinase, die an der Kontrolle des Aktinzytoskeletts beteiligt ist, und bewirkt dadurch eine effiziente Aufnahme in epitheliale Zellen (120). Hierbei ist zudem die Met-Rezeptor Tyrosinkinase beteiligt, die als Bindungspartner der PI-3-Kinase identifiziert wurde und eine wichtige Rolle in der durch InlB vermittelten Invasion spielt (245).

Für beide Internaline InlA und InlB konnte nachgewiesen werden, dass sie an der Invasion von *L. monocytogenes* in eukaryotische Wirtszellen beteiligt sind. Dabei scheinen sie unterschiedliche Zellspezifitäten zu besitzen. InlA vermittelt vermutlich das Eindringen in E-Cadherin-exprimierende Zellen wie z.B. die humanen Caco-2-Darmzellen, während InlB für die Invasion in ein breiteres Spektrum von eukaryotischen Wirtszellen einschließlich bestimmter Epithel- und Fibroblastenzelllinien, sowie Hepatozyten und Endothelzellen verantwortlich ist (62, 63, 65, 102, 103, 186, 188).

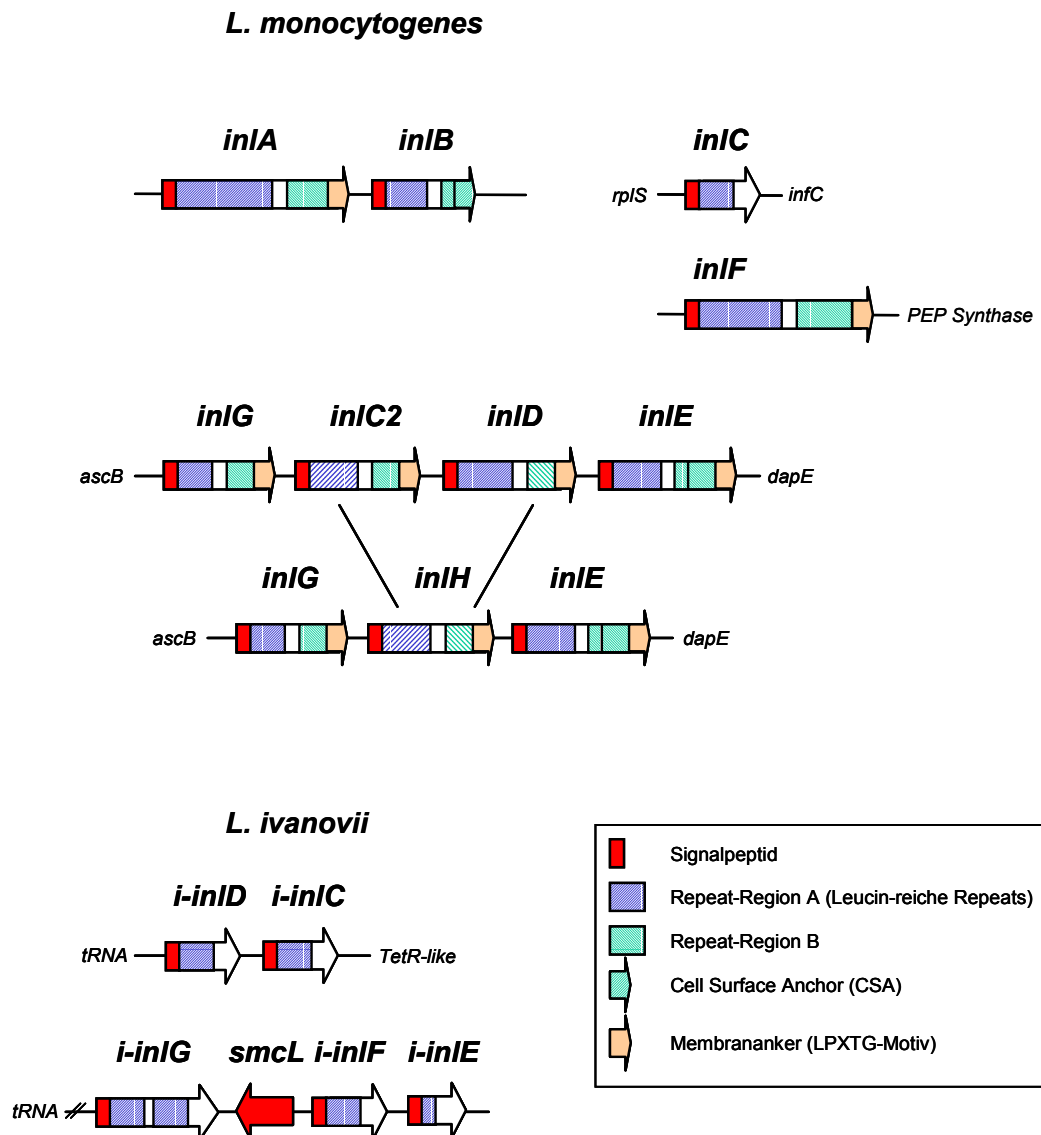


Abb. 2.3: Schematische Darstellung der Internalingene von *L. monocytogenes* und *L. ivanovii* (modifiziert nach Domínguez-Bernal [60], Engelbrecht et al. [67, 68], Kreft et al. [146, 148], Raffelsbauer et al. [215], Vázquez-Boland et al. [260])

Gezeigt ist die unterschiedliche Anordnung der großen Internalingene am gleichen Genort in zwei Isolaten von *L. monocytogenes*, die möglicherweise durch Rearrangements der *inl*-Gene entstanden sind (*inlH* entstand vermutlich durch Rekombination des 5'-Endes von *inlC2* und dem 3'-Ende von *inlD* [146, 215])

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 lokalisiert. Man findet in zwei *L. monocytogenes* Serovaren 1/2a zwei voneinander abweichende Loci, die mehrere *inl*-Gene (*inlG/C2/D/E* bzw. *inlG/H/E*) beinhalten und vermutlich aus einem einzelnen Internalinlocus entstanden sind (63, 215). Zudem besitzt *L. monocytogenes* ein weiteres, nicht geclustert vorkommendes Internalingen *inlF*.

All diese Internaline weisen die typischen Merkmale der großen, oberflächengebundenen Internaline auf und sind bis auf abweichende Anzahl an Repeats in Region A und B ähnlich wie Internalin A aufgebaut. So besitzen sie eine N-terminale Signalsequenz, zwei Repeat-Regionen (LRR und B) und eine Sequenz am C-Terminus zur Verankerung in der Zellwand.

Die Funktion dieser sechs Internaline ist bisher noch unklar. Es konnte aber gezeigt werden, dass sie keine Rolle bei der Invasion der bisher untersuchten nicht-phagozytische Zellen spielen. Deletion des *inlG/H/E*-Genclusters beeinflusste in früheren Untersuchungen die Invasion in verschiedene Säugerzelllinien nicht, was zunächst die Vermutung nahe legte, dass diese Internaline nicht an dem Eindringen in die Wirtszelle beteiligt sind (215). Nach neuesten Untersuchungen sind jedoch InlG/H/E an der Invasion von Säugerzellen durchaus beteiligt (10). Deletion der *inlG/H/E*-homologen Gene *inlC2/D/E* in einem anderen *L. monocytogenes*-Stamm oder Deletion von *inlF* zeigten allerdings auch keine Auswirkung auf die Invasivität (63), sodass diese Frage noch etwas unklar ist.

In *L. ivanovii* konnten bisher keine großen Internaline identifiziert werden. G. Domínguez-Bernal charakterisierte vor kurzem die ersten beiden großen Internaline i-InlB und i-InlB2 in *L. ivanovii*, die einen ähnlichen Aufbau wie InlB von *L. monocytogenes* aufweisen (Kap. 5.2.2). Über deren Funktion ist jedoch noch nichts bekannt (60).

Der Prototyp der kleinen, sekretierten Internaline ist Internalin C (InlC) von *L. monocytogenes*, das bisher einzige kleine Internalin in dieser Art (Abb. 2.3, [59, 67]).

Im Allgemeinen besitzen die kleinen Internaline am N-Terminus ein Signalpeptid und eine Region aus Leucin-reichen Repeats (LLRs), die von zwei hoch konservierten Bereichen flankiert wird. Im Gegensatz zu den großen Internalinen sind die kleinen Internaline nicht Zellwand-assoziiert, sondern werden sekretiert.

Internalin C (InlC oder IrpA) ist mit 30 kDa bedeutend kleiner als die restlichen *L. monocytogenes*-Internaline und wird im Gegensatz zu den großen Internalinen sekretiert und ausschließlich im Kulturüberstand gefunden, diesem Internalin fehlt die C-terminale Membranankersequenz. Deletionsmutanten im *inlC*-Gen führten im Mausinfektionsmodell zu einer reduzierten Virulenz, waren jedoch normal invasiv und zeigten ein normales intrazelluläres Überleben. Deshalb wird vermutet, dass InlC nicht bei der Invasion, sondern in einer späteren Phase der Infektion eine Rolle spielt (59, 67). 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 während der Zell-zu-Zell-Ausbreitung – exprimiert (31, 67). Untersuchung einer *inlC*-Deletionsmutante zeigte jedoch keinen Defekt in der interzellulären Verbreitung von *L. monocytogenes* (59, 67, 103).

In *L. ivanovii* wurde schon eine Reihe von kleinen, sekretierten Internalinen (i-InlC, i-InlD, i-InlE, i-InlF und i-InlG) charakterisiert. Diese Internaline werden PrfA-abhängig reguliert und besitzen alle eine mögliche PrfA-Box in ihrer Gensequenz. G. Domínguez-Bernal konnte zeigen, dass drei dieser Gene (*i-inlE*, *i-inlF* und *i-inlG*) von einem großen Virulenzgencluster (LIPI-2) codiert werden, das noch eine Reihe weiterer kleiner Internalingene enthält (Kap. 5.2.1, [60, 96]). Für die Gene *i-inlE* und *i-inlF* konnte nachgewiesen werden, dass eine Deletion dieser nach Infektion von Mäusen zu einem Verlust der Virulenz führte (69). Die genaue Funktion dieser *L. ivanovii*-spezifischen, kleinen Internaline ist aber noch nicht bekannt (59, 67, 68, 69, 146).

p60-Protein

Ein weiterer bakterieller Faktor, der vermutlich an der Invasion von nicht-professionell phagozytischen Zellen beteiligt ist, ist das extrazelluläre, 60 kDa schwere Protein p60, das vom *iap*-Gen (*invasion-associated protein*) codiert und PrfA-unabhängig exprimiert wird (29, 31, 140). Das p60-Protein ist ein basisches Protein mit einer hohen positiven Ladung. Man findet p60 zum Teil oberflächengebunden vor, der Hauptteil wird jedoch in das Medium sekretiert (150, 229).

Spontan auftretende Rauh-Mutanten von *L. monocytogenes* sind gekennzeichnet durch eine rauhe Kolonieoberfläche und gleichzeitig eine stark verminderte p60-Produktion. Sie besitzen verringerte Adhärenz und Invasivität in verschiedene Zelltypen und zeichnen sich zudem durch verminderte Virulenz aus (116, 117, 150). Die sog. R-Mutanten bilden während ihres Wachstums lange Zellketten, in denen die Bakterien durch Doppelsepten getrennt sind. Bei Zugabe von partiell gereinigtem p60 zerfallen diese Zellketten in Einzelzellen, die sich in ihrer Invasivität nicht mehr vom Wildtyp unterscheiden (150). Das p60-Protein scheint also eine Rolle für die Invasion in bestimmte Zelltypen zu spielen. Man nimmt an, dass die positive Ladung von p60 die Adhärenz an die Wirtszelle steigert und somit die Aufnahme in diese erleichtert. Zudem besitzt p60 eine Mureinhydrolaseaktivität, die in einem späten Schritt der Zellteilung benötigt wird und den Zerfall der Zellketten bewirkt (271).

p60 konnte in allen *Listeria*-Arten nachgewiesen werden und besteht aus einer variablen mittleren Region und hoch konservierten C- und N-terminalen Bereichen (27, 140). Die variable Region ist charakteristisch für jede *Listeria*-Art, weshalb p60 bzw. das *iap*-Gen zur schnellen Identifizierung einzelner *Listeria*-Spezies mittels immunologischer Methoden oder PCR herangezogen werden kann (26, 28).

ActA

ActA ist ein listeriellies Oberflächenprotein, das verantwortlich ist für das Aktin-vermittelte bakterielle Bewegungsvermögen und die Ausbreitung von Zelle zu Zelle (Kap. 2.3.3). 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 und vermitteln ebenfalls die Anheftung und Invasion von *L. monocytogenes* in diese Zellen. 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 (4).

Neue Untersuchungen zeigten zudem, 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 (251).

2.3.2 Überleben im und Entkommen aus dem Phagosom

Nach dem Eindringen in die eukaryotische Wirtszelle sind virulente Listerien im Phagosom den antibakteriellen Mechanismen des Wirts ausgesetzt, überleben aber zu einem gewissen Prozentsatz aufgrund aktiver bakterieller Abwehrmechanismen (z.B. Superoxid-Dismutase, Katalase) im Phagosom und können schließlich in das Zytoplasma der Wirtszelle entkommen. Für das Entkommen aus dem Phagosom werden mehrere Proteine (Hämolysin, Phospholipasen) benötigt, deren Gene auch in *L. ivanovii* und *L. seeligeri* nachgewiesen werden konnten (97, 107, 108).

Superoxid-Dismutase, Katalase

Nach der Aufnahme ins Phagosom ist *L. monocytogenes* einer Vielzahl antibakterieller Abwehrmechanismen des Wirts ausgesetzt. Schon nach kurzer Zeit kommt es zu einer Ansäuerung des Phagosoms und es werden große Mengen reaktiver Sauerstoffmetabolite (wie H_2O_2 , O_2^- , OH^\bullet und $HOCl$) gebildet, die innerhalb weniger Minuten zur Abtötung avirulenter Bakterien führen. Pathogene Listerien verfügen jedoch über die Enzyme Superoxid-Dismutase (SOD) und Katalase, mit deren Hilfe sie die toxischen Sauerstoffverbindungen in unschädliche Endprodukte umwandeln können (22, 109, 144). Da diese Enzyme an der bakteriellen Verteidigung gegen die Abwehrmechanismen der eukaryotischen Wirtszelle beteiligt sind, können sie als mögliche Virulenzfaktoren von *Listeria* angesehen werden (36). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass Transposon-induzierte, Katalase-defiziente Mutanten im Mausinfektionsmodell in ihrer Virulenz nicht beeinträchtigt waren. Diese Mutanten produzierten aber im Gegensatz zu Katalase-positiven Stämmen eine größere Menge an Superoxid-Dismutase (160). Zudem wurde einige Katalase-negative Stämme von *L. monocytogenes* aus Listeriose-Patienten isoliert, die voll virulent waren (30, 66, 253). Auch ein Verlust der SOD-Aktivität durch Deletion des *sod*-Gens führte nur zu einer leichten Verminderung der Vermehrungsrate in Knochenmarksmakrophagen und Organen infizierter Mäuse. Eine Doppelmutante, die sowohl für Katalase als auch SOD defekt war, zeigte allerdings eine deutliche Virulenzminderung (22).

Proteine der Clp-Familie

Für das Überleben in der phagozytischen Vakuole benötigt *Listeria* eine an die im Phagosom vorliegenden Stressbedingungen angepasste Antwort mittels konservierter Proteine, die unter diesen widrigen Umständen produziert werden. Dies könnten zum Beispiel Chaperones sein, die an der korrekten Faltung oder dem Zusammenbau beschädigter Proteine beteiligt sind, oder Proteasen, die fehlerhafte Proteine abbauen. Eine Analyse der Stressantwort von *L. monocytogenes* zeigte, dass unter einer Vielzahl von Stressbedingungen (Hitze- und Kälteschock, Säurestress) die Produktion von Stressproteinen induziert wird (260). Erst kürzlich konnte eine Gruppe von Virulenz-assoziierten Stressproteinen identifiziert werden, die am Überleben im Phagosom und dem Entkommen ins Zytoplasma beteiligt sind. Zu diesen zählen 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°C) zu einer verstärkten Produktion dieser Stressproteine führte. *clpC*-Mutanten waren zudem in ihrer Virulenz stark eingeschränkt und konnten sich nicht mehr aus dem primären Phagosom befreien. Die Doppelmutante *clpC/clpE* schließlich war im Mausmodell völlig avirulent und auch für die Deletion von *clpP* konnte gezeigt werden, dass diese Stressprotease für das Wachstum von *Listeria monocytogenes* unter Stressbedingungen benötigt wird (190, 191, 227, 228, 264).

Listeriolysin O (LLO)

Das Hämolytogen *hly* war die erste Virulenzdeterminante, die in *Listeria* spp. identifiziert und sequenziert wurde und führte zur Entdeckung des chromosomalen Virulenzgenclusters mit seinen am intrazellulären Infektionszyklus beteiligten Genen bzw. Proteinen (260 und Kap. 2.4).

Listeriolysin O (LLO) ist ein extrazelluläres, Cholesterol-abhängiges, porenbildendes Hämolytogen, das es *L. monocytogenes* ermöglicht, aus dem Phagosom der eukaryotischen Wirtszelle zu entkommen. LLO gehört zur Familie der SH-aktivierbaren Zytolysine, von denen Streptolysin O (SLO) aus *Streptococcus pyogenes* der Prototyp ist (1, 86). Das Hämolytogen LLO besitzt ein Molekulargewicht von 58,6 kDa und wird vom PrfA-regulierten Gen *hly* codiert (54, 167, 180, 181). Sein Wirkungsoptimum liegt im Gegensatz zu den SH-aktivierbaren Zytolysinen anderer Bakterien im sauren Bereich bei 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 (6, 86) und daneben verhindert, dass *L. monocytogenes* andere Bestandteile im Zytoplasma der Wirtszelle beschädigt und damit sein intrazelluläres Überleben gefährdet (7).

LLO ist ein essentieller Virulenzfaktor und spielt vermutlich eine Schlüsselrolle beim Entkommen von *Listeria* aus dem Phagosom infizierter Zellen (41, 79). 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 Cholesterol als primären Rezeptor auf der eukaryotischen Membran. Nach Rezeptorbindung kommt es durch Zusammenlagerung von bis zu 70 Toxinmonomeren 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 (1, 144). Auch 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 (83).

Es konnte gezeigt werden, dass Transposon-Inaktivierung des *hly*-Gens in den pathogenen *L. monocytogenes*-Stämmen zu einem Verlust der hämolytischen Aktivität führt (42). Zudem verhielten sich diese Mutanten avirulent im Mausinfektionsmodell (78, 134) und waren nicht mehr fähig, in kultivierten Zelllinien zu wachsen (79, 149, 210). Die Überlebensrate dieser Mutanten war deutlich verringert, wohingegen ihre Aufnahme in die eukaryotischen Wirtszellen unverändert blieb (149). Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigten zudem, dass *hly*-Mutanten von *L. monocytogenes* nach Infektion von Epithelzellen im Phagosom

verblieben, wohingegen hämolytische Bakterien frei im Zytoplasma zu finden waren (79). Bei der Zell-zu-Zell-Ausbreitung schließlich konnte nachgewiesen werden, dass *hly*-Mutanten, an deren Oberfläche Listeriolysin O kovalent gebunden wurde, zu einem geringen Prozentsatz aus der primären Vakuole entkommen und sich anschließend normal im Zytoplasma der Wirtszelle vermehren konnten. Auch die Zell-zu-Zell-Ausbreitung war erfolgreich, wobei die Mutanten allerdings in den Vakuolen mit Doppelmembran eingeschlossen blieben und sich aufgrund des fehlenden Hämolysins nicht befreien konnten (83).

Listeriolysin O ist somit essentiell für das Überleben und die Zell-zu-Zell-Ausbreitung der Listerien in den infizierten Zellen, wird jedoch für die Invasion nicht benötigt.

Neuere 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 z.B. die Induktion der Zellproliferation, Apoptose oder Zytokinexpression und damit verbundene Immunantwort, sowie die Beeinflussung des Zellstoffwechsels und der Signaltransduktion der Wirtszelle (51, 106, 151, 197, 260, 265).

Auch in *L. ivanovii* konnte ein eng verwandtes Hämolysin, das Ivanolysin ILO identifiziert werden (258) und auch die schwach hämolytische, aber nicht pathogene Art *L. seeligeri* produziert – wenn auch nur in geringen Mengen – ein mit dem *L. monocytogenes* Listeriolysin verwandtes Zytolysin (87, 166).

Phosphatidylinositol-spezifische Phospholipase C (PI-PLC)

Die Phosphatidylinositol-spezifische Phospholipase C (PI-PLC) ist ein weiteres listerielles Protein, das vermutlich am Entkommen aus dem Phagosom beteiligt ist. PI-PLC ist ein 33 kDa schweres, sekretiertes Protein, das eine hohe Substratspezifität für Phosphatidylinositol (PI) besitzt und Ähnlichkeiten zu den PI-PLCs von *Bacillus thuringiensis*, *B. cereus* und *Staphylococcus aureus* aufweist. Es wird vom Gen *plcA* codiert und ist PrfA-reguliert (33, 168, 185).

Untersuchungen an nicht-hämolytischen (*hly*⁻) Mutanten zeigten, dass diese in geringem Maße noch aus dem Phagosom entkommen und im Zytoplasma der Wirtszelle wachsen können (210). Dies legt den Schluss nahe, dass neben LLO weitere Faktoren 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 (93).

In-frame-Deletionsmutanten im *plcA*-Gen resultierten in einem leichten Rückgang der Virulenz im Mausinfektionsmodell und einem weniger effizienten Entkommen aus dem Phagosom verglichen mit dem Wildtyp (34). Heterologe Expression von *plcA* in der apathogenen Art *L. innocua* führte zudem zu einer kurzzeitigen intraphagosomalen Vermehrung der normalerweise nicht replizierenden Bakterien (237). 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 (178, 246, 260). Somit bewirkt PI-PLC vermutlich zusammen mit LLO die Zerstörung des primären Phagosoms und könnte durch Hydrolyse membranständiger Proteine den Zugang zur phagosomalen Membran und damit die Lyse des Phagosoms durch LLO erleichtern (242).

Sphingomyelinase

Das Tierpathogen *L. ivanovii* produziert zusätzlich zu den bei *L. monocytogenes* vorkommenden Phospholipasen PI-PLC und PC-PLC (Kap. 2.3.4) noch eine weitere Phospholipase, die spezifisch für Sphingomyelin ist. Dieses Enzym (SMase) wurde aus Kulturüberstand von *L. ivanovii* nach vorheriger Entfernung des Hämolytins ILO gereinigt und ist verantwortlich für die typische doppelte Lysezone auf Blutagar. Im Gegensatz zu der schwachen Hämolyse von *L. monocytogenes* findet man bei *L. ivanovii* auf Blutagar (Schaf) eine starke Hämolyse bestehend aus zwei Zonen, einem inneren Ring mit kompletter Lyse und einem äußeren Ring mit unvollständiger Lyse ähnlich wie für die β -Toxin-Produzenten *S. aureus* und *B. cereus* (220, 258, 260).

Das Gen *smcL*, das für die *L. ivanovii*-spezifische SMase codiert, wurde mittlerweile sequenziert und Deletions- und Komplementationsversuche zeigten, dass dieses Enzym verantwortlich ist für die unterschiedliche Hämolyse von *L. ivanovii* (95, 96).

Neuere Experimente zeigten zudem, dass die Sphingomyelinase eine zusätzliche Rolle in der Pathogenese wie PlcA und PlcB spielt. Ein Fehlen der SMase-Produktion in *L. ivanovii* führte zu einem leichten Absinken der Virulenz und der intrazellulären Wachstumsrate in Epithelzellen aus dem Rind. Zudem erleichterte eine Komplementation mit dem *smcL*-Gen der apathogenen Art *L. innocua* das intrazelluläre Überleben in Makrophagen. Schließlich war es einer *L. monocytogenes*-Mutante, in der alle normalerweise für das Entkommen aus dem Phagosom essentiellen Gene (*hly*, *plcA*, *plcB*, *mpl*) deletiert waren, möglich, aus dem Phagosom zu entkommen und sich intrazellulär in Epithelzellen zu vermehren, wenn sie heterolog mit *smcL* komplementiert wurde (95, 96, 260).

Folglich scheint die für *L. ivanovii* spezifische Sphingomyelinase eine ähnliche Funktion wie das Hämolytin und die Phospholipasen PlcA und PlcB zu besitzen und ist an der Zerstörung der phagosomalen Membran beteiligt.

2.3.3 Vermehrung und Verbreitung im Zytoplasma

Nach Verlassen des Phagosoms kommt es im Zytoplasma der Wirtszelle zu einer Vermehrung der Bakterien mit einer Verdopplungszeit von ca. einer Stunde (79). Während des Wachstums sind die Listerien zunächst von einer diffusen Wolke aus Wirtszellaktin umgeben, das sie nach zwei Stunden in eine kometenschweifähnliche Struktur an einem Zellpol umlagern. Mit Hilfe dieses Aktinschweifs können sich die Bakterien intrazellulär fortbewegen und benachbarte Zellen infizieren (9, 43, 44, 48, 173, 225, 249, 254, 256, 257).

ActA

Das Oberflächenprotein ActA trägt als einziges listeriell Protein entscheidend zur Fortbewegungsfähigkeit der Listerien im Zytoplasma der Wirtszelle bei und vermittelt dadurch auch die Ausbreitung der Bakterien von Zelle zu Zelle (56, 137).

Das Gen *actA* codiert das 67 kDa schwere Protein ActA, das überwiegend oberflächengebunden vorliegt, aber auch im Kulturüberstand nachgewiesen werden kann.

ActA besitzt ein typisches N-terminales Signalpeptid, einen Mittelteil bestehend aus Prolinreichen Repeats und eine hydrophobe C-terminale Region, die als Membrananker fungiert. Das Protein enthält mindestens zwei Bereiche, die essentiell für seine Wirkung sind. 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 Prolinreiche Repeat-Region, die direkt an VASP (vasodilator-stimulated protein) und das VASP-Homolog Mena bindet (56, 137, 158, 159, 195, 208, 209, 259).

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 (138, 193). Zusätzlich zur Prolinreichen Repeat-Region besitzt ActA Konsensussequenzen zur Phosphorylierung durch Caseinkinase II. Es konnte auch gezeigt werden, dass ActA im Zytoplasma eukaryotischer Zellen phosphoryliert wird, genaueres ist jedoch noch nicht darüber bekannt (25).

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 (256). Das Oberflächenprotein ActA ist hierbei der einzige listerielle Faktor, der für die Rekrutierung von Aktinfilamenten der Wirtszelle benötigt wird (208). Untersuchungen an *actA*-Mutanten haben gezeigt, dass diese nicht mehr zur Anhäufung von Wirtszellaktin auf der Bakterienoberfläche befähigt sind. Die Mutanten können sich nicht mehr im Zytoplasma fortbewegen, da keine Aktinschweife mehr ausgebildet werden, und wachsen deshalb in intrazellulären Mikrokolonien. Zudem sind diese Listerien in ihrer Virulenz verringert, da auch keine Zell-zu-Zell-Ausbreitung stattfinden kann (56, 137).

Weitere Versuche zeigten, dass ActA essentiell für die Aktin-vermittelte Fortbewegung der Bakterien ist. So konnten mit ActA gekoppelte Mitochondrien in Epithelzellen Aktin

rekrutieren, ohne dass diese Zellen mit Listerien infiziert wurden (208). Expression des *actA*-Gens in den normalerweise nicht intrazellulär beweglichen Bakterien *L. innocua* und *S. pneumoniae* bewirkte zudem, dass diese sich mittels Aktinschweif fortbewegen konnten. Folglich kann ActA alleine nicht nur zelluläres Aktin rekrutieren, sondern auch eine bakterielle Fortbewegung initiieren (139, 247, 260).

ActA ist ungleichmäßig auf der Bakterienoberfläche verteilt, kann im Aktinschweif aber nicht nachgewiesen werden. Dies bedeutet, dass ActA nicht für die Stabilisierung des Aktinschweifs benötigt wird. Bei sich teilenden Bakterien findet sich kein ActA an dem Zellpol, an dem die letzte Septumbildung stattgefunden hat. Die Konzentration dieses Proteins steigt in Richtung des alten Zellpols, an dem auch die Aktinpolymerisation stattfindet (138, 193, 194, 247). In der bakteriennahen Region des Schweifs sind die Aktinfilamente in gleicher Richtung angeordnet und mit den sog. "barbed ends" zur Bakterienzelle hin gerichtet. Dies legt den Schluss nahe, dass die Aktinnukleation an diesem Punkt, d.h. direkt am Bakterium, erfolgt. Hier findet eine kontinuierliche Einlagerung von Aktinmonomeren statt, die das Bakterium in Richtung des ActA-freien Zellpols vorwärts drückt. Mit Hilfe des Aktinschweifs können sich die Listerien nun im Zytoplasma fortbewegen. Die intrazelluläre Fortbewegungsgeschwindigkeit ist dabei proportional zur Rate der Aktinpolymerisation bzw. zur Länge des Aktinschweifs und kann Werte bis 1,5 $\mu\text{m/s}$ erreichen (48, 187, 232, 254, 256).

Es ist jedoch noch nicht vollständig geklärt, ob ActA die Aktinpolymerisation durch direkte Interaktion mit dem Wirtszellaktin bewirkt oder indirekt über einen zellulären Nukleator wirkt, denn Bindung von ActA an globuläres (G-) Aktin konnte nur in einigen Untersuchungen nachgewiesen werden (124, 254, 255, 260, 273). Deshalb stellt sich die Frage, ob ActA in vivo in der Säugerzelle modifiziert werden muss, um seine Bindungseigenschaften zu erhalten, oder ob ein oder mehrere andere Wirtszellproteine mit ActA interagieren und so gemeinsam die Aktinnukleation initiieren. Bisher wurde eine Reihe Aktin-bindender Wirtszellproteine identifiziert, die mit dem Listerien-induzierten Aktinschweif assoziiert sind. Hierzu zählen unter anderem α -Aktinin, Fimbrin, Tropomyosin, Profilin, Vinculin, Talin, Filamin, Villin, Gelsolin, Ezrin/Radixin, Cofilin, Coronin, Rac, CapZ, Arp2/3 und VASP (35, 43, 48, 50, 155, 209, 255, 260).

Profilin und VASP wurden nur an der Stelle des Aktineinbaus in unmittelbarer Nähe des Bakteriums gefunden (38, 255), was vermuten lässt, dass diese beiden Proteine aktiv am Prozess der Aktinpolymerisation in *Listeria* beteiligt sind. Profilin ist ein zytoplasmatisches Protein, das die Ausbildung eines Aktinschweifs durch Komplexbildung mit G-Aktin positiv beeinflussen kann, hierzu aber noch einen weiteren zusätzlichen Faktor aus der Wirtszelle benötigt, um mit ActA interagieren zu können (255). Das Protein VASP (vasodilator-stimulated phosphoprotein) ist das bisher einzig bekannte Zytoskelettprotein, das direkt an ActA binden kann. Es konnte gezeigt werden, dass dieses Protein als Ligand für Profilin, Vinculin und Zyxin fungiert. Es ist auf der Bakterienoberfläche an der Stelle lokalisiert, wo die ActA-Konzentration am größten ist und der Aktinschweif ausgebildet wird und vermittelt möglicherweise die Interaktion zwischen Profilin und ActA, die dann zur Schweifbildung führt (38, 130, 153, 209, 217). Allerdings sind weder Profilin noch VASP essentiell für die Aktinnukleation, denn eine Deletion ihrer Bindungsmotive in der Prolin-reichen Repeat-

Region von ActA verhindert die listerielle Fortbewegung in der Wirtszelle nicht, sondern es kommt nur zu einer verlangsamten Ausbreitung der Bakterien (158, 195, 248).

Neuere Experimente zeigen, dass der N-Terminus von ActA mit dem Arp2/3-Komplex interagiert, was zu einer deutlichen Verstärkung der Aktinnukleation führt. Dieser Komplex ist ein essentieller Faktor der Wirtszelle, der für die Aktin-vermittelte Fortbewegung der Listerien benötigt wird. Die Hauptaufgabe von ActA ist vermutlich, die Aktivität dieses Multiproteinkomplexes zu regulieren und dadurch die Aktinpolymerisation zu vermitteln (173, 273).

Neben den oben beschriebenen Proteinen sind jedoch noch zahlreiche weitere Wirtszellfaktoren wie Cofilin, Gelsolin, α -Aktinin und LaXp180 an der intrazellulären Fortbewegung von *Listeria* beteiligt. Die genauen Aufgaben dieser Faktoren müssen aber noch geklärt werden (35, 48, 155, 173, 206, 260).

Auch bei *L. ivanovii* findet sich ein ActA-Protein (i-ActA) gleicher Funktion, das allerdings größer als ActA von *L. monocytogenes* ist und auch nur 34 % Identität zu diesem aufweist (98, 131, 145). Jedoch findet man bei ActA und i-ActA den gleichen Aufbau aus N-Terminus mit Signalpeptid, einer zentralen Region aus Prolin-reichen Repeats und einem C-terminalen Bereich mit Membrananker. Zudem sind die funktionellen Domänen, die für die Aktinrekrutierung und VASP-Bindung benötigt werden, konserviert (89).

Ebenso findet man in *L. seeligeri* ein zum *actA*-Gen von *L. monocytogenes* homologes Gen, jedoch ist diese apathogene Art nicht in der Lage, Säugeraktin zu polymerisieren (97, 133).

2.3.4 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.

Lecithinase (PC-PLC)

Die Lecithinase ist neben der schon beschriebenen PI-PLC (Kap. 2.3.2) eine weitere Phospholipase C von *L. monocytogenes*. Das *plcB*-Gen codiert ein 33 kDa schweres Proenzym (inaktive Form) und weist Homologien zu den Phosphatidylcholin-spezifischen Phospholipasen C (PC-PLC) von *Bacillus cereus* und *Clostridium perfringens* auf (165, 259). Die PC-PLC von *L. monocytogenes* besitzt ein breites Wirkungsspektrum und hydrolysiert nicht nur Phosphatidylcholin (Lecithin), sondern auch Phosphatidylserin (PS), Phosphatidylethanolamin (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 (88, 94, 259).

Das Enzym wird als inaktives Proenzym (33 kDa) sekretiert, um Schäden an bakteriellen Membranen zu vermeiden. Durch eine listerielle Metalloprotease wird die Lecithinase dann in die aktive Form (29 kDa) überführt (88, 194, 212, 216).

Die Tatsache, dass Hly⁻ Mutanten von *L. monocytogenes* trotz fehlendem Listeriolysin aus dem Phagosom entkommen und in bestimmten Epithelzellen wachsen konnten, ließ vermuten, dass es außer LLO noch weitere Membran-aktive Proteine gibt, die an der Lyse des primären Phagosoms beteiligt sind (178, 210). Zu diesen Proteinen zählt vermutlich auch die Lecithinase. Untersuchungen an Insertionsmutanten im *plcB*-Gen zeigten zudem, dass diese Mutanten in ihrer Virulenz verringert waren und sich nicht mehr in benachbarte Zellen ausbreiten konnten. Man konnte nach Infektion von J774-Zellen eine Anhäufung von Bakterien in Vesikeln mit Doppelmembran beobachten. Beim eventuellen Entkommen aus dem primären Phagosom waren sie allerdings nicht vom Wildtyp zu unterscheiden (259). Weitere Versuche ergaben, dass PlcB benötigt wird für die Zell-zu-Zell-Ausbreitung von Makrophagen in verschiedene Säugerzellen (104) und essentiell ist für die Verbreitung von *L. monocytogenes* im Gehirn von infizierten Mäusen (235).

Die Lecithinase scheint somit 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.

Metalloprotease

Die Zink-abhängige Metalloprotease von *L. monocytogenes* ist ein 57,4 kDa schweres Enzym und wird vom Gen *mpl* codiert. Sie besitzt eine N-terminale Signalsequenz und weist große Homologien zu sekretierten Metalloproteasen anderer Bakterien auf. Im Kulturüberstand findet man ein 60 kDa großes *mpl*-Produkt, das wahrscheinlich eine inaktive Proform der Protease darstellt (55, 183).

Mutanten mit Transposoninsertion im *mpl*-Gen waren gekennzeichnet durch reduzierte Virulenz und eine geringere Lecithinaseproduktion. Im Kulturüberstand dieser Bakterien fand man nur noch die 33 kDa-Proform des Lecithinasepolypeptids. Dies legte die Vermutung nahe, dass die Metalloprotease für die Reifung der PC-PLC benötigt wird und diese erst nach proteolytischer Spaltung der inaktiven 33 kDa-Form in das aktive 29 kDa-Enzym überführt (183, 216). Durch Komplementationsversuche konnte diese Annahme bestätigt werden. Bei Einführung eines rekombinanten Plasmids, das das gesamte *mpl*-Gen enthielt, konnte in den oben erwähnten Mutanten der Lecithinase-Phänotyp wiederhergestellt und die aktive 29 kDa-Form der PC-PLC im Kulturüberstand nachgewiesen werden (212).

So ist die Zn-abhängige Metalloprotease zumindest durch ihre Wirkung auf die Lecithinase an der Virulenz von *L. monocytogenes* beteiligt.

Bei der tierpathogenen Art *Listeria ivanovii* wurden zu den Virulenzgenen von *L. monocytogenes* homologe Sequenzen nachgewiesen und auch in *L. seeligeri* finden sich viele dieser Gene wieder (97, 107, 108, 145).

Es ist aber unklar, warum *L. ivanovii* trotz der vorhandenen Virulenzfaktoren nur für Tiere pathogen und *L. seeligeri* sogar apathogen ist (Kap. 2.4).

2.4 Genetische Organisation und Evolution der Virulenzdeterminanten

Für die erfolgreiche Invasion, das Überleben innerhalb der eukaryotischen Wirtszelle und die Ausbreitung im infizierten Organismus benötigt *L. monocytogenes* eine Reihe von Virulenzfaktoren (Abb. 2.2), die größtenteils in einem Virulenzgencluster (Abb. 2.4) angeordnet sind (211). Die koordinierte Expression dieser Virulenz-assoziierten Gene wird durch den positiven Regulationsfaktor PrfA kontrolliert, der selbst Bestandteil des Clusters ist (37).

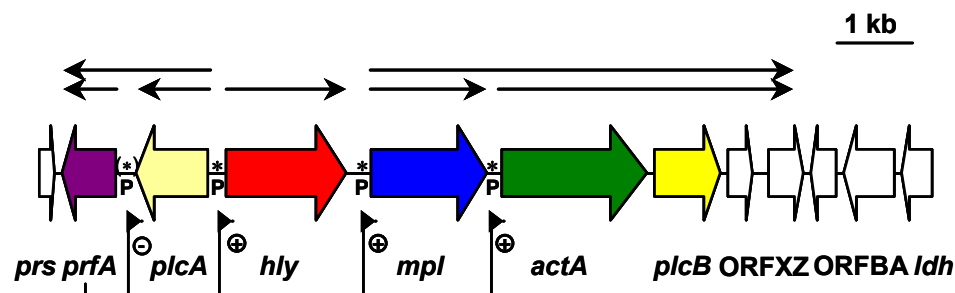


Abb. 2.4: Das Virulenzgencluster von *L. monocytogenes* (LIPI-1)

Farbige Pfeile stellen die in Kap. 2.3 beschriebenen Virulenzgene dar. Über den jeweiligen Genen sind die zugehörigen Transkripte in Form von schwarzen Pfeilen gezeigt.

prs: Gen für Phosphoribosyl-Pyrophosphat-Synthetase

plcA: codiert für die Phosphatidylinositol-spezifische Phospholipase C (PI-PLC)

hly: Listeriolysin O (LLO)-Gen

mpl: Metalloprotease-Gen

actA: codiert für das Oberflächenprotein ActA (beteiligt an Aktinpolymerisation)

plcB: Gen für Lecithinase, Phospholipase C (PC-PLC)

ORFXZ, ORFBA: Open Reading Frames unbekannter Funktion

ldh: Lactatdehydrogenase-Gen

P: Promotor; * PrfA-Box im Promotor-Bereich vorhanden

Die meisten Virulenzgene von *L. monocytogenes* befinden sich in einer 9,6 kb großen, chromosomalen Region, dem sog. Virulenzgencluster. Dieser Bereich 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 (183, 259). Da dieses Virulenzgencluster eine kompakte genetische Einheit ist und Merkmale einer Pathogenitätsinsel besitzt, wird es mittlerweile als *Listeria* Pathogenitätsinsel 1 (LIPI-1) bezeichnet (148, 261). Dieser gesamte Bereich wird von zwei Haushaltsgenen flankiert: stromaufwärts von *prfA* liegt das Gen *prs*, das für eine Phosphoribosyl-Pyrophosphat-Synthetase codiert, stromabwärts vom Lecithinase-Operon wird eine Lactatdehydrogenase vom Gen *ldh* codiert.

Neben den im Virulenzgencluster befindlichen Genen werden noch weitere listerielle Gene durch PrfA reguliert. Hierzu zählen unter anderem diverse Internalingene, die jedoch in anderen Bereichen des Chromosoms liegen.

Die transkriptionelle Organisation der PrfA-kontrollierten Gene sieht wie folgt aus (37, 184): Die Transkription von *plcA* erfolgt entweder monocistronisch oder zusammen mit *prfA* bicistronisch. 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 (58). 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* (15, 74, 76, 184).

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 (61, 67, 171).

Das Gen für das kleine Internalin *inlC* wird als monocistronische mRNA von einem PrfA-abhängigen Promotor und möglicherweise auch PrfA-unabhängig transkribiert, wobei die InlC-Synthese bei Wachstum in MEM induziert wird (59, 67).

Die Regulation des *iap*-Gens erfolgt im Gegensatz zu den oben erwähnten listeriellen Virulenzfaktoren nicht durch PrfA, sondern posttranskriptionell durch einen bisher unbekanntem Mechanismus (27, 141).

Phylogenetische Studien basierend auf 16S und 23S rRNA haben gezeigt, dass die Gattung *Listeria* aufgrund ihrer Evolution in zwei Gruppen eingeteilt werden kann (Abb. 2.5). In der einen Gruppe findet man nur *L. grayi*, in der anderen sind die restlichen *Listeria*-Arten zusammengefasst. Die zweite Gruppe kann wiederum in zwei Abstammungslinien eingeteilt werden, von denen eine *L. monocytogenes* und die nah verwandte, nicht pathogene Art *L. innocua* enthält, die andere *L. ivanovii* und die apathogenen Arten *L. seeligeri* und *L. welshimeri* (40, 230, 260).

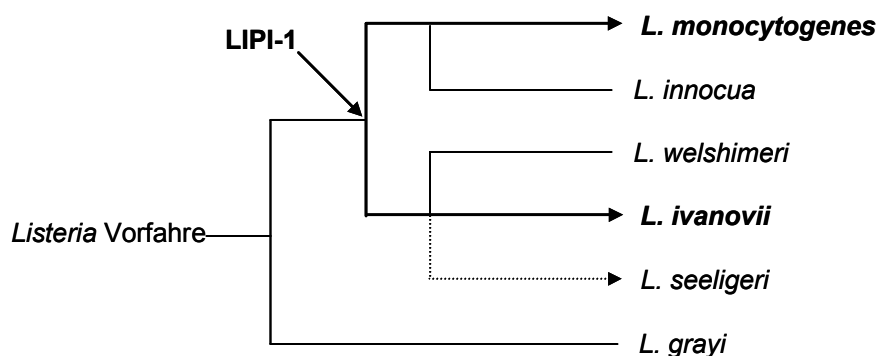


Abb. 2.5: Evolution des Virulenzgenclusters (LIPI-1) in *Listeria* spp.
(nach Vázquez-Boland, et al. [260])

Dicke Linien stellen die Evolutionswege von LIPI-1 dar; Pfeile weisen auf Konservierung einer funktionstüchtigen LIPI-1 in *L. monocytogenes* und *L. ivanovii* hin; der gestrichelte Pfeil kennzeichnet ein funktionsloses Virulenzgencluster in *L. seeligeri*. *L. innocua* und *L. welshimeri* sind vermutlich durch Verlust von LIPI-1 entstanden (vgl. Abb. 2.6).

Die Art *L. ivanovii*, die einen zu *L. monocytogenes* ähnlichen intrazellulären Infektionszyklus aufzeigt, besitzt ein zu LIPI-1 ähnliches Virulenzgencluster. Die Gene des Virulenzgenclusters sind in *L. ivanovii* in gleicher Lage und Anordnung zu finden (Abb. 2.6), jedoch zeigen DNA-Homologievergleiche nur einen Identitätsgrad von 73 – 78 % (97, 146, 261). Zudem findet man in *L. ivanovii* für das Protein ActA ein wesentlich größeres Gen (*LiactA*) als in *L. monocytogenes* (98, 145). Die Regulation erfolgt auch hier über den positiven Transkriptionsregulator PrfA (156, 167).

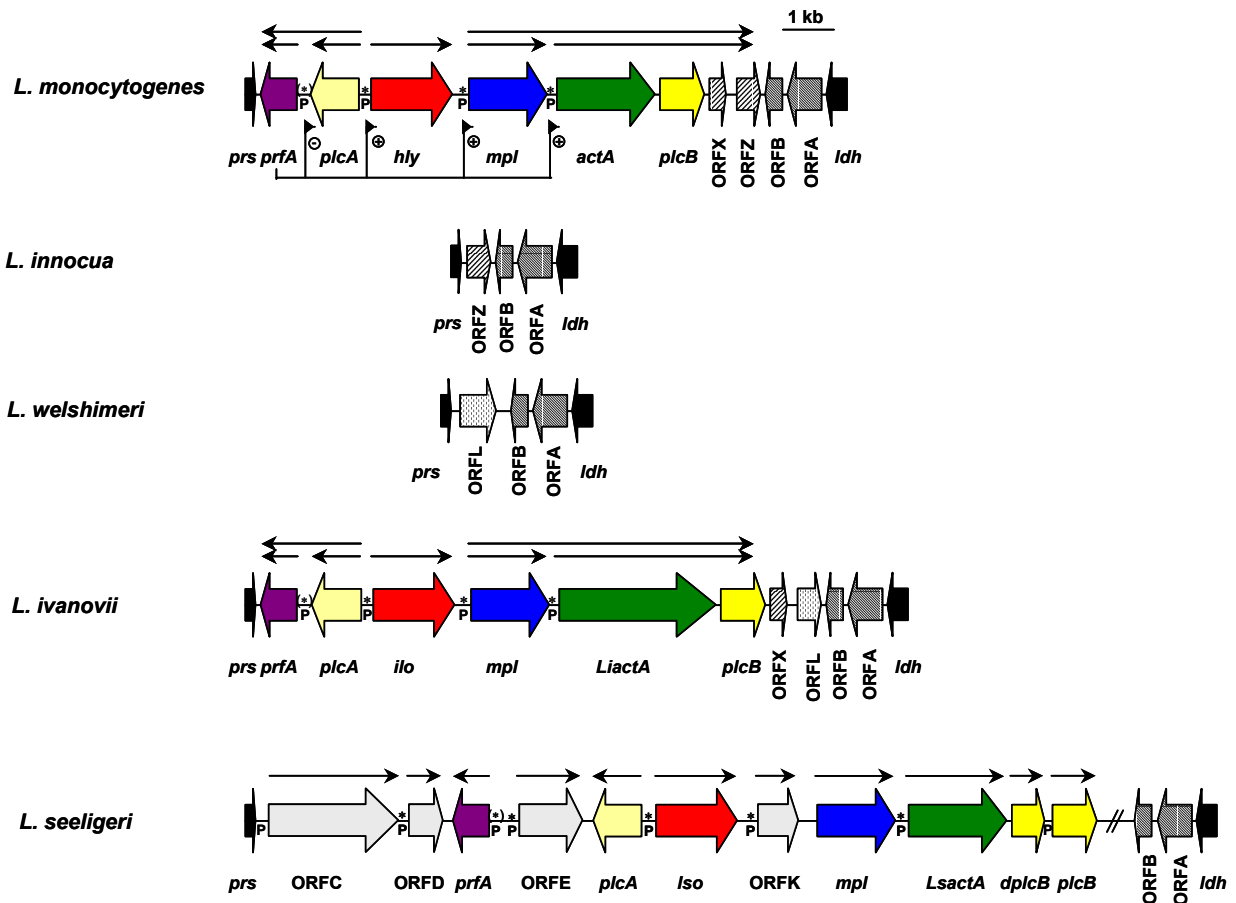


Abb. 2.6: Aufbau des Virulenzgenclusters (LIPI-1) von *L. monocytogenes* und Struktur des Locus in anderen *Listeria*-Arten

(nach Kreft et al. [146, 148], Vázquez-Boland et al. [260])

Die zu LIPI-1 zählenden Virulenzgene sind farbig dargestellt. Zusätzlich findet man jedoch noch einige Open Reading Frames unbekannter Funktion (ORFX, Z, L, B, A) auf der rechten Seite des Virulenzgenclusters von *L. monocytogenes* bzw. *L. ivanovii*. Auch bei den apathogenen Arten *L. innocua* und *L. welshimeri* sind diese ORFs teilweise zu finden, was darauf schließen lässt, dass LIPI-1 auch in diesen Arten vorhanden war und im Laufe der Evolution deletiert wurde. *L. seeligeri* nimmt eine Sonderstellung ein, da sich hier in einer apathogenen *Listeria*-Art alle Virulenzgene wiederfinden (siehe auch Text).

In den nicht pathogenen *Listeria*-Arten ist LIPI-1 bis auf eine Ausnahme nicht vorhanden. Bei der apathogenen Art *L. seeligeri* konnte ein zu dem Virulenzgencluster von *L. monocytogenes* und *L. ivanovii* homologer Bereich nachgewiesen werden, der von den Haushaltsgenen *prs* und *ldh* begrenzt wird (Abb. 2.6, [97, 146, 261]). Obwohl die Gene in intakter Form vorliegen, werden sie aufgrund diverser Insertionen nicht effizient transkribiert (97). Zwischen *plcA* und *prfA* liegt ein Open Reading Frame (ORF E), das in entgegengesetzter Richtung zu *plcA* und *prfA* transkribiert wird und so eine bicistronische Transkription von *prfA* zusammen mit *plcA* verhindert, die bei *L. monocytogenes* und *L. ivanovii* zu einer

effizienten Aktivierung der Virulenzgentranskription führt (133, 146, 157). Zudem findet man zwei weitere ORFs (ORF C und D) sowie Duplikationen der *plcA*- und *plcB*-Gene (ORF K bzw. *dplcB*, [146, 261]).

Das Virulenzgencluster von *Listeria* spp. wurde als Pathogenitätsinsel bezeichnet (146, 148, 261). Pathogenitätsinseln (PAIs) zeichnen sich nach einer Definition von Hacker et al. (110, 111) durch mehrere charakteristische Merkmale aus: Sie tragen Virulenzgene, oft sogar viele und sind nur in pathogenen Stämmen einer Art vorhanden. In weniger pathogenen Stämmen treten sie nur sporadisch auf und fehlen in apathogenen Vertretern einer Art völlig. Zudem unterscheidet sich der G+C-Gehalt oft im Vergleich zur DNA des restlichen Genoms des Bakteriums. Oft handelt es sich bei PAIs um große chromosomale Regionen, die häufig größer als 30 kb sind. Sie repräsentieren kompakte genetische Einheiten, die oft von Direct Repeats flankiert sind und tRNA-Gene und/oder Insertionssequenz (IS)-Elemente an ihren Grenzen aufweisen. Häufig sind "Mobilitäts"-Gene wie IS-Elemente, Integrasen, Transposasen oder Origins of plasmid replication vorhanden. Ein weiteres wichtiges Merkmal ist die Instabilität dieser genetischen Regionen und es kann zu Verlust der Pathogenitätsinsel durch Deletion kommen.

Der Insertionsort von LIPI-1 in *L. monocytogenes*, *L. ivanovii* und *L. seeligeri* ist in diesen drei Arten an gleicher Position im Genom zu finden, weist aber keine Spuren von Mobilitäts-elementen (Integrasen, Transposasen, Insertionssequenzen) und Integrations-signalen (Direct Repeats, tRNA-Gene) auf. Zudem weicht der G+C-Gehalt nicht von dem des restlichen Genoms ab. Dies deutet darauf hin, dass LIPI-1 schon vor langer Zeit durch einen *Listeria*-Vorfahre erworben wurde oder sich in der Gattung entwickelte (146, 261).

Als weitere Virulenzdeterminanten sind die Internaline von *L. monocytogenes* anzusehen, deren Gene bis auf *inlC* und *inlF* in Clustern von zwei oder mehreren Genen angeordnet sind und in gleicher Richtung transkribiert werden (Abb. 2.3). Auch in *L. ivanovii* findet man mehrere Internalingene, die zu zweit (*i-inlC* und *i-inlD*) oder zu mehreren (*i-inlE*, *F*, *G*) im Genom vorliegen. Mittlerweile konnte von G. Domínguez-Bernal eine große Pathogenitätsinsel (LIPI-2) charakterisiert werden, die zehn Internalingene trägt und spezifisch für *L. ivanovii* ist (Kap. 5.3, [60]). Auch auf die Internalinloci treffen einige Merkmale von Pathogenitätsinseln zu. So konnte für einzelne Internalingene nachgewiesen werden, dass sie Virulenz-assoziiert sind. Zudem konnten in *L. ivanovii* in den an die Internalincluster angrenzenden Bereichen tRNA-Gene identifiziert werden und für LIPI-2 schließlich erhielt man mehrere spontane Deletionsmutanten mit verringerter Virulenz (60, 68, 96). Da alle Internalingene repetitive DNA-Sequenzen besitzen, die bevorzugte Orte der Rekombination sind, ist die Diversität dieser Internalingene vermutlich auf Genduplikationen und intra- und intergenische Rearrangements zurückzuführen. So findet man zum Beispiel in zwei *L. monocytogenes* Stämmen am gleichen Genort unterschiedliche Internalingene (*inlG/C2/D/E* bzw. *inlG/H/E*), wobei das Gen *inlH* vermutlich durch Rekombination des 5'-Endes von *inlC2* und dem 3'-Ende von *inlD* entstanden ist (Abb. 2.3, [146, 215]). Außerdem konnte in *L. ivanovii* gezeigt werden, dass das Gen für das kleine Internalin *i-inlD* vermutlich durch Duplikation des benachbarten Gens *i-inlC* entstanden ist (68).

Somit stellen die Internalinloci weitere interessante Genombereiche dar, deren evolutiver Ursprung jedoch noch aufgeklärt werden muss.

2.5 Regulation der Virulenzgenexpression

Durch Untersuchungen an avirulenten Mutanten, die intakte, aber nicht transkribierte Virulenzgene besitzen, wurde ein DNA-Bereich in unmittelbarer Nähe des Virulenzgenclusters charakterisiert, der die Expression einer Reihe von Virulenz-assoziierten Genen kontrolliert (37, 184). Dieses pleiotrope Regulatorprotein, das als positiver Transkriptionsfaktor PrfA bezeichnet wird, ist ein 27,1 kDa schweres Protein und wird vom im Virulenzgencluster liegenden Gen *prfA* codiert (37, 167, 184). PrfA weist signifikante Homologien zur Crp-Fnr-Familie von globalen Transkriptionsregulatoren auf (119, 156) und ist ein site-spezifisches DNA-Bindungsprotein mit putativem Helix-Turn-Helix-Motiv (74, 75, 244).

PrfA ist der bisher einzige in *Listeria* spp. identifizierte Regulator, der direkt an der Kontrolle der Virulenzclustergene beteiligt ist. Zudem konnte für etliche Gene der kleinen Internaline (*inlC* von *L. monocytogenes*, *i-inlE* von *L. ivanovii*) gezeigt werden, dass diese strikt PrfA-abhängig sind. Andere Internalingene wie das *inlAB*-Operon werden nur partiell von PrfA reguliert (61, 67, 146, 171, 222). Auf der anderen Seite gibt es aber auch Virulenzgene, die völlig unabhängig von PrfA exprimiert werden (z.B. *smcL*, *iap*) und auch eine negative Regulation durch PrfA wurde schon beschrieben (95, 224). Somit scheint PrfA eine Rolle bei der globalen Regulation in *L. monocytogenes* zu spielen (260).

Auch in *L. ivanovii* und *L. seeligeri* existieren zu PrfA von *L. monocytogenes* homologe Proteine, die bis zu 80 % Identität zum *L. monocytogenes*-PrfA aufweisen. In *L. ivanovii* findet eine mit *L. monocytogenes* vergleichbare Regulation der Virulenzclustergene statt, in *L. seeligeri* jedoch werden die Virulenzgene nicht exprimiert. Untersuchungen in *L. seeligeri* haben gezeigt, dass nur eine äußerst schwache Transkription von *prfA* stattfindet, was eine Ursache für die mangelnde Virulenzgenexpression darstellen könnte. Denn bei Komplementation von *L. seeligeri* mit dem bicistronisch transkribierten *plcA-prfA* aus *L. monocytogenes* kommt es zu einer Transkriptionsaktivierung des *prfA*-Gens von *L. seeligeri* und damit zu einer messbaren Synthese von Virulenzfaktoren. So konnte in diesen komplementierten Bakterien eine verstärkte Seeligerolysinsynthese und dadurch bewirktes Entkommen aus dem Phagosom von Darmepithelzellen und Makrophagen beobachtet werden (133, 157). Somit ist die Avirulenz von *L. seeligeri* wahrscheinlich auf die Insertion eines Open Reading Frames (ORF E) zwischen *plcA* und *prfA* zurückzuführen. Diese Insertion verhindert so eine effiziente *prfA*-Transkription und dadurch auch die Expression der restlichen PrfA-abhängigen Virulenzclustergene (147).

Die von PrfA regulierten Virulenzgene besitzen in der -35-Region ihrer Promotoren eine 14 bp große konservierte, palindromische DNA-Sequenz, die sog. PrfA-Box (5'-TTAACA NN TGTTAA mit NN = AA, TT-3'), die essentiell für die Erkennung durch das Regulatorprotein ist (57, 75, 182, 259). In DNA-Footprinting Experimenten konnte gezeigt werden, dass PrfA in vitro an die PrfA-Box bindet (52). Es finden sich allerdings leichte Abweichungen in der Konsensussequenz. Die PrfA-Boxen der Gene *hly* und *plcA* entsprechen dem oben beschriebenen Palindrom, bei den Genen *actA* und *mpl* sieht man einen, bei *prfA*, *inlA* und *inlC* zwei Basenaustausche (Tab. 2.1).

Gen	PrfA-Box (mismatches)	-10-Box
<i>prfA</i>	a TAACA AT TGTT g T (2)	TATTTT
<i>plcA</i>	TTAACA AA TGTTAA (0)	TAAGAT
<i>hly</i>	TTAACA TT TGTTAA (0)	TAGAAT
<i>mpl</i>	TTAACA AA TGT a AA (1)	TATAAT
<i>actA</i>	TTAACA AA TGTT a g (1)	GATAAT
<i>plcB</i>	-	-
<i>inlA</i>	a TAACA TA a GTAA (2)	TATTAT
<i>inlC</i>	TTAAC g c T TGTTAA (2)	TAACAT

Tab. 2.1: Promotorregionen der PrfA-regulierten Virulenzgene in *L. monocytogenes*

(nach Kreft et al. [147])

Abweichungen von der Konsensussequenz der PrfA-Box sind mit kleinen Buchstaben in Fettdruck dargestellt. In Klammern ist die Zahl der Abweichungen (mismatches) angegeben.

Durch Bindung an diese Zielsequenz und direkte Interaktion mit der RNA-Polymerase aktiviert PrfA die Expression der Virulenzgene. 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 unterschiedliche Bindungsstärke von PrfA eine zeitliche Aktivierung von Virulenzgenen erfolgen. Gene mit hoher Affinität der Promotoren (z.B. *hly* und *plcB*) werden schon bei niedrigen PrfA-Konzentrationen aktiviert, Promotoren mit geringer Affinität (z.B. *mpl* und *actA*) benötigen jedoch eine größere Menge an PrfA (15, 29, 74, 75, 76, 182, 222, 243, 268).

Mittlerweile wurde ein Modell aufgestellt, wie die Regulation über PrfA ablaufen könnte (147). Hier geht man davon aus, dass PrfA in zwei Zuständen vorliegen kann (funktionell inaktiv und aktiv) und von dem einen in den anderen Zustand durch Bindung eines bisher unbekanntes Cofaktors überführt werden kann. Dieser Cofaktor scheint die aus der Umwelt erhaltenen Signale zu übermitteln und so die Regulation der Virulenzgene über PrfA zu beeinflussen (222, 260, 262). Zudem ist in diesem Modell PrfA ständig, wenn auch nur in geringen Mengen im Zytoplasma der Bakterien vorhanden.

prfA bildet zusammen mit *plcA* das *plcA-prfA*-Operon und wird entweder konstitutiv von seinem eigenen Promotor aus oder bicistronisch zusammen mit *plcA* über dessen Promotor cotranskribiert. PrfA stimuliert als positiver Regulator die Transkription von *plcA* und fördert somit durch die Cotranskription mit *plcA* seine eigene Synthese (Autoregulation) (169, 184). Die Expression des *prfA*-Gens erfolgt von drei Promotoren aus. Die Promotoren P1 und P2 befinden sich in der intergenischen Region zwischen *plcA* und *prfA* und sind trotz unterschiedlicher Regulation in vivo redundant. Weitere Transkription erfolgt über den *plcA*-Promotor durch die Bildung der bicistronischen *plcA-prfA*-mRNA (34, 75, 76, 184, 218, 219, 262).

Liegt nun kein Cofaktor vor, ist PrfA inaktiv und wird über die konstitutiven Promotoren P1 und P2 in der intergenischen Region zwischen *plcA* und *prfA* schwach transkribiert und es ist nur eine geringe Menge an PrfA-Protein vorhanden. Erhält *L. monocytogenes* nun ein Signal aus der Umwelt, steigt die Konzentration an intrazellulärem Cofaktor und führt zu einer Aktivierung von PrfA. PrfA kann nun mit erhöhter Affinität an die PrfA-Boxen in PrfA-

regulierten Promotoren binden und induziert die Transkription der PrfA-abhängigen Virulenzgene. Zudem wird mittels des vermehrt gebildeten bicistronischen *plcA-prfA*-Transkripts durch positive Autoregulation auch mehr PrfA-Protein gebildet, das wiederum die Synthese der Virulenzgene verstärkt. Diese Transkriptionsaktivierung findet so lange statt, so lange der Cofaktor im bakteriellen Zytoplasma vorhanden ist und kann aber schnell inaktiviert werden, wenn die geeigneten Umweltsignale (und damit der Cofaktor) fehlen (260, 262).

Neben der PrfA-abhängigen Regulation der Virulenzgene scheinen noch weitere Faktoren beteiligt zu sein, die PrfA unter intrazellulären Bedingungen aktivieren (16). Hierzu zählt der Proteinfaktor Paf (PrfA-activating factor), der bei niedriger Eisenkonzentration im Medium durch die Bindung an PrfA dessen Bindungsaffinität erhöht (12, 13, 52).

Es konnte gezeigt werden, dass es zu einer verstärkten Synthese von PrfA-regulierten Proteinen unter Stressbedingungen wie Hitzeschock und Nährstoffmangel kommt. Bei Überführen einer Listerienkultur von BHI- in Zellkulturmedium (MEM) konnten mindestens zwölf Proteine induziert werden, wobei neben den bekannten Virulenzfaktoren fünf weitere Oberflächen-assoziierte Proteine mit bisher unbekannter Funktion nachgewiesen wurden (250). Zudem führte der Austausch einer Aminosäure (Gly→Ser) im Codon 145 zu einer konstitutiven Überexpression aller PrfA-abhängigen Virulenzclustergene und macht das Virulenzregulon unempfindlich gegenüber einer Vielzahl von Umweltsignalen (222). Dieses mutierte PrfA* besitzt eine höhere Bindungsaffinität für spezifische Ziel-DNA-Sequenzen und erhöht daneben die Fähigkeit des PrfA-RNA-Polymerase-Komplexes, die Transkription *in vitro* zu initiieren (260, 262).

Da die Expression der Virulenzgene bei Wachstum in der Natur, dem natürlichen Habitat von *L. monocytogenes*, nicht essentiell ist, und eine Transkription dieser Gene erst bei Infektion eines geeigneten Wirts nötig ist, besitzt dieses Bakterium Mechanismen, um die Genexpression den gegebenen Umweltbedingungen anzupassen. Verschiedene Faktoren können die Transkription von *prfA* und den PrfA-abhängigen Virulenzgenen beeinflussen:

Temperatur ist einer der Umwelteinflüsse, der in *L. monocytogenes* die Expression von *prfA* induzieren kann. So findet man bei 30°C (Temperatur in Natur) nur eine schwache Transkription der PrfA-abhängigen Virulenzgene. Bei 37°C (Körpertemperatur des Säugerwirts) hingegen wird die Expression dieser Gene aktiviert. Der genaue Mechanismus dieser Regulation ist jedoch noch nicht bekannt (169). Auch das Nährstoffangebot beeinflusst die Genexpression von *L. monocytogenes*. So findet in dem Vollmedium BHI bei 37°C nur eine schwache Transkription der Virulenzgene statt verglichen mit einem BHI-Medium, das mit Aktivkohle versetzt wurde. Hier kommt es zu normalem Wachstum der Bakterien, die Expression der Virulenzgene ist aber stark erhöht (221, 222, 223, 224). Eine ähnliche Induktion kann auch beobachtet werden, wenn in BHI-Medium gewachsene Listerien in das Zellkulturmedium MEM transferiert werden. Hier findet allerdings kein Wachstum der Bakterien statt, die Transkription der Virulenzgene ist jedoch verstärkt (15, 250).

Somit besitzt *L. monocytogenes* komplexe Regulationsmechanismen, um auf Umweltreize reagieren zu können und kann die Expression seiner Virulenzgene über die Regulation von PrfA an die gegebenen Umstände anpassen.

Zielsetzung

L. ivanovii zeigt bei Kultur auf Blutagar einen deutlich von *L. monocytogenes* abweichenden hämolytischen Phänotyp. Während bei *L. monocytogenes* nur eine schwache Hämolyse - verursacht durch das im Virulenzgencluster codierte Hämolysin Listeriolysin - zu detektieren ist, findet man bei *L. ivanovii* einen starken Lysishof. Die starke Hämolyse bei *L. ivanovii* wird bewirkt durch ein zusätzliches Zytolysin, eine Sphingomyelinase C (SMase, [142, 258]), die außer bei *L. ivanovii* in keiner anderen *Listeria*-Art zu finden ist (95).

Im Gegensatz hierzu zeigt die *L. ivanovii*-Mutante 44/2 nur eine schwache hämolytische Aktivität. Dieser Stamm wurde bei der Suche nach phänotypisch veränderten Klonen einer Mutantenbank identifiziert, die durch Insertion des Transposons Tn1545 hergestellt wurde (234). Die Mutante ist avirulent im Mausmodell (Kreft, unveröffentlicht) und besitzt keine Sphingomyelinase-Aktivität mehr (143). Untersuchungen des spanischen Kooperationspartners in Madrid zeigten dann später, dass die Sphingomyelinase-Defizienz jedoch nicht auf einer Insertion von Tn1545 in dem betreffenden Gen beruht. Vielmehr liegt in 44/2 eine spontane Deletion eines größeren Chromosomenabschnitts vor, der neben dem Sphingomyelinase-Gen *smcL* unter anderem die Gene für die beiden kleinen sekretierten Internaline *i-inlE* und *i-inlF* umfasst.

In Madrid konnten durch G. Domínguez-Bernal aus der Arbeitsgruppe von J.-A. Vázquez-Boland noch weitere spontane Mutanten desselben Typs isoliert werden, die ohne vorherige Transposonmutagenese entstanden sind. Hierzu wurde *L. ivanovii* ATCC19119 unter verschiedenen Wachstumsbedingungen kultiviert und auf veränderten hämolytischen Phänotyp hin untersucht (60).

So wurde *L. ivanovii* z.B. in BHI-Medium bei einer suboptimalen Wachstumstemperatur (30°C) inkubiert und nach Übergang in die stationäre Phase (d.h. alle 12 Stunden) wiederholt subkultiviert. Durch diese Wachstumsbedingungen konnte die *L. ivanovii*-Deletionsmutante GD-1 erhalten werden.

Ein weiterer Ansatz wurde in BHI-Medium für einen Monat in der stationären Phase unter extremem Temperaturstress (41,5°C) kultiviert, was die Mutante GD-3 lieferte.

Der in den genannten Mutanten spontan deletierte Chromosomenabschnitt wurde zunächst *smcL*-Locus genannt. Er weist eindeutig einige Eigenschaften einer Pathogenitätsinsel auf:

- Er enthält Virulenz-assoziierte Gene, denn wie oben erwähnt, konnte bei der Transposonmutante 44/2 gezeigt werden, dass diese aufgrund einer Deletion avirulent geworden war. Auch eine Deletion von *i-inlE* oder/und *i-inlF* führte zu völliger Avirulenz von *L. ivanovii* im Mausmodell.
- Er ist nur in einer pathogenen Art, nämlich bei *L. ivanovii* zu finden. Das *smcL*-Gen konnte mittels Southern Blot nicht bei den anderen *Listeria*-Arten nachgewiesen werden und ist auch nicht in der Genomsequenz von *L. monocytogenes* EGDe zu finden.
- Die Region, die das Sphingomyelinase-Gen beinhaltet, ist instabil, was am Auftreten verschiedener spontaner Deletionsmutanten deutlich wird.

Dieses interessante und reproduzierbare Deletionsereignis, sowie die davon betroffenen Gene, sollte in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von J.-A. Vázquez-Boland genauer untersucht werden. Zunächst sollten die Grenzen der Deletion charakterisiert werden, um nach für Pathogenitätsinseln typischen Strukturen wie Direct Repeats, tRNA-Genen, Insertions- (IS-) Elementen und "Mobilitäts"-Genen wie Integrasen oder Transposasen zu suchen. Anschließend sollte der gesamte deletierte Bereich der möglichen Pathogenitätsinsel sequenziert werden, um die darauf liegenden Gene charakterisieren und eventuell neue Virulenz-assoziierte Gene auffinden zu können.

Mögliche neu identifizierte Gene sollten nachfolgend mit Hilfe der Methode der RT-PCR unter verschiedenen Kulturbedingungen untersucht werden, um Aufschlüsse über die Transkription und Regulation dieser Gene zu erhalten.

Ferner sollte ein neues genetisches Markierungssystem entwickelt werden, um die Deletionshäufigkeit des in dieser Arbeit charakterisierten Bereichs genauer bestimmen zu können.

3 Material

3.1 Geräte

Autoklaven	Webeco
Begasungsbrutschränke	Heraeus
Brutschränke	Heraeus, Memmert
Densitometer	Hirschmann
Elektrophoresekammern	Institutswerkstatt
Elektroporationsgerät	Bio-Rad Gene Pulser
Feinwaage	Sartorius
Grobwaage	Sartorius
Heizblock	Liebisch
Klettphotometer	Summerson
Kühlzentrifuge	Heraeus Sepatech Minifuge RF, Beckmann J 2-21
Magnetrührer	Gerhardt
Mikroskope	Zeiss, Leitz
Mikrowellengerät	Siemens
Minizentrifuge	Hettich Mikroliter, Heraeus Sepatech Biofuge 15
Netzgerät	Consort E455
PCR-Gerät	Techne Progene
pH-Meter	WTW pH 523 Metrohm-Herisau
Photometer (DNA/RNA)	Pharmacia Biotech Genequant II
Photometer (opt. Dichte)	Pharmacia LKB Ultrospec III
RNA-FastPrep	FastPrep FP 120 Shaker Bio Savant
Schüttelinkubatoren	HT Infors AG
Speedvac-Konzentrator	Eppendorf Concentrator 5301
Sterilbänke	Heraeus
UV-Fotoanlage	Mitsubishi
Vortex	Scientific Industries Vortex Genie 2
Wasserbad	GFL
Zählkammer	Neubauer improved
Zentrifugationsrotoren	Beckmann JA 20

3.2 Verbrauchsmaterial

Chemikalien

Die benötigten Chemikalien wurden von den Firmen Boehringer, Difco, Gibco-BRL, Merck, Oxoid, Roth, Serva und Sigma bezogen.

Enzyme

Die verwendeten Enzyme stammten von den Firmen Amersham, Appligene, Biozym, Boehringer, Gibco-BRL, New England Biolabs, MBI-Fermentas, Pharmacia, Promega, Roche, Silverstar, Stratagene und Takara.

Zellkulturmaterial

Die Zellkulturmedien wurden von der Firma Gibco-BRL bezogen.

Steriles Einwegmaterial stammte von den Firmen Falcon, Greiner, Millipore und Sarstedt.

Trypsin aus Rinderpankreas lieferte die Firma Gibco.

3.3 Medien und Agarplatten

Die Medien bzw. Agarplatten werden nach den aufgeführten Rezepten zusammengestellt und autoklaviert (20 min. bei 120°C). Nach dem Abkühlen auf unter 50°C werden Zusätze wie Antibiotika oder X-Gal/IPTG steril zugesetzt und die Agarplatten gegossen.

LB-Medium:

Bacto-Pepton	10,0 g
Hefeextrakt	5,0 g
NaCl	10,0 g
<hr/>	
ad 1000 ml H ₂ O _{dest.}	

LB-Agar: Auf 1000 ml LB-Medium werden 15,0 g Agar zugesetzt.

LB-Platten mit X-Gal/IPTG: Nach dem Autoklavieren werden 50,0 mg IPTG in 2 ml X-Gal (2% in DMFA) gelöst und bei einer Agartemperatur unter 50°C steril zugegeben.

BHI (brain heart infusion broth medium): BHI 37,0 g
ad 1000 ml H₂O_{dest.}

BHI-Agar: Auf 1000 ml BHI-Medium werden 15,0 g Agar zugesetzt.

Gradientenplatten

Wenn keine genaue Angabe vorhanden ist, welche Antibiotikumkonzentration die zu untersuchenden Bakterien noch tolerieren, so kann man dies durch sog. Gradientenplatten testen. Hierzu werden zunächst je 10 ml Agar mit Antibiotikum in Petrischalen gegossen und diese zum Erkalten schräg aufgestellt, so dass der Boden der Schalen am einen Ende gerade noch mit Agar bedeckt ist. Nach dem Erstarren dieser Schicht werden nochmals je 10 ml Agar ohne Antibiotikum in die Petrischale gegossen und diese ohne Schräglage bis zum Erkalten bei Raumtemperatur inkubiert. Dadurch, dass das Antibiotikum nach dem Erstarren auch in die Schicht ohne Antibiotikum diffundiert, entstehen Platten mit einem gleichmäßigen Antibiotikumgradienten (Abb. 3.1):

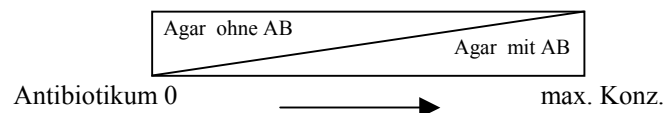


Abb. 3.1: Aufbau einer Gradientenplatte

Auf diese Platten werden nun die zu testenden Bakterien linienförmig entlang des Gradienten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nachfolgenden Tag kann anhand des Wachstums der Bakterien die Antibiotikumkonzentration bestimmt werden, die die Bakterien gerade noch tolerieren.

3.4 Antibiotika

Antibiotika werden entweder in Ethanol und/oder H₂O_{dest} gelöst. Antibiotika, die ausschließlich in H₂O_{dest} aufgenommen werden, müssen steril filtriert werden. Die Antibiotikallösungen werden bei -20°C gelagert.

Antibiotikum	Stammlösung	Endkonz.	Selektion
Ampicillin	100 mg/ml in H ₂ O _{steril}	100 µg/ml	<i>E. coli</i>
Chloramphenicol	30 mg/ml in 100 % EtOH	30 µg/ml 5 µg/ml	<i>E. coli</i> <i>Listeria spp.</i>
Erythromycin	100 mg/ml in 100 % EtOH	400 µg/ml 5 µg/ml	<i>E. coli</i> <i>Listeria spp.</i>
Gentamycin	50 mg/ml in H ₂ O _{steril}	15 µg/ml 10-100 µg/ml	<i>Listeria spp.</i> (bei Zellkulturversuchen)
Kanamycin	50 mg/ml in H ₂ O _{steril}	80 µg/ml 25 µg/ml	<i>E. coli</i> <i>Listeria spp.</i>
Penicillin G	5 mg/ml in H ₂ O _{steril}	10 µg/ml	kompetente <i>Listeria spp.</i>

Tab. 3.1: Verwendete Antibiotika und eingesetzte Konzentrationen

3.5 Zelllinien

Die Infektionssays wurden in folgenden permanenten Zelllinien durchgeführt:

MDBK	Epithelzellen (Rind)
TIB-73	Hepatozyten (embryonale Maus)
J774	Makrophagen (Maus)

ATCC: American Type Culture Collection, USA

3.6 Plasmide

pBR322 Ω -Km2: pBR322-Derivat mit Ω -Km2 (*aphA-3-Km^R*-Gen aus Tn1545, flankiert von DNA-Sequenzen, die für Transkriptions- und Translationsterminatoren codieren), kloniert in die *EcoRI*-site von pBR322

Herkunft Ω -Km2 J. Perez-Casal (205)

pCR[®]-2.1-TOPO: Klonierungsplasmid (3,9 kb); pUC18-Derivat; MCS im *lacZ α* -Fragment
f1 origin, ColE1 origin; *Amp^R* und *Km^R*

Hybridisierungsstelle für Reverse und Universal Primer

Herkunft Invitrogen (TOPO TA-Klonierungskit)

pG⁺host4: Mutageneseplasmid (~ 3,8 kb); pGK12-Derivat; MCS aus pBluescript
(pVE6004) gram⁺, temperatursensitiver Origin aus pVE6002 (bei 28°C aktiv, über 37,5°C inaktiv); *Em^R* aus pE194

"broad host range" in gram⁺ Bakterien; kann auch in *E. coli* replizieren

Bindungsstelle für Bluescript T3 und Universe Primer

Herkunft E. Maguin, "Institut National de la Recherche Agronomique", Frankreich (176, 177)

pWH354: Konstrukt (6516 bp) zur Untersuchung der induzierbaren Expression von Fremdgenen in *B. subtilis*
ori pBR322, ori pUB110; *Km^R*; *Cm^R* aus pC194

trägt *Tn10*-codierten *tet*-Operator und *tetR*-Gen zur Kontrolle der Transkription und zwei *xyl/tet*-Fusionspromotoren vor dem *Cm*-Gen, um eine starke *tet*-regulierte *Cm*-Expression zu erhalten

Herkunft W. Hillen, Erlangen (115)

pWH1509E: Mutageneseplasmid (6885 bp)

ori pBR322, temperatursensitiver Origin aus pE194; *Em^R*, *Amp^R* und *Tc^R*

Herkunft W. Hillen, Erlangen (115)

pWH1509K: Mutageneseplasmid (6811 bp)

ori pBR322, temperatursensitiver Origin aus pE194; *Km^R*, *Amp^R* und *Tc^R*

Herkunft W. Hillen, Erlangen (115)

3.7 Bakterienstämme

Escherichia coli DH5 α : *F⁻, end A1, hsdR 17, supE44, thi-1, rec A1, gyr A96, rel A1*
Herkunft Bethesda Res. Lab. (BRL)

Escherichia coli K12 5K: *r_k⁻ m_k⁺, thi, leu, hsr, hsm, lac*

Escherichia coli TG: *repA⁺, Kan^R, sup E Δ hsd-5 thi Δ (lac-proAB)*
F' [traD36 pro AB⁺ lacI^q lacZ Δ M15]
Herkunft E. Maguin, Ph. D., "Institut National de la Recherche Agronomique",
Frankreich (176, 177)

Escherichia coli TOP10: aus OneShotTM-Transformations-Kit des TOPO TA Cloning[®]-Kits (Invitrogen); für
blau/weiß-Screening ohne IPTG
*F' mcrA Δ (mrr⁻ hsd RMS⁻ mcrBC) Φ 80 lacZ Δ M15 Δ lacX74 recA1 araD139 Δ (ara-
leu) 7697 galU galK rpsL (Str^R) endA1 nupG*

Listeria innocua CLIP11262: durch das Institute Pasteur, Paris sequenzierter *L. innocua*-Stamm;
Genomsequenz zugänglich unter <http://genolist.pasteur.fr/ListiList>

Listeria ivanovii ATCC 19119: Typstamm
hämolysisch, Sphingomyelinase⁺, Lecithinase⁺, *prfA⁺, ilo⁺, plcA⁺, liactA⁺*
Herkunft American Type Culture Collection (ATCC), USA

Listeria ivanovii GD-3: veränderter hämolysischer Phänotyp, Sphingomyelinase⁻, *i-inlE⁻, i-inlF⁻*
Herkunft Dissertation G. Domínguez-Bernal (60), "Colección del Grupo de Patogenesis
Molecular Bacteriana", Veterinärmedizinisches Institut der Universität Madrid

Listeria ivanovii P-24: hämolysisch, Phänotyp siehe *L. ivanovii* ATCC 19119
klinisches Isolat
Herkunft Neuseeland

Listeria ivanovii P-55: hämolysisch, Phänotyp siehe *L. ivanovii* ATCC 19119
klinisches Isolat, Spanien
Herkunft J.-A. Vázquez-Boland, "Colección del Grupo de Patogenesis Molecular
Bacteriana", Veterinärmedizinisches Institut der Universität Madrid

Listeria ivanovii PDC22: *L. ivanovii* ATCC 19119 Δ *prfA*
Herkunft Dissertation Robert Lampidis (157)

Listeria ivanovii subsp. londoniensis: Phänotyp siehe *L. ivanovii* ATCC 19119
Herkunft J.-A. Vázquez-Boland, "Colección del Grupo de Patogenesis
Molecular Bacteriana", Veterinärmedizinisches Institut der Universität
Madrid

Listeria monocytogenes Sv 1/2a EGDe: schwach hämolysisch (Hly^{+/-}); pathogen
Herkunft Hahn, Berlin
für das "Listeria Genome Sequencing Project" verwendeter
Ausgangsstamm, Genomsequenz verfügbar unter
<http://genolist.pasteur.fr/ListiList>

Listeria seeligeri SLCC 3954: Herkunft Seeliger *Listeria* Culture Collection
J.-A. Vázquez-Boland, Madrid

Listeria welshimeri SLCC 5334: Typstamm, Serovar 6a
Herkunft Seeliger *Listeria* Culture Collection
J.-A. Vázquez-Boland, Madrid

3.8 Oligonukleotide

Oligonukleotid	Sequenz 5'→3'-Richtung	Gen/Bezugssequenz
3'tet NruI<	AGC GAG AAG AAT CAT AAT GG	pWH-Konstrukte, pWH
5'tet HindIII>	TGT TTG ACA GCT TAT CAT CG	pWH-Konstrukte, pWH
91-1	AAG TGT TGT GGG TGA AGG	<i>yxkD L. monocytogenes</i>
91-2	AGT CTG TGA CGA TTA TTT CG	<i>yxkD L. monocytogenes</i>
92-1	TAA GTA TGT AGA CAT AAG	<i>yxkD L. monocytogenes</i>
92-2	AAC TTG ATA TAG TTC TGC	<i>yxkD L. monocytogenes</i>
AP1	GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG C	Genome Walking Kit
AP2	ACT ATA GGG CAC GCG TGG T	Genome Walking Kit
ark4 890	TGC GTC ACC TTC AAC ACA C	ORF9C <i>L. ivanovii</i>
ark4 1528	TGA ATG GGA TAA GAT GGT G	ORF9B <i>L. ivanovii</i>
ark5 807	AAT TTC GAC CGA CTA TCA T	ORF9 <i>L. ivanovii</i>
ark5 1749	TGC AGA CCA GTT GAC ATT G	ORF9A <i>L. ivanovii</i>
Bluescript T3	AAT TAA CCC TCA CTA AAG GG	MCS pBluescript
CATC	ATA GGC CTA ATG ACT GGC	pWH-/pGHost-Konstrukte, <i>xyI</i> tet-cat
CATC1	ATG GCT CGA TTG GCT CGA GAA G	pWH-/pGHost-Konstrukte, <i>xyI</i> tet-cat
CATN	TTT TCT CTT CCA ATT GTC	pWH-/pGHost-Konstrukte, <i>xyI</i> tet-cat
CO3	CGC GGA TGA ATT CGA TAA G	<i>hly L. monocytogenes</i>
CO4	GTC ATA CCC GGG AAA TCA ATG	<i>hly L. monocytogenes</i>
CORF3	ACC TTT CCA AGT CGT TTT ACT G	ORF3 <i>L. ivanovii</i>
CORF3*	ACC AAA TCC GAC TTT ATG C	ORF3 <i>L. monocytogenes, L. innocua</i>
CORF3*rev	GCA TAA AGT CGG ATT TGG T	ORF3 <i>L. monocytogenes, L. innocua</i>
CORF4	CTT AAG CCT CGT GTC GGC GC	<i>ydel L. ivanovii</i>
CORF4.1	TGA TTT GCC TTG CAG CTT GCA CAT TTT CGG	<i>ydel L. ivanovii</i>
CORF4.1/rev	CCG AAA ATG TGC AAG CTG CAA GGC AAA TCA	<i>ydel L. ivanovii</i>
Eco-SM1	GTT GGG ATA AAA CGG AAG GAA	<i>smcL L. ivanovii</i>
ED-4	TCG AAT TGG GAT TGG GTT ATC	<i>norA L. ivanovii</i>
ED-4.3	AAA TCT TTG ATG TGA AGG GC	<i>norA L. ivanovii</i>
ED-4.4	TTT TCT GTC TCA GCA GCG TG	ORF10 <i>L. ivanovii</i>
ED-5	AAG GTT GCT GGC ATG GAA AG	ORF8 <i>L. ivanovii</i>
ED-5.1	TTC CAA CGA CCG TAC CTT TC	<i>rnaH L. ivanovii</i>
ED-5.2	AGT TAC TTT ATA GAG TGG AC	ORF8/9 <i>L. ivanovii</i>
ED-5.3	TCA ATG AAA TAT CTC ACC TG	ORF8/9 <i>L. ivanovii</i>
ED-6	ACA CGA TTT CTT CCT CTT CG	ORF9/9A <i>L. ivanovii</i>
ED-6.1	TGT GCT AAA GAA GGA GAA GC	ORF9/9A <i>L. ivanovii</i>
ED-7	TGC CAA AAT ACT ACT AGT ACC	ORF9C <i>L. ivanovii</i>
ED-7.1	ACG GTT TTA TGA TGA TCA TGG	ORF9C <i>L. ivanovii</i>
Em3	AGG TGT AT TTC GTA ACT GCC	Em ^R pHPS9,...
FI-4	TCT ACT TTA CTC TCA GG	ORF3 <i>L. monocytogenes, L. innocua</i>
G-1	AAG CTG GCT AGA TTT GAC TTG	<i>iinlG L. ivanovii</i>
G-2	AAG CCC TTC AAG AGA TTT GAC	<i>iinlG L. ivanovii</i>
GD3-1	ATC ACA AAC AGG AAG TGG	<i>rnaH L. ivanovii</i>
GD3-2	ACC AGC TAC ATC TGT TGC	<i>rnaH L. ivanovii</i>
hly1	ATG AAA AAA ATA ATG CTA G	<i>hly L. monocytogenes</i>
hly2	AAA TGT TGA ATT GAG CAA C	<i>hly L. monocytogenes</i>
hly/HindIII	TTC CAT CTG TAT AAG CTT TTG AAG	<i>hly L. monocytogenes</i>
hly/NruI	AGT CTA CCA ATT TCG CGA CAA AC	<i>hly L. monocytogenes</i>
hly/XhoI	AGT TGC AAG CGC CTC GAG TGA ATG C	<i>hly L. monocytogenes</i>
hly/Xho2	TGG CAA ATC AAT CTC GAG TGT TA	<i>hly L. monocytogenes</i>
iap-C	AAC AGT TGG AGC AGG GGC AGG	<i>iap L. ivanovii</i>
i-inlC-C	TTT CCC CAA CGC TTA TAT ACT C	<i>iinlC L. ivanovii</i>
i-inlC-N	GAA GTA TTG TGG CGC TTG GC	<i>iinlC L. ivanovii</i>
i-inlD-C	TCC TTG GCA ATT TTC TAA TGC C	<i>iinlD L. ivanovii</i>
i-inlD-N	AGA TAT TAG TTC GCT TGT TCA TG	<i>iinlD L. ivanovii</i>
i-inlE-C	GTG TCA ATG GCT GTT TCA CC	<i>iinlE L. ivanovii</i>
i-inlE-N	GGA ACT AGA TAG CGT ACA AGG	<i>iinlE L. ivanovii</i>
iinlE-N/rev	CCT TGT ACG CTA TCT AGT TCC	<i>iinlE L. ivanovii</i>
iinlF3	TCG TAT TTA ATG GTG TGG TTA TC	<i>iinlF L. ivanovii</i>
i-inlF-C	ATA ACC ACA CCA TTA AAT ACG AC	<i>iinlF L. ivanovii</i>
iinlG-N	ATG AAA ACT AGC ATA GTT ACA AC	<i>iinlG L. ivanovii</i>
i-inlG/smcL-1	ACA AAT GAT AGC ATT AGA GGG C	<i>iinlG/smcL L. ivanovii</i>
i-inlG/smcL-2	ACT TAA GCC CTC TAA TGC TAT C	<i>iinlG/smcL L. ivanovii</i>
iinlH1	TAA ATA TTA GCA CAA AAA CCT ACC	<i>iinlH L. ivanovii</i>
iinlH2	TTA ACC AAA CTT TAC CAG CAG C	<i>iinlH L. ivanovii</i>
i-inlH/G-1	AGA GAA TTG TGC ACA GTG GC	<i>iinlH/G L. ivanovii</i>
i-inlH/G-2	AGC CAC TGT GCA CAA TTC TC	<i>iinlH/G L. ivanovii</i>
i-inlH/G-3	TGT GAT ACC AAC CGG AAA GG	<i>iinlH/G L. ivanovii</i>
iinlI2	ATG TTG GTA AAA CAC GTA CCA C	<i>iinlI L. ivanovii</i>
iinlK1	AGT AAT AAC TAT TAC TGA AAC TGC	<i>iinlK L. ivanovii</i>

iinL1	ACG ATG ATT AAC AAG ACT GTG C	<i>iinL L. ivanovii</i>
iinL2	ATA AAG CCA CAG ACT CCA GC	<i>iinL L. ivanovii</i>
ilo1	ATG AAA AAA ATA ATG CTA C	<i>ilo L. ivanovii</i>
ilo2	TAA CAT TGA ATC TCG CAA C	<i>ilo L. ivanovii</i>
ilo-C	TCT CGC AAC ATA GGC ACC GG	<i>ilo L. ivanovii</i>
ilo/HindIII	TTC CAT CCG AGT AAG CTT TAG AAG	<i>ilo L. ivanovii</i>
ilo-N	AAA CTT GCA AGC GCT GGG CG	<i>ilo L. ivanovii</i>
ilo/NruI	AGT TTA CCG TTA TCG CGA GAA GC	<i>ilo L. ivanovii</i>
ilo/XhoI	ACT TGC AAG CGC CTC GAG TAA ATG C	<i>ilo L. ivanovii</i>
ilo/Xho2	AGG CAA ATC AAT CTC GAG TGT AA	<i>ilo L. ivanovii</i>
Ino2	ACT AGC ACT CCA GTT GTT AAA C	<i>iap L. innocua</i>
inter9/10-1	TTG GCA TAA CGG CTG CTA AC	ORF9B <i>L. ivanovii</i>
iva 1	CTA CTC AAG CGC AAG CGG CAC	<i>iap L. ivanovii</i>
Li-inlC	AAA AAA GGT TAA CAG AG	<i>iinlC L. ivanovii</i>
Li-inlC1	TAA GTA TAC AAA GGG AC	<i>iinlC L. ivanovii</i>
Li-inlD	GGA TAT GAA AGT AGT TAA G	<i>iinlD L. ivanovii</i>
Li-inlDK	CAC TTT TAT TAA CGG CG	<i>iinlD L. ivanovii</i>
Li-inlDN	TTC GCT TGT TCA TGT ACC G	<i>iinlD L. ivanovii</i>
Li-inlE	AGA GAA ATT TTC AGA AAG G	<i>iinlE L. ivanovii</i>
Li-inlE1	AGA AGT GCT ATT TTT AG	<i>iinlE L. ivanovii</i>
Li-inlF	GTG GAT ATT TAG TTA GG	<i>iinlF L. ivanovii</i>
Li-inlFK	AAA CCC TTA AAA AGA GC	<i>iinlF L. ivanovii</i>
Li-inlG	TTT AAA GGA (GC)TA AGA TC	<i>iinlC, D, F L. ivanovii</i>
Li-inlG1	TTC AAT GGA GTA ATA TC	<i>iinlE L. ivanovii</i>
LIP12-0	ATC ATT CTG TGG TAC GTG	<i>ydel/ORF5 L. ivanovii</i>
LIP12-0K	TGG TGC ATC ACA AAA ACC	ORF6 <i>L. ivanovii</i>
LIP12-1.1	AAC GGA GCG CAT ATC GAA GC	ORF6 <i>L. ivanovii</i>
LIP12-1.2	TGA ACA TAG CGC ATT TCG	ORF6 <i>L. ivanovii</i>
LIP12-2.1	CCA CCA GTC AAT TCA TTT GC	ORF7 <i>L. ivanovii</i>
LIP12-3	ACG CAT TAA AGC TGC AGC AAT TTA TGG GC	<i>rnaH L. ivanovii</i>
LIP12-3K	AAT CTT GCA TTT CCT CTG GC	<i>rnaH L. ivanovii</i>
LIP12-4	TAC TGG TCG CGC GGG AAA CAG TGG AAA AGC	<i>rnaH L. ivanovii</i>
LIP12-4.1	TAA AAG TGG CAA ATC GCG	<i>rnaH L. ivanovii</i>
LIP12-4K	AGC ACA GCT GGT CCT TTA CC	<i>rnaH L. ivanovii</i>
LIP12-5	AGG ACC AGC TGT GCT TGA AAT GAT GCG	<i>rnaH L. ivanovii</i>
LIP12-5.1	AAG CTC GTG GCG AAA AGC TG	<i>rnaH L. ivanovii</i>
LIP12-5K	TCT AGC CAA TAA GTG CAG	ORF8 <i>L. ivanovii</i>
LIP12-5K.1	AGC ACA AAT ACC AGC ATC CG	ORF8/9 <i>L. ivanovii</i>
LIP12-6	CCT GAG AAA GAG AAA AGC TTG TTG CGA G	ORF9A <i>L. ivanovii</i>
LIP12-6K	TAC CGC AGC GAT ACT TCC	ORF9A <i>L. ivanovii</i>
LIP12-7	ATT TTG CGC CTA CGA CCA TAA ACA CG	ORF8/9 <i>L. ivanovii</i>
LIP12-7.1	ACT AAA ACG CGG ATG CTG G	ORF8/9 <i>L. ivanovii</i>
LIP12-7K	TTC CTA ACA GTG ATA GGG	ORF9/9A <i>L. ivanovii</i>
LIP12-7K.1	TGG TGG AAC TCT TCT AGG	ORF9/9A <i>L. ivanovii</i>
LIP12-9	TCA TAC GCG GTG AAT ATC G	ORF9A <i>L. ivanovii</i>
LIP12-10	TGG AAC GAC AAT ACA TGA TGG	<i>norA L. ivanovii</i>
LIP12-11	ATA CAT GAT GGA TTT CGC CC	<i>norA L. ivanovii</i>
LIP12-12	TGA TGG ATT TCG CCC ATA ATA TAA GAC C	<i>norA L. ivanovii</i>
LIP12-13	ATA AAA CTT TTC ACA GTC CAA G	<i>norA L. ivanovii</i>
LIP12-14	ACG ATT GAC GCT ACT CGC AG	downst. ORF11 <i>L. ivanovii</i>
LIP12-17	AGA CAT AAG AAT CTT CCA GTC C	ORF11 <i>L. ivanovii</i>
LIP12-18	TAA AGC TCA GCA CTG GTC TG	ORF11 <i>L. ivanovii</i>
LIP12-19	ATT GGG TGC AAT CTG TAC GC	downst. ORF11 <i>L. ivanovii</i>
LIPUR5	ATT TGA AAC TCG AGA GCG TTT AGC TGC C	<i>purH L. ivanovii</i>
LIPUR6	GCT AAA CGC TCT CGA GTT TCA AAT GTT G	<i>purH L. ivanovii</i>
Lis1B	TTA TAC GCG ACC GAA GCC AA	<i>iap Listeria</i>
LSPRC	AAC TGC TGA GCT ATG AGC	<i>prfA L. seeligeri</i>
LSPRN	TAT TTC TGC ATG AAG GGG	<i>prfA L. seeligeri</i>
Lsyde1	AGA ATC TTT AAA ATG TGG AAG CC	Genome Walking <i>ysnB-ydel L. seeligeri</i>
Lsyde2	AAA CTG CCA AAA CAC GGC ACT CC	Genome Walking <i>ysnB-ydel L. seeligeri</i>
Lsysn1	TGT TAC AGT TAC TGG ATA CGT C	Genome Walking <i>ysnB-ydel L. seeligeri</i>
Lsysn2	ATT CGA ATT CCA AAT GAC GAA GGC	Genome Walking <i>ysnB-ydel L. seeligeri</i>
Lwyde1	AGG TCA CAC AT GAA AGA AAT TC	Genome Walking <i>ysnB-ydel L. welshimeri</i>
Lwyde2	TAT TAA AGC ATT GAT AGC GTG AG	Genome Walking <i>ysnB-ydel L. welshimeri</i>
Lwysn1	TGG AGG TAA AGG AAA TGG CTT GG	Genome Walking <i>ysnB-ydel L. welshimeri</i>
Lwysn2	ATT CCA ATA ATG GCT GTT CCA GC	Genome Walking <i>ysnB-ydel L. welshimeri</i>
M13 Forward	GTT TTC CCA GTC ACG AC	TOPO TA-Vektor
M13 Reverse	CAG GAA ACA GCT ATG AC	TOPO TA-Vektor
MonoA	CAA ACT GCT AAC ACA GCT ACT	<i>iap L. monocytogenes</i>
MonoB	GCA CTT GAA TTG CTG TTA TTG	<i>iap L. monocytogenes</i>
mpl-C1	TTT TTT CTG TAA TTT TTA TTT GAT TA	<i>mpl L. monocytogenes</i>
mpl-C2	GAC CGA TGG CTT CAA ATG C	<i>mpl L. monocytogenes, L. ivanovii</i>
mpl-C3	ACT TCC GGC TCA GCA AAA AT	<i>mpl L. monocytogenes</i>

mpl-N	TGT AAA GGT AAA AGC GGA CTC TG	<i>mpl L. ivanovii</i>
norA-1	GAG GAA TGT GAG TAC ACT GG	<i>norA L. ivanovii</i>
norA-2	ATC GGG ACT TTA CTT GCC AG	<i>norA L. ivanovii</i>
norA-3	CTT AAA ACT CGC TGA CGT CC	<i>norA L. ivanovii</i>
norA-N	CAG TGT ACT CAC ATT CCT CG	<i>norA L. ivanovii</i>
norA-N2	TTA CTT ATA TAT GCC GAC CAT TG	<i>norA L. ivanovii</i>
norA-N3	AGA TAA ACA ACA AAG TTA ATC AAT G	<i>norA L. ivanovii</i>
NORF3	ATG TCT ACC AAT AGC AAG GC	ORF3 <i>L. ivanovii</i>
NORF3*	ATT CGA CTA TTG GGA AGT	ORF3 <i>L. monocytogenes, L. innocua</i>
NORF3*rev	ACT TCC CAA TAG TCG AAT	ORF3 <i>L. monocytogenes, L. innocua</i>
NORF4	CGA AGT AGA AGC TGC AGG TC	<i>ydeI L. ivanovii</i>
omega-1	CGG TTT ACA AGC ATA AAG C	pWH-/pGHost-Konstrukte, Ω Km
omega-1/rev	GCT TTA TGC TTG TAA ACC G	pWH-/pGHost-Konstrukte, Ω Km
omega-1rev/Bam	GCT TTA TGC TTG GAT CTC G	pWH-/pGHost-Konstrukte, Ω Km
omega-1rev/Bam*	GCT TTA TGC TTG GGA TCC G	pWH-/pGHost-Konstrukte, Ω Km
ORF5/6	AGT TAC TCC AGG ATG GTA GAC	ORF5/6 <i>L. ivanovii</i>
ORF5-C	TGC CAA CCA ATA CCA AAG CG	ORF5 <i>L. ivanovii</i>
ORF5-C1	TGG CAT GAT GAC TGT ACC AC	ORF5 <i>L. ivanovii</i>
ORF5-N	TGA CTT TCC GGA CAC AAT CC	ORF5 <i>L. ivanovii</i>
ORF5-N1	TCG AGG AGG AGT TCC AAT GG	ORF5 <i>L. ivanovii</i>
ORF6-C	TCG ATA TGC GCT CCG TTC TC	ORF6 <i>L. ivanovii</i>
ORF6-C2	AAT TGC GCA CAT GCT GCT CC	ORF6 <i>L. ivanovii</i>
ORF6-N	TTG TGA TGC ACC ACT GAC AG	ORF6 <i>L. ivanovii</i>
ORF6-N2	TCA AGG TTT TTG TGA TGC ACC	ORF6 <i>L. ivanovii</i>
ORF7-N	ATA CCA TAT TTG TTC CCC TAG G	ORF7 <i>L. ivanovii</i>
ORF7-N2	AAG CCC CCA AAA CAA GGA GG	ORF7 <i>L. ivanovii</i>
ORF8-C	AAA TCT CCT TGT TTG GTG ATG C	ORF8 <i>L. ivanovii</i>
ORF9A-N	TTG CTT TAA TAC CTG CAA TTG C	ORF9A <i>L. ivanovii</i>
ORF9B-N	ACT AAC TCT AAG GTG CTA TGC	ORF9B <i>L. ivanovii</i>
ORF9-C	TGA GGT ACT TAC CTA GGC AC	ORF9 <i>L. ivanovii</i>
ORF9-C2	TTT TCA TGA TAG TCG GTC GAA A	ORF9 <i>L. ivanovii</i>
ORF9-C3	GAA GGC ATA CTT GAT TTT AAG AAA A	ORF9 <i>L. ivanovii</i>
ORF9C-C	ACA GTT CTT GTA TCG GAC TAT C	ORF9C <i>L. ivanovii</i>
ORF9-N	ACA AAC AAG TCC GTG GAT GG	ORF9 <i>L. ivanovii</i>
ORF9-N2	CCA TTC CAA CTT CCC ATC CA	ORF9 <i>L. ivanovii</i>
ORF9-N3	TGG ATG GGA AGT TGG AAT GG	ORF9 <i>L. ivanovii</i>
ORF10-C	TGG TAA AGT AGT TTG CTT GCC	ORF10 <i>L. ivanovii</i>
ORF10-C2	TTG CTT GCC ATC TAC TAA TTA AAT	ORF10 <i>L. ivanovii</i>
ORF10-N	TTA TTA TTA GTT ACA GCA GCA GG	ORF10 <i>L. ivanovii</i>
ORF10-N2	ACG ATA TAT CCT GCT GCT GTA	ORF10 <i>L. ivanovii</i>
ORF10-N3	ATA AAT TAT TAT TAG TTA CAG CAG C	ORF10 <i>L. ivanovii</i>
ORF11-N	ATT ATG ACA TAC TTG ATA ACT ACG	ORF11 <i>L. ivanovii</i>
P60REV	GTT ACT TTA AGG CAT GCA TTA TAC GCG ACC GAA	<i>iap L. ivanovii</i>
PI-5	TCT GAC CCA ACA TCC GTA CTA	<i>iinI G L. ivanovii</i>
PI-9	CAC TGC TCA ATT AGT TCG CTT	<i>iinI G L. ivanovii</i>
PI-10	TTC TGT TAG ACT TGC TGC TGG	<i>iinI H L. ivanovii</i>
PI-12	AAC AAC TCT TCT AAT TTA GTG	<i>iinI L. ivanovii</i>
PI-17	TCC ATT GCA TCT AAA GTT TCC	<i>iinI J L. ivanovii</i>
PI-22	TGT GGC GTG TTT GAA CAC AAG	<i>iinI J L. ivanovii</i>
PI-26	CAG ATA AGA GCG TTA GTG GAC	<i>iinI J L. ivanovii</i>
PI-30	ACT TTA TCA TAG TGC TCG GTG	<i>iinI B L. ivanovii</i>
PI-32	AGG AAC ACT TTC AGT TTA TGC	<i>iinI B L. ivanovii</i>
PI-36	TAA GGA GTG AAG CGC AGT GAG	<i>iinI L. ivanovii</i>
PI-45	GCA TTA CCT CTT TCA ACT CTC	<i>iinI K L. ivanovii</i>
PI-47	TCA CAT CTA TGG AAG GAG TGC	<i>iinI L. ivanovii</i>
PI-50.1	AGC AGT GAA CCT AAG TAC GAG	<i>iinI B2 L. ivanovii</i>
PI-57	CCA GAT TAA TGG ACT TAT ATC C	<i>iinI B2 L. ivanovii</i>
PI-62	GTT TGG TTG ATA TAC AAC TGG	<i>iinI L. ivanovii</i>
PI-66	CCG TAT CCA ATG CCA ATT AGT	<i>iinI K L. ivanovii</i>
PI-66.1	ATT TGC TAA AGC TCG ATC TGG	<i>iinI K L. ivanovii</i>
PI-72	ATT TAT CAA GTT TAC TTA AAC TC	<i>iinI B2 L. ivanovii</i>
PI-81	CAA ACA/C GAA AAT GTG CAA GCT G	<i>ydeI L. ivanovii</i>
PI-82	TTC ATG GAC CGA GAT GAC AAC G	<i>ysnB L. ivanovii</i>
PI-X	GTG TTA CAG AGG TTG TTT CAC	<i>iinI H L. ivanovii</i>
plcA-bi	TGT AGG AGT ACG AGG ACT TGG C	<i>plcA L. ivanovii</i>
plcA-C	AAG TCC TCG TAC TCC TAC AGC GG	<i>plcA L. ivanovii</i>
plcA-N	CCT ACA CTA AAA GAG CTC CGC GG	<i>plcA L. ivanovii</i>
plcB-C5	AAG CTG TAT TGA GCT TAT CCT C	<i>plcB L. ivanovii</i>
plcB-N	TCT CTG ATG AAA GTA AAT GCC TGC	<i>plcB L. ivanovii</i>
Poly- Ω	GAA TTC CCG GGG ATC CCG TG	Ω Km
prfA-bi	GAA ATC TGC TTG AGC GTC C	<i>prfA L. ivanovii</i>
prfA-C	GCT AAC AGC CGA ACA ATG TGC	<i>prfA L. ivanovii</i>

prfA-N	GTC TGG TTC CCT TGA TAC AGG	<i>prfA L. ivanovii</i>
PUR1	AGA CAC TTC ATC CCG GGA TTC ATG G	<i>purH L. monocytogenes, L. ivanovii</i>
PUR4	TTT ACT GCA ACT GAA GCT TGC TCC G	<i>purH L. monocytogenes</i>
PUR5	TTT TGA AAC TCG AGA ACG TCT AGC TGC G	<i>purH L. monocytogenes</i>
PUR6	GCT AGA CGT TCT CGA GTT TCA AAA GTAG	<i>purH L. monocytogenes</i>
PUR7	ATT CAC TAG CAA GCT TAA GGG CTG C	<i>purH L. monocytogenes, L. ivanovii</i>
PUR8	ACA TAT GGA (AT)GC TAT TGC	<i>purH L. monocytogenes, L. ivanovii</i>
PUR9	AAA (AG)GC TGC ATC TTG GTG	<i>purH L. monocytogenes, L. ivanovii</i>
PUR10	TTC CCG AAA TGC TTG ATG G	<i>purH L. monocytogenes</i>
PUR11	TTT CAT CCG CTT CAT AGG C	<i>purH L. monocytogenes</i>
pWH1	TTT GGG GTT ATT TAG GGG AG	pWH-Konstrukte, pWH
pWH2	TTT CTC CCC TAA ATA ACC CC	pWH-Konstrukte, pWH
pWH3	TTA ATA AAT TAA AGC GAG AG	pWH-Konstrukte, pWH
pWH4	TCG CTT TAA TTT ATT AAC CTC	pWH-Konstrukte, pWH
pWH5	ATA CTG ATA CAG AAG GTA GG	pWH-Konstrukte, pWH
pWH6	ACC TTC TGT ATC AGT ATC CC	pWH-Konstrukte, pWH
pWH7	ATA GGC GTA TCA CGA GGC CC	pWH-Konstrukte, pWH
pWH8	AAA GGG CCT CGT GAT ACG CC	pWH-Konstrukte, pWH
pWH9	AAT TTG AGC GTG TGG GAC AG	pWH-Konstrukte, pWH
pWH10	TCC CAC ACG CTC AAA TTT GG	pWH-Konstrukte, pWH
pWH/HindIII	AGC CTC GCG TCG GGG AAG CTT GGT G	pWH-Konstrukte, pWH
rnaH-C	CGT AAA GTA AAA GGT AGA C	<i>rnaH L. ivanovii</i>
rnaH-N	TTG TGG CAA AAT CAC AAA CAG G	<i>rnaH L. ivanovii</i>
rnaH-N2	TTC CTT TTG AAC AGG TGT CG	<i>rnaH L. ivanovii</i>
rnaH-N3	TTC ATG TCA GTC CTC ATT TCC	<i>rnaH L. ivanovii</i>
SACT 17	GAT TCA ATG ACT ACG CCA G	<i>actA L. ivanovii</i>
SACT 18	TAA TTT CCT CTT GCC CGA G	<i>actA L. ivanovii</i>
smc1	ATG GAA AAA TTT AAA ATT A	<i>smcL L. ivanovii</i>
Siwi2	TAA CTG AGG TAG C(AGT)A GCG AA	<i>iap L. ivanovii, L. seeligeri, L. welshimeri</i>
smc2	AAT AGG CCA CTG GCT AAC G	<i>smcL L. ivanovii</i>
smc2*	TCG TTG GAT CCC AAG TAG CC	<i>smcL L. ivanovii</i>
smc-C	AGC TAA CAT TTA AAA GCT TAA ACA TATC	<i>smcL L. ivanovii</i>
smc-C (neu)	ATC GAA TTA GTT GTG GGA TCC	<i>smcL L. ivanovii</i>
smc-N	TAT AAA AAC AAT ACC CGG GAT ATG CG	<i>smcL L. ivanovii</i>
smc/Xho1	ACG GAA GGA AAT TAC TCG AGT TTT GC	<i>smcL L. ivanovii</i>
smc/Xho2	TTC CAA AGC AAA ACT CGA GTA ATT TCC	<i>smcL L. ivanovii</i>
SOD-C	GTT CCC AAA CAT CTA AGC C	<i>sod L. mono., L. ivanovii, L. seeligeri</i>
SOD-N	CTT ATG ATG CTT TGG AGC CG	<i>sod L. mono., L. ivanovii, L. seeligeri</i>
SPM-S	GCC GGA GAG AGC TAA CAT TTA	<i>smcL L. ivanovii</i>
TETC	TTG AAT TGA TCA TAT GCG G	pWH-/pGHost-Konstrukte, <i>tetR</i>
TETN	ACA CTT TAT CAT TGA TAG AG	pWH-/pGHost-Konstrukte, <i>tetR</i>
TetR1	TTG ACA TTA TAT CAT TCA TAG ACT TAT TTG TC	pWH-/pGHost-Konstrukte, <i>tetR</i>
TetR2	AAA TAA GTC TAT GAA TGA TAT AAT GTC AAC AA	pWH-/pGHost-Konstrukte, <i>tetR</i>
TetR3	TTG ACA TTA TAT CAT TCA TAG ACT TAT TTG TCA AAC	pWH-/pGHost-Konstrukte, <i>tetR</i>
TetR4	AAA TAA GTC TAT GAA TGA TAT AAT GTC AAC AAA AAG	pWH-/pGHost-Konstrukte, <i>tetR</i>
TetR-C	AAT TCA TCG ATA ACT CGA GAT CTT GG	pWH-/pGHost-Konstrukte, <i>tetR</i>
TetR-C2	TCG AGA TCT TGG TTA CCG TG	<i>tetR</i>
TetR-N	AGT TTT TCA TGA ACT CGA GGG GAT CC	pWH-/pGHost-Konstrukte, <i>tetR</i>
TetR-N*	AGT TTT TCA TGA ACT CGA GGA GAT CTA AAT	pWH-/pGHost-Konstrukte, <i>tetR</i>
TetR-N2	AGG GGA TCC AAA TAA AAA ACT AG	<i>tetR</i>
TOPO T7	TAC GAC TCA CTA TAG GGC GA	TOPO TA-Vektor
UnilisA	GCT ACA GCT GGG ATT GCG GT	<i>iap Listeria</i>
Universe	GTA AAA CGA CGG CCA GT	MCS pBluescript
VBOT	CGT TCG CAT CGC CAT ATC GCG AAA ATG CCC TCG CGC ATC TCG AGG ATC CTA TTC GC	Vektorette
VBOT1	CGT TCG CAT CGC CAT ATC GCG AAA ATG CCC TCG CGC ATC TCG AG	Vektorette
VPRIM	GCC ATA TCG CGA AAA TGC CC	Vektorette
VTOP	GCG AAT AGG ATC CTC GAG ATG CGC GAT ACG TAA CGT AGC TCT ACA AGA TGC GAA CG	Vektorette
VTOP1	GAT CCT CGA GAT GCG CGA TAC GTA ACG TAG CTC TAC AAG ATG CGA ACG	Vektorette
xyltet	TTT GGA TCC CCT CGA GTT CAT G	pWH-/pGHost-Konstrukte, <i>xyltet-cat</i>
ydel-C3	AGG CGT TAA AGC TTC GAA TGC	<i>ydel L. ivanovii</i>
ydel-C4	TTT TGC AGC ACC AAA ACA ATC	<i>ydel L. ivanovii</i>
ydel-N	AAA CCA AGC AAC TGG CAA GC	<i>ydel L. ivanovii</i>
ydel-N2	TAA CAA GGT TTG CCC CAT TTG	<i>ydel L. ivanovii</i>
ysnB-C3	TAG TTC GTT GTC ATC TCG GTC	<i>ysnB L. ivanovii</i>
ysnB-C3/rev	GAC CGA GAT GAC AAC GAA CTA	<i>ysnB L. ivanovii</i>
ysnB-C4	ACC GAG ATG ACA ACG AAC TAA C	<i>ysnB L. ivanovii</i>
ysnB-N	AAT GAT TGG GTA GGT GAA GTA G	<i>ysnB L. ivanovii</i>

3.9 Molekulargewichtsstandard

1 kb-DNA-Ladder (Stratagene)

1 µg/Spur aufgetragen

Bande	[kb]	Bande	[kb]	Bande	[kb]
1	12	6	6	11	1,5
2	10	7	5	12	1,0
3	9	8	4	13	0,75
4	8	9	3	14	0,5
5	7	10	2	15	0,25

Gibco-BRL DNA-Marker (Gibco)

1 µg/Spur aufgetragen

Bande	[bp]	Bande	[bp]	Bande	[bp]	Bande	[bp]
1	9162	6	4072	11	506	16	201
2	8144	7	3054	12	396	17	154
3	7126	8	2036	13	344	18	134
4	6108	9	1636	14	298	19	75
5	5090	10	1018	15	220		

3.10 Kits

ABI PRISM™ Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Perkin Elmer)

Amersham GFX™ Micro Plasmid (Amersham)

DNA-free™ Kit (Ambion)

Expand™ High Fidelity PCR System (Boehringer Mannheim / Roche)

Expand™ Long Template PCR System (Boehringer Mannheim / Roche)

E.Z.N.A.® Bacterial RNA Kit (PEQLAB)

GeneAmp® XL PCR Kit (PE Applied Biosystems)

JETprep Plasmid DNA Isolation and Purification-Miniprep-System (Genomed)

LA PCR Kit (TaKaRa)

Nucleobond® AX Purification of Plasmids (Macherey-Nagel)

QIAquick™ Gel Extraction Kit (QIAGEN)

QIAquick™ PCR Purification Kit (QIAGEN)

Quantum Prep® Plasmid Miniprep Kit (BioRad)

RNeasy Mini Kit (QIAGEN)

TOPO TA Cloning® (Invitrogen)

Universal GenomeWalker™ Kit (Clontech)

4 Methoden

4.1 Molekulargenetische Methoden

Soweit nicht anders angegeben, stammen die hier angeführten Methoden aus dem Laborhandbuch Sambrook et al. (231). Die genannten Puffer und Lösungen werden, wenn nicht anders vermerkt, autoklaviert (20 min. bei 120°C).

4.1.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Plasmidisolierung: Midiprep

Mit dem Kit Nucleobond® AX Purification of Plasmids (Macherey-Nagel) kann die Plasmid-DNA aus 100 ml Bakterien-Übernachtskultur isoliert werden.

Die Durchführung erfolgte genau nach dem Protokoll des Herstellers.

Isolierung von Plasmid-DNA: Miniprep

Um Plasmid-DNA in kleinerem Maßstab zu isolieren, wurde aus 1 – 2 ml Bakterien-Übernachtskultur mit dem Kit Amersham GFX™ Micro Plasmid (Amersham) bzw. JETprep Plasmid DNA Isolation and Purification-Miniprep-System (Genomed) DNA isoliert.

Die Durchführung erfolgte genau nach der Anleitung des Herstellers.

Da für Sequenzierungsreaktionen saubere Plasmid-DNA eingesetzt werden muss, wurde in diesem Fall die Plasmid-DNA mit dem Quantum Prep® Plasmid Miniprep Kit (BioRad) isoliert.

Die Durchführung erfolgte genau nach dem Protokoll des Herstellers.

4.1.2 Isolierung chromosomaler DNA aus Listerien

DNA-Isolierung mit TES und Lysepuffer (72)

<u>20 x SSC:</u>	NaCl	175,3 g
	Trinatriumcitrat	88,2 g
	ad 1000 ml H ₂ O _{deion.}	

<u>TES:</u>	Tris/HCl pH 8,0	30 mM
	NaCl	50 mM
	EDTA pH 8,0	5 mM
	Saccharose	20 %

<u>Lösung I:</u> (frisch ansetzen)	Lysozym	25,0 mg
	TES	1,0 ml

<u>Lysepuffer:</u>	Tris/HCl pH 8,0	10 mM
	EDTA pH 8,0	1 mM
	SDS	1 %

<u>Lösung II:</u> (frisch ansetzen)	Proteinase K	0,5 mg
	Lysepuffer	1,0 ml

- man zentrifugiert 10 ml einer Übernachtskultur ab (6000 rpm; 4°C; 10 min.) und wäscht das Pellet in 5 ml 0,1 % SSC-Lösung (6000 rpm; 4°C; 10 min.)
- das gewaschene Pellet wird in 0,5 ml Lösung I aufgenommen und 45 min. lang bei 37°C geschüttelt
- danach erfolgt die Zugabe von 4,5 ml Lösung II

- nach einer weiteren Inkubation von 45 min. bei 37°C (ohne Schütteln) erfolgt die Phenolisierung; es werden 5 ml Phenol zugegeben, durch vorsichtiges Invertieren gemischt und abzentrifugiert (5000 rpm; 4°C; 30 min.)
- dieser Schritt wird wiederholt (2-3 x), bis keine weiße Interphase mehr zu erkennen ist
- nun nimmt man die obere (wässrige) Phase mit einer abgeschnittenen Pipettenspitze ab, vermischt sie mit 5 ml Phenol/Chloroform 1:1 (v:v) und zentrifugiert 20 min. bei 5000 rpm und 4°C
- die wässrige (obere) Phase wird mit 5 ml Chloroform/Isoamylalkohol (24 + 1) extrahiert (5000 rpm; 4°C; 20 min.), um das Phenol restlos zu entfernen
- anschließend wird der Überstand abgenommen, mit 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (oder 3 M Kaliumacetat) und demselben Volumen eiskaltem Isopropanol versetzt
- die Fällung erfolgt ÜN bei -20°C
- nach dem Abzentrifugieren (6000 rpm; 4°C; 30 min.) wird das Pellet kurz mit 70 % EtOH gewaschen (6000 rpm; 4°C; 10 min.) und in der Speedvac getrocknet
- das Pellet löst sich ÜN in 100 µl H₂O_{deion.} bei 4°C
- nach photometrischer Bestimmung der DNA-Konzentration (Kap. 4.1.6) und Kontrolle auf einem Agarosegel (Kap. 4.1.7) wird die chromosomalen DNA bei 4°C gelagert

Mit dieser Methode erhält man saubere, hoch molekulare chromosomale DNA. Weniger aufwendig sind die beiden nächsten Methoden, die jedoch weniger viskose und stärker verunreinigte chromosomale DNA liefern.

DNA-Isolierung mit TNE und TNEX (105)

<u>TNE:</u>	Tris/HCl pH 8,0	10 mM
	NaCl	10 mM
	EDTA pH 8,0	10 mM

TNEX: TNE + 1% TritonX-100

<u>Enzyme (Stammlösungen):</u>	Lysozym	100 mg/ml
	RNase	20 mg/ml
	Proteinase K	20 mg/ml

- man zentrifugiert 1,5 ml einer Übernachtskultur ab (10000 rpm; RT; 10 min.) und wäscht das Pellet mit 0,5 ml TNE (10000 rpm; RT; 5 min.)
- das Pellet wird in 270 µl TNEX resuspendiert
- man gibt 30 µl Lysozymlösung und 2 µl RNase zu und inkubiert 1-2 h bei 37°C
- nach 1-2 h werden 25 µl Proteinase K zugegeben und 3-4 h bei 55°C unter gelegentlichem Invertieren inkubiert, bis die Lösung vollständig klar ist
- anschließend wird die Lösung mit 1/20 Vol. 5 M NaCl und 500 µl 100 % EtOH versetzt und die DNA durch Zentrifugation gefällt (15000 rpm; 4°C; 10 min.)
- das Pellet wird 2x mit 70 % EtOH gewaschen (15000 rpm; 4°C; 10 min.) und in der Speedvac getrocknet
- zum Lösen der DNA resuspendiert man das getrocknete Pellet vorsichtig in 100 µl H₂O_{dest.} und bewahrt die chromosomale DNA bei 4°C auf

DNA-Isolierung mit DNA[®]zol

<u>Enzymlösung:</u>	Lysozym (100 mg/ml)	20 µl
(frisch ansetzen)	Proteinase K (20 mg/ml)	25 µl
	ad 1 ml H ₂ O _{dest.}	

- man zentrifugiert 1-2 ml einer Übernachtskultur ab (10000 rpm; RT; 10 min.), resuspendiert das Pellet mit 50 µl Enzymlösung und inkubiert 30 min. bei 37°C
- nach erneuter Zentrifugation (10000 rpm; RT; 10 min.) werden ca. 20-30 mg Pellet in 1 ml DNA[®]zol mit abgeschnittener Spitze resuspendiert (nicht vortexen!)
- zur Lösung werden 500 µl 100 % EtOH gegeben
- nach vorsichtigem Mischen mit abgeschnittener Spitze fällt die DNA sofort aus und kann mit einer Pipettenspitze bzw. Glashaken aufgewickelt und in 95 % EtOH überführt werden
- die DNA wird kurz (5 min.) bei 15000 rpm und 4°C abzentrifugiert und das Pellet in der Speedvac getrocknet
- anschließend löst man das Pellet in 50 µl 8 mM NaOH und zentrifugiert nochmals unlösliche Reste ab, sobald die DNA gelöst ist (10000 rpm; RT; 10 min.)
- zum Neutralisieren der DNA werden 4,5 µl 0,1 M HEPES (pH 8,2) zugegeben und die DNA bei 4°C gelagert

4.1.3 RNase-Behandlung von DNA

RNase-Stammlösung: 15 mg/ml in H₂O
(aus Pankreas) nach DNase-Zerstörung Aliquots bei -20°C aufbewahren

- die RNase-Stammlösung wird zunächst für 15 min. bei 100°C zur Zerstörung von DNasen inkubiert, anschließend aliquotiert und bei -20°C aufbewahrt
- man setzt die RNase 1:10 (1 µl RNase auf 10 µl DNA) ein und inkubiert 30 min. bei 56°C

4.1.4 Reinigung von DNA

Phenolisierung

Um eine wässrige DNA-Lösung von Proteinen zu reinigen, wird die Methode des Phenolisierens angewendet:

- die DNA-Lösung wird mit dem gleichen Volumen an Phenol/Chloroform 1:1 (v:v) versetzt und gevortext
- die Phasentrennung erfolgt durch Zentrifugation (10000 rpm; RT; 5 min.)
- die obere wässrige Phase wird abgenommen, mit dem gleichem Volumen an Chloroform versetzt und erneut zentrifugiert (10000 rpm; RT; 5 min.)
- die obere wässrige Phase wird abgenommen und daraus die DNA gefällt (Kap. 4.1.5)

Reinigung von PCR-Produkten

Die PCR-Produkte wurden unter Verwendung des *QIAquick PCR Purification Kits* (von QIAGEN) gereinigt. Ebenso kann der *QIAquick PCR Purification Kit* auch zur Reinigung von Verdaus angewendet werden.

Die Durchführung erfolgte genau nach dem Protokoll des Herstellers.

4.1.5 DNA-Fällung

- die DNA-Lösung wird mit 1/10 Volumen Na-Acetat (3 M, pH 4,8) und 2,5 Volumen 100 % EtOH gemischt (alternativ kann statt 100 % EtOH 0,8 Volumen n-Isopropanol zugegeben werden)
- nach einer Fällungszeit von 30 min. bei -80°C wird 15 min. lang bei 4°C abzentrifugiert (15000 rpm)
- das Pellet wird mit 70 % EtOH gewaschen, in der Speedvac getrocknet und in H₂O_{dest} aufgenommen
- die Aufbewahrung der DNA erfolgt bei -20°C (Plasmid-DNA, PCR-Produkte) bzw. 4°C (chromosomale DNA)

4.1.6 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die DNA-Konzentration und Reinheit (= Proteinfreiheit) kann mittels Messung der optischen Dichte am Photometer bestimmt werden. Die Bestimmung der DNA-Konzentration beruht darauf, dass Nukleinsäuren ein Absorptionsmaximum bei 260 nm besitzen.

- die DNA-Probe wird 1:100 mit H₂O_{dest.} verdünnt und die Extinktion bei 260 nm und 280 nm gemessen
- die Konzentration der DNA wird nach folgender Formel berechnet:

$$\text{DNA-Konzentration } [\mu\text{g/ml}] = \text{OD}_{260 \text{ nm}} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 50 \text{ (dsDNA)} \\ \text{OD}_{260 \text{ nm}} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 30 \text{ (ssDNA)}$$

Der Quotient (Ratio) aus OD₂₆₀/OD₂₈₀ gibt Auskunft über die Reinheit und sollte zwischen 1,5 und 2,0 liegen. Erhält man Werte < 1,6, so sind in der DNA noch Phenolreste oder Proteinverunreinigungen vorhanden. Liegt die Ratio bei 2,0 oder darüber, enthält der gemessene Ansatz RNA-Reste.

4.1.7 Elektrophoretische Auftrennung von DNA

Verschieden große DNA-Fragmente können mittels der Gel-Elektrophorese aufgrund ihrer elektrischen Ladung aufgetrennt werden. Das dem Agarosegel zugesetzte Ethidiumbromid lagert sich in die dsDNA ein. Unter einer UV-Lampe werden so fluoreszierende DNA-Fragmente in Form von Banden sichtbar.

Das Wanderungsverhalten der DNA hängt ab von:

⇒ *Größe der dsDNA*

Die Wanderung zur Anode ist umso langsamer, je größer das DNA-Fragment ist.

⇒ *Konformation der dsDNA*

Die relaxierte DNA wandert langsamer als die ringförmige superhelicale Form.

⇒ *Agarosegelkonzentration*

Es können je nach Agarosegelkonzentration 0,2 bis 20 kb große DNA-Fragmente aufgetrennt werden. Ein 1%iges Agarosegel eignet sich zur Auftrennung von DNA-Fragmenten im Bereich von 0,4 bis 6 kb.

⇒ *Stromstärke; Puffer*

Puffer für Agarosegel-Elektrophorese

<u>50 x TAE-Puffer:</u>	Tris	242,0 g
	Eisessig	57,1 ml
	<u>EDTA 0,5 M, pH 8,0</u>	<u>100 ml</u>
	ad 1000 ml H ₂ O _{deion.}	

<u>5 x TBE-Puffer:</u>	Tris	54,0 g
	Borsäure	27,5 g
	<u>EDTA 0,5 M, pH 8,0</u>	<u>20,0 ml</u>
	ad 1000 ml H ₂ O _{deion.}	

<u>Ethidiumbromid-Lösung:</u>	10 mg/ml H ₂ O _{deion.}
	lichtgeschützt bei 4°C lagern
	Vorsicht! EtBr ist mutagen und toxisch!

<u>10 x Probenpuffer:</u>	Bromphenolblau	0,01 g
	Xylen Cyanol FF	0,02 g
	<u>Saccharose</u>	<u>4,0 g</u>
	ad 10 ml H ₂ O _{deion.} (bei 4°C lagern)	

Herstellung eines 1%igen Agarosegels

- als Laufpuffer dient 1 x TAE oder 0,5 x TBE
- in 100 ml Laufpuffer wird 1,0 g Agarose kurz aufgeköcht, bis sich die Agarose vollständig gelöst hat
- nach dem Abkühlen auf ca. 50°C gießt man das Gel in eine Gelkammer mit eingesetztem Kamm und lässt es 30-45 min. bei RT auspolymerisieren
- die DNA-Proben werden mit 1/10 Vol. Probenpuffer gemischt und in die Geltaschen pipettiert
- die Elektrophorese erfolgt bei einer Spannung von 100 V für 1,5 h
- das Gel wird nach der Elektrophorese in einer Ethidiumbromid-Lösung (ca. 300 ml Laufpuffer + 30 µl Ethidiumbromid-Lösung) für ca. 15 min. gefärbt
- nach dem Färben betrachtet man das Gel unter einer UV-Lampe (300 nm) und fotografiert die aufgetrennten DNA-Fragmente

Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Um DNA-Fragmente aus einem Agarosegel zu eluieren wurde der *QIAquick Gel Extraction Kit* (von QIAGEN) verwendet.

Die Durchführung erfolgte genau nach dem Protokoll des Herstellers.

4.1.8 Polymerase Chain Reaction (PCR)

Die PCR ermöglicht die Anreicherung von DNA-Bereichen mit definierter Sequenz und Länge in einem mehrfach wiederholten Kreisprozess. In der PCR kommen hitzestabile DNA-Polymerasen aus thermophilen Bakterien zum Einsatz, wie z.B. die Taq-Polymerase aus *Thermus aquaticus*, Tfl-Polymerase aus *Thermus flavus* und Tth-Polymerase aus *Thermus thermophilus*. Diese Polymerasen sind auch nach mehrfachem Erhitzen bis auf 94°C noch aktiv. Als Template kann gereinigte chromosomale DNA, isolierte Plasmid-DNA oder Bakterien-Zelllysate dienen. Die DNA-Polymerase benötigt einen kurzen doppelsträngigen Bereich als Primer. Der zu amplifizierende Bereich wird von zwei Oligonukleotiden (Primern) flankiert, die jeweils an einen der beiden DNA-Stränge binden.

Folgende Schritte werden dabei wiederholt:

Denaturierung: die doppelsträngige Ausgangs-DNA (dsDNA) wird durch Erhitzen auf 94°C in Einzelstrang-DNA (ssDNA) überführt

Annealing: Anlagerung eines bzw. mehrerer (i.d.R. zwei) für die Zielsequenz spezifischen Primer an die komplementäre ssDNA; die gewählten Annealingtemperaturen liegen zwischen 48°C und 58°C und sind von der Schmelztemperatur und der Homologie der Oligonukleotide zum DNA-Template abhängig.

Elongation: Kettenverlängerung, d.h. Vervielfältigung der zwischen den Primern liegenden DNA-Sequenz an den 3'-OH-Enden der Primer durch die thermostabile DNA-Polymerase bei 72°C; die Elongationszeit sollte ungefähr 1 min. pro kb betragen.

Um die Bildung unspezifischer PCR-Produkte zu vermeiden, sollte der Ansatz erst in den Thermocycler, sobald dieser eine Temperatur von mindestens 80°C anzeigt.

Standard-PCR-Ansatz: DNA (Plasmid- oder chromosomale)	100 - 500 ng
Silverstar Polymerase Puffer 10 x	10,0 µl
MgCl ₂ 25 mM	6,0 µl
dNTPs 20 mM	1,0 µl
Primer I (0,5 µg/µl)	1,0 µl
Primer II (0,5 µg/µl)	1,0 µl
Silverstar Polymerase (5 U/µl)	0,5 µl
	ad 100 µl H ₂ O _{steril}

Standard-PCR-Bedingungen:

94°C / 3 min. first step delay	
94°C / 1 min. Denaturierung	} 30 Zyklen
54°C / 1 min. Annealing	
72°C / 1 min. Elongation	
72°C / 3 min. last step delay	

Bei der Auswahl der Oligonukleotide sollten folgende Kriterien beachtet werden:

- ⇒ GC-Gehalt ca. 50 %
- ⇒ ideale Länge 18 - 28 bp
- ⇒ palindromische Sequenzen vermeiden
- ⇒ Homologien der Primer zueinander vermeiden
- ⇒ G oder C am 3'-OH-Ende zur Stabilisierung des in der PCR entstehenden Hybrids, jedoch längere GC-Abfolge am 3'-OH-Ende vermeiden

Anhand einer Faustformel kann man die Schmelztemperatur (T_m) der Primer errechnen:

$$T_m = 2^\circ\text{C} \times (\text{A} + \text{T}) + 4^\circ\text{C} \times (\text{G} + \text{C})$$

Die optimale Annealingtemperatur liegt 2 - 5°C unter dem niedrigeren beider errechneter Schmelzpunkte.

Diese Faustregel gilt allerdings nur für Primer mit ca. 18 - 24 Nukleotiden.

Wenn unspezifische PCR-Produkte gebildet werden, sollte die Annealingtemperatur angehoben werden.

PCR mit Bakterienlysat

Der Einsatz von Lysat-DNA eignet sich hervorragend zum spezifischen Test mehrerer Klone mittels PCR:

- ein bzw. mehrere Klone (bei Sammel-PCR) werden in 50 μl $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ gelöst und 10 min. bei 110°C gekocht
- anschließend werden die Zelltrümmer abzentrifugiert (15000 rpm; RT; 5 min.) und der Überstand für die PCR eingesetzt (5 - 10 μl Lysat für ein PCR-Ansatzvolumen von 100 μl)

Touchdown-PCR

Um in einer PCR die Spezifität der PCR-Produkte zu erhöhen und eine größere Ausbeute dieser Produkte zu erhalten kann die Methode der Touchdown-PCR angewendet werden. Zudem eignet sich diese Methode auch für PCRs mit Oligonukleotiden, die stark unterschiedliche Schmelztemperaturen (T_m) haben.

Dabei handelt es sich um eine Standard-PCR, bei der die Annealingtemperatur pro Zyklus abgesenkt wird. Man startet die PCR 2 - 3°C über der bisher ermittelten Annealingtemperatur und senkt sie dann in den ersten 10 - 15 Zyklen pro Zyklus um 0,2 - 0,5°C. So begünstigt man das Annealing der Primer bei hohen Temperaturen, was zu großer Spezifität der PCR-Produkte führt. Anschließend werden nochmals 10- 15 Zyklen mit der ursprünglich ermittelten Temperatur durchgeführt.

In dieser Arbeit wurde die Methode der Touchdown-PCR hauptsächlich angewendet um mit *L. ivanovii*-spezifischen Oligonukleotiden auch bei anderen *Listeria*-Arten PCR-Produkte zu erhalten ("Brücken"-, *ysnB-ydeI*-, *iinlG*-PCRs)

4.1.9 Reamplifikation von PCR-Produkten

Oft erhält man in PCR nur schwache Banden, deren Menge nicht für weitere Klonierungen oder Sequenzierungen ausreicht. Um mehr PCR-Produkt zu erhalten, kann man diese schwachen PCR-Produkte reamplifizieren.

Hierzu wird das PCR-Produkt als Template für eine weitere PCR verwendet:

- man verdünnt das PCR-Produkt 1:50 und setzt von dieser Verdünnung 1 – 3 μl für eine zweite PCR mit gleichen Primern und PCR-Bedingungen ein

Wichtig bei dieser Methode ist, dass man in der ersten PCR ein sauberes PCR-Produkt erhalten hat, da Nebenbanden in der zweiten PCR mit amplifiziert werden.

Sollte dies nicht der Fall sein, können die PCR-Produkte mit Hilfe eines Polyacrylamid-Harnstoff-Gels zunächst aufgetrennt und anschließend für eine zweite PCR eingesetzt werden.

Herstellung eines 6%igen Polyacrylamid-Harnstoff-Gels

<u>Polyacrylamid-Harnstoff-Gel:</u> (1 mm dick, Format wie SDS-PAGE)	Harnstoff	10,63 g
	Wasser	10,00 ml
	10 x TBE	2,50 ml
	40 % Acryl/Bisacrylamid	3,75 ml
	16 % APS	175 μl
	Start der Polymerisation: TEMED	25 μl

<u>10 x TBE-Puffer:</u>	Tris	108,0 g
	Borsäure	55,0 g
	EDTA 0,5 M, pH 8,0	40,0 ml
	ad 1000 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{deion.}}$	

- zu Beginn werden zwei Glasplatten (ca. 10 x 10 cm) mit 100% EtOH gesäubert und anschließend nochmals mit Aceton gereinigt
- man legt die beiden Glasplatten aufeinander, fügt am linken und rechten Rand ca. 1 mm dicke Spacer ein und bereitet die Gelapparatur vor
- nun wird der Harnstoff in einem Erlenmeierkolben abgewogen, Wasser und 10 x TBE zugegeben und die Lösung so lange auf einen Magnetrührer gestellt, bis sich der Harnstoff vollständig gelöst hat
- Acryl/Bisacrylamid und APS werden zugegeben und die Lösung durch einen Faltenfilter filtriert, um unlösliche Reste zu entfernen
- mit der Zugabe von TEMED startet man die Polymerisation und gießt das Gel in die vorbereiteten Glasplatten
- nach dem Einsetzen des Kamms sollte das Gel mindestens 1 h auspolymerisieren
- die PCR-Proben werden mit 1/10 Vol. Probenpuffer (Kap. 4.1.7) gemischt und in die Geltaschen pipettiert
- man lässt das Gel mit 1 x TBE als Laufpuffer ca. 1 h bei 110 V laufen, bis die zweite (hellblaue) Front das Ende erreicht hat

Silberfärbung des Polyacrylamid-Harnstoff-Gels

<u>Färbelösung:</u>	MilliQ-H ₂ O	250 ml
	AgNO ₃	ca. 500 mg
	Formaldehyd (37 %)	300 µl

<u>Entwickler:</u>	MilliQ-H ₂ O	250 ml
	Na ₂ CO ₃	6,0 g
	Formaldehyd (37 %)	300 µl

- nach Ende des Gellaufs wird das Gel für 20 min. in 10 % Essigsäure gelegt (Taumler)
- anschließend wäscht man das Gel 3 x je 2 min. mit MilliQ-H₂O
- zum Färben wird das Gel für 30 min. in Färbelösung gelegt und danach 1 x mit MilliQ-H₂O gewaschen
- nach Überführen des Gels in einen neuen Behälter wird der Entwickler zugegeben und sobald Banden sichtbar werden wieder entfernt
- anschließend inkubiert man das Gel für 15 min. in 10 % Essigsäure, dann 2 h in MilliQ-H₂O
- das fertig gefärbte Gel wird auf eine Glasplatte gelegt, in Frischhaltefolie eingewickelt und über Nacht zum Trocknen im Kühlschrank gelassen
- am nächsten Tag wird die gewünschte Bande mit einem Skalpell ausgeschnitten und in ein PCR-Cap überführt
- nach Zugabe der PCR-Reagenzien (100 µl-Ansatz) wird eine PCR durchgeführt und die gewünschte Bande reamplifiziert

4.1.10 Rekombinante PCR (272)

Mit Hilfe der rekombinanten PCR können im Bereich der für die PCR eingesetzten Oligonukleotide Basenaustausche eingeführt werden und so Mutationen oder neue Schnittstellen erzeugt werden. Hierzu wählt man zwei Primer aus, die die gewünschten Basenaustausche in ihrer Sequenz enthalten. Mit diesen wird dann eine Standard-PCR (Kap. 4.1.8) durchgeführt und man erhält ein PCR-Produkt mit veränderter Sequenz im Bereich der gewählten Oligonukleotide.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden auf diese Weise verschiedene Inserts für die pWH- bzw. pGHost-Konstrukte hergestellt, die dann aufgrund neu eingeführter Restriktionsschnittstellen an ihren Enden in die Shuttle-Vektoren kloniert werden konnten.

Zudem wurden in den Shuttle-Vektoren selbst neue Restriktionsschnittstellen eingeführt, wofür folgende Methode der rekombinanten PCR angewendet wurde (Abb. 4.1):

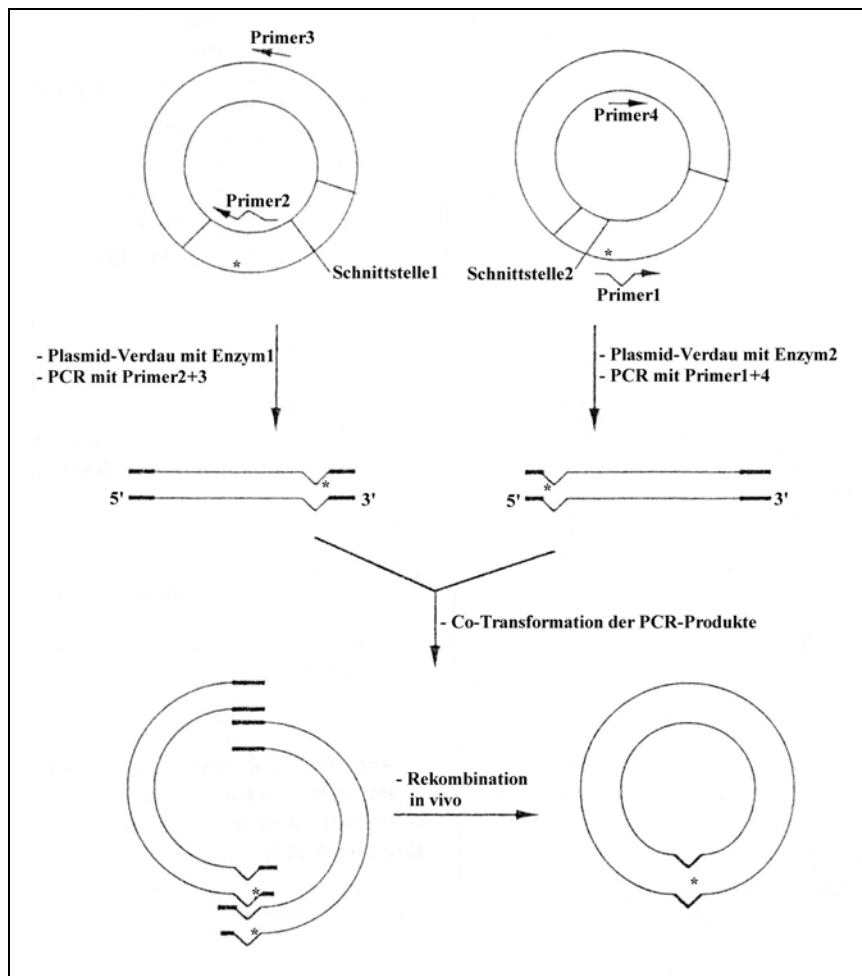


Abb. 4.1: Schematischer Überblick über die Methode der rekombinanten PCR

* symbolisiert die Mutagenesestelle.

Primer 1 ist komplementär zu Primer 2, Primer 3 ist komplementär zu Primer 4.

Die dick gezeichneten Linien kennzeichnen die homologen Enden.

Es werden 4 komplementäre Primer mit den gewünschten Basenaustauschen ausgewählt und so zwei lineare Fragmente mit homologen Enden synthetisiert. Zunächst wird die Plasmid-DNA mit geeigneten Restriktionsenzymen verdaut (Kap. 4.1.11), um durch Linearisierung eine spätere Transformation des Ausgangsplasmids zu verhindern. Dann erfolgt eine Standard-PCR (Kap. 4.1.8) mit den Oligonukleotiden 1 und 4 bzw. 2 und 3 (Abb. 4.1) und die entstandenen Fragmente werden nach Reinigung (Kap. 4.1.4) ohne vorherige Ligation gemeinsam in *E. coli* transformiert (Kap. 4.1.15), wo die Rekombination der linearen Produkte in vivo stattfindet. So entsteht wieder ein zirkuläres Plasmid, das an der Bindungsstelle der Primer nun die gewünschten Basenaustausche besitzt.

4.1.11 Restriktionsverdau von DNA

Restriktionsendonukleasen sind Bestandteil des Restriktions-/Modifikations-Systems, das Bakterien vor der Aufnahme artfremder DNA schützt, gleichzeitig aber genetische Variabilität durch die Aufnahme fremder DNA in niedriger Frequenz gewährleistet. Die verwendeten TypII-Restriktionsendonukleasen ermöglichen das Sequenz-spezifische Schneiden von dsDNA. Je nach Restriktionsenzym werden verschiedene Pufferbedingungen (1 x oder 2 x) und optimale Temperaturen (37°C oder 30°C) benötigt. Ein Unit Restriktionsenzym spaltet bei optimalen Reaktionsbedingungen 1 µg DNA pro Stunde. Man unterscheidet den *partiellen Verdau*, bei dem geringe Enzymmengen eingesetzt werden, und den *vollständigen Verdau*, bei dem ein Überschuss an Restriktionsenzym eingesetzt wird. Allerdings sollte die eingesetzte Enzymmenge nicht 1/10 des Gesamtvolumens überschreiten, weil sonst eine Inhibition der Enzymreaktion durch zu hohe Glycerinkonzentrationen stattfinden könnte.

<u>One phor all Puffer 10 x:</u>	Tris-Acetat (pH 7,5)	100 mM
(Pharmacia)	Mg-Acetat	100 mM
	K-Acetat	500 mM

RNase-Stammlösung: 1 mg/ml H₂O_{deion}
10 min. bei 100°C zur DNase-Inaktivierung, langsam abkühlen lassen und bei -20°C lagern

Verdau von Plasmid-DNA

Standardansatz:	Plasmid-DNA	5 µl (ca. 1 µg)
	One phor all Puffer 10 x	2/4 µl (je nach Enzym)
	RNase	5 µl
	<u>Restriktionsenzym</u>	<u>1 - 2 µl (ca. 10 - 20 Units)</u>
		ad 20 µl H ₂ O _{steril}

Der Verdau inkubiert 1 bis 2 h bei gewöhnlich 37°C (Ausnahme: *SmaI* inkubiert bei 30°C). Anschließend erfolgt die Hitzeinaktivierung des Restriktionsenzym für 20 min. bei 65°C bzw. 30 min. bei 85°C (abhängig vom Restriktionsenzym).

Verdau chromosomaler DNA

Standardansatz:	chromosomale DNA	30 µl (ca. 5 µg)
	One phor all Puffer 10 x	6/12 µl (je nach Enzym)
	RNase	5 µl
	<u>Restriktionsenzym</u>	<u>6 - 10 µl (ca. 80 Units)</u>
		ad 60 µl H ₂ O _{steril}

Die Inkubation erfolgt bei gewöhnlich 37°C für 4 h oder besser ÜN.
Die Kontrolle des Verdaus erfolgt über elektrophoretische Auftrennung auf einem Agarosegel (Kap. 4.1.7).

Partialverdau chromosomaler DNA

Das Restriktionsenzym wird in 2er-Schritten verdünnt und so verschiedene Mengen (1,0 U, 0,5 U, 0,25 U, 0,125 U) für den Verdau eingesetzt:

Standardansatz:	chromosomale DNA	1 µg
	One phor all Puffer 10 x	2/4 µl (je nach Enzym)
	<u>Restriktionsenzym</u>	<u>1 µl (der verschiedenen Verdünnungen)</u>
		ad 20 µl H ₂ O _{steril}

Die Inkubation des Verdaus erfolgt für 1 h bei 37°C. Anschließend werden die einzelnen Verdaus und eine Kontrolle mit unverdauter chromosomaler DNA auf ein Agarosegel (Kap. 4.1.7) aufgetragen und miteinander verglichen. Beim Partialverdau sollten sowohl Reste unverdauter DNA als auch verdaute DNA in Form eines leichten Schmiere zu sehen sein.

4.1.12 Klenow / PNK-Behandlung

Da bei vielen PCR-Produkten durch die Taq-DNA-Polymerase (aufgrund ihrer Template-unabhängigen terminalen Transferaseaktivität) ein einzelnes dATP an die 3'-Enden angefügt wird, ist es bei einer Klonierung in einen "blunt end" geschnittenen Vektor nötig, diese überhängenden Enden durch das Klenow-Enzym aufzufüllen und anschließend die 5'-Enden durch die T4-Polynukleotid-Kinase (PNK) zu phosphorylieren.

Standardansatz: PCR-Produkt	10 µl (ca. 3 µg)
Klenow-Fragment (10 U/µl)	2 µl
T4-PNK (10 U/µl)	2 µl
One phor all Puffer 10 x	10µl
dNTPs 20 mM	1 µl
ATP 20 mM	5 µl
ad 100 µl H ₂ O _{steril}	

Nachdem man den Ansatz für 90 min. bei 37°C inkubiert hat, wird phenolisiert (Kap. 4.1.4) und die DNA gefällt (Kap. 4.1.5). Das DNA-Pellet wird in 6 µl H₂O_{steril} aufgenommen und 1 µl auf ein Agarosegel (Kap. 4.1.7) aufgetragen. Das PCR-Produkt kann nun für eine blunt-end (glatte Enden)- Ligation (Kap. 4.1.14) verwendet werden.

4.1.13 Dephosphorylierung von DNA

Während der Ligation in vitro katalysiert die T4-DNA-Ligase die Bildung einer Phosphodieester-Bindung zwischen benachbarten Nukleotiden nur, wenn ein Nukleotid einen 5'-Phosphatrest und der andere ein 3'-Hydroxylende trägt. Religation von Vektor-DNA kann deshalb minimiert werden, wenn die 5'-Phosphatreste von beiden Enden der linearisierten, doppelsträngigen Plasmid-DNA mit Alkalischer Phosphatase entfernt werden.

Nach Verdau (Kap. 4.1.11) und Reinigung (Kap. 4.1.4) der Vektor-DNA wird folgender Ansatz zur Dephosphorylierung von 5'-Phosphatresten von DNA angesetzt

Standardansatz: linearisierte Plasmid-DNA	90 µl
10 x CIP-Puffer	10 µl
Calf Intestinal Phosphatase (CIP)	0,1-0,5 U pro mol DNA-Enden (abhängig von Art der Enden)

Die Inkubation erfolgt für 15 min. bei 37°C. Anschließend wird nochmals CIP-Enzym zugegeben und die Inkubation für 45 min. bei 55°C fortgesetzt.

Zur Hitzeinaktivierung der Phosphatase wird dem Ansatz 5 mM EDTA zugesetzt und dieser für 30 min. bei 65°C inkubiert.

4.1.14 Ligation von DNA-Fragmenten

Zusammen mit den Restriktionsenzymen ist die T4-DNA-Ligase eines der grundlegenden Enzyme zur Herstellung rekombinanter DNA-Moleküle. Sie verknüpft unter ATP-Verbrauch freie 3'-Hydroxylenden mit 5'-Phosphatenden von doppelsträngiger DNA. Sowohl kohäsive Enden ("sticky ends") als auch glatte Enden ("blunt" ends) können (jeweils) miteinander verbunden werden.

Häufig fügt man in einen Klonierungsvektor ein spezielles DNA-Fragment (Insert) ein. Klonierungsvektor und Insert werden vor der Ligation mit den entsprechenden Enzymen geschnitten (Kap. 4.1.11), gereinigt (Kap. 4.1.4) und die DNA-Konzentration gemessen (Kap. 4.1.6) bzw. gleiche Mengen auf ein Agarosegel (Kap. 4.1.7) aufgetragen, um die Konzentrationen vergleichen zu können. Man setzt für eine Ligation ungefähr 5 - 7 x mehr Insert als Vektor ein (Größe der DNA-Fragmente und Konzentrationen werden berücksichtigt).

Um eine Religation des Vektors (v.a. bei glatten Enden) zu verhindern, sollte dieser vor der Ligation dephosphoryliert werden (Kap. 4.1.13).

Ligation kohäsiver Enden

geschnittener Vektor	0,1 µg
Insert	0,5 µg
T4-Ligase-Puffer 5 x	4,0 µl
T4-Ligase (1 U/µl)	1,0 µl
ad 20 µl H ₂ O _{steril}	

Der Ligationsansatz wird 1 h bei Raumtemperatur bzw. 4 h bei 16°C inkubiert und dann komplett für eine Transformation in *E. coli* (Kap. 4.1.15) eingesetzt.

Ligation glatter Enden

geschnittener Vektor	0,1 µg
Insert	1,0 µg
T4-Ligase-Puffer 5 x	4,0 µl
T4-Ligase (1 U/µl)	1,0 µl
ad 20 µl H ₂ O _{steril}	

Der Ligationsansatz wird ÜN bei 16°C inkubiert und anschließend der gesamte Ansatz für eine Transformation in *E. coli* (Kap. 4.1.15) eingesetzt.

Ligation mit dem TOPO TA Cloning[®]-Kit (Invitrogen)

PCR-Produkte, die mit Taq-Polymerase amplifiziert wurden, tragen an den 3'-Enden meist ein einzelnes, überhängendes A. Der Vektor pCR[®]2.1-TOPO wird linearisiert und mit 3'-T-Überhängen geliefert. Der Kit enthält außerdem noch Topoisomerase zur "Schnell-Ligation".

Über AT-Paarung der Enden und Ligation innerhalb von 5 min. durch Topoisomerase erlaubt der Kit eine sehr effiziente und schnelle Klonierung von PCR-Produkten.

Zusätzlich enthält der Kit kompetente Zellen (*E. coli* TOP10F'), die für eine sehr effiziente Transformation (One Shot[™] Transformation) eingesetzt wurden.

Ligation und Transformation erfolgten genau nach dem Protokoll des Herstellers.

4.1.15 Transformation in *E. coli*

Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen (DH5α) (198)

<u>Lösung I:</u>	MgSO ₄	10 mM (steril filtriert)
(frisch ansetzen)	Glucose	0,2 % (steril filtriert)
ad 100 ml LB-Medium		

<u>Lösung II:</u>	MgSO ₄	12 mM (steril filtriert)
	Glycerin	36,0 % (steril filtriert)
	PEG MW 7500	12,0 % (steril filtriert)
ad 100 ml LB-Medium		

- eine ÜN-Kultur von *E. coli* wird im Klettkolben 1:100 mit 50 ml Lösung I verdünnt und im Schüttler bei 37°C bis zur mittleren log. Phase (OD₆₀₀ = 0,5, 90 - 120 Klett) angezogen
- die Zellen werden in vorgekühlte Greinerröhrchen gefüllt und für 10 min. auf Eis gestellt
- nach dem Abzentrifugieren (6000 rpm; 4°C; 10 min.) wird das Pellet in 0,5 ml Lösung I (vorgekühlt) aufgenommen
- nach Zugabe von 2,5 ml Lösung II werden Aliquots von je 100 µl bei -80°C eingefroren

Transformation von Plasmid-DNA in *E. coli*

- zu 100 µl kompetenter *E. coli*-Zellen wird auf Eis der gesamte Ligationsansatz gegeben
- als Negativ-Kontrolle wird ein Aliquot kompetenter Zellen eingesetzt
- man inkubiert 30 bis 60 min. auf Eis
- anschließend wird der Ansatz 90 s lang in ein 42°C warmes Wasserbad gegeben und danach 2 min. auf Eis gestellt
- es werden 800 µl LB-Medium zugegeben und der Ansatz bei 37°C inkubiert; zur Ausprägung von Antibiotikaresistenzen wie z.B. Ampicillin, Chloramphenicol oder Kanamycin wird normalerweise 1 h lang, bei Erythromycin hingegen muss 5 - 6 h lang inkubiert werden
- je 100 µl Transformationsansatz werden dann auf LB-Platten mit den entsprechenden Antibiotika ausplattiert und ÜN bei 37°C inkubiert

4.1.16 Elektroporation in Listerien (203)

Herstellung kompetenter Listerien

<u>SMHEM-Medium (3,5 x):</u>	Saccharose	952 mM
	MgCl ₂	3,5 mM
	<u>HEPES</u>	<u>7,0 mM</u>
	ad 200 ml H ₂ O _{dest.} , pH 7,2	

- eine Listerien-Übernachtskultur wird 1:20 mit 100 ml BHI-Medium + 0,2 % Glycin verdünnt
- nach Inkubation bei 37°C bis 90 Klett erfolgt Zugabe von Penicillin G (5 µg/ml)
- man inkubiert erneut bei 37°C bis 120 Klett
- die Bakterienzellen werden abzentrifugiert (6000 rpm; 4°C; 10 min.) und anschließend zweimal mit 1/10 Vol. 3,5 x SMHEM gewaschen
- nach dem letzten Waschschrift wird das Bakterienpellet in 1/100 Vol. SMHEM resuspendiert und in 200 µl-Portionen bei -80°C eingefroren

Elektroporation

- 100 - 200 µl kompetente Listerien werden auf Eis aufgetaut und mit maximal 5 µl DNA-Lösung (2 - 4 µg) in einer vorgekühlten Elektroporationsküvette gemischt
- nach einer einminütigen Inkubation der Küvette. auf Eis erfolgt die Elektroporation bei 100 Ohm, 25 µF Kondensator und 10 kV (entspricht 2 kV bei 0,2 cm-Küvette)
- anschließend wird sofort 1 ml BHI-Medium zugegeben und der Elektroporationsansatz in ein Eppendorfcap überführt
- die Zwischenzüchtung erfolgt bei 37°C (bzw. 30°C bei temperatursensitivem Vektor) für 1 bis 6 h (je nach Antibiotikumresistenz: Cm und Km 1 h; Em 5 - 6 h)
- die Zellen werden dann auf den entsprechenden Selektionsplatten ausplattiert und für 1 - 3 Tage bei 37°C (bzw. 30°C) inkubiert

4.1.17 Protoplastierung von *Listeria* (270)

Herstellung von Protoplasten

Lysozymlösung: 15 mg/ml in SMMP
frisch ansetzen und steril filtrieren

5 % BSA: 5 % BSA auf 100 ml H₂O_{dest.}
pH7,5 mit NaOH einstellen, steril filtrieren

<u>2 x SMM:</u>	Saccharose	17,0 g	ad 500 ml H ₂ O _{dest.} (12 min. autoklavieren)
	Maleat	2,3 g	
	MgCl ₂	1,0 g	
	<u>Tris</u>	<u>1,2 g</u>	
<u>4 x PAB:</u>	Nutrient Broth	16,0 g	ad 1000 ml H ₂ O _{dest.} (12 min. autoklavieren)
	Bacto-Pepton (Pepton 140)	14,0 g	
	<u>Hefeextrakt</u>	<u>12,4 g</u>	
<u>SMMP:</u>	2 x SMM	110 ml	steril mischen, nicht autoklavieren
	4 x PAB	80 ml	
	<u>5 % BSA</u>	<u>10 ml</u>	
		200 ml	

- am Vortag wird eine Übernachtskultur von Listeria in BHI + 0,2 % Glycin angelegt
- am nächsten Tag werden die Bakterien 1:100 in BHI + 0,2 % Glycin verdünnt und bei 37°C im Schüttler inkubiert
- bei einer optischen Dichte von 120 – 130 KE zentrifugiert man 30 ml der Bakterien für 10 min. bei 6000 rpm und 4°C und wäscht das Pellet 1 x mit 30 ml eiskaltem H₂O_{steril} (10 min., 6000 rpm, 4°C)
- das Pellet wird in 2,5 ml frisch angesetzter Lysozymbilösung aufgenommen und über Nacht (12 – 16 h) ohne Schütteln bei 37°C inkubiert
- am nächsten Tag werden die Listerien 10 min. bei 5000 rpm und 4°C abzentrifugiert und das Pellet 1 x mit 10 ml SMMP gewaschen (10 min., 5000 rpm, 4°C)
- die so hergestellten Protoplasten werden in 2,5 ml SMMP aufgenommen und zur Kontrolle mikroskopiert (es sollten abgekugelte Zellen sichtbar sein)
- zur Aufbewahrung aliquotiert man die Protoplasten und friert sie bei –70°C ein

Transformation und Regeneration der Protoplasten

<u>Fusogen:</u>	Polyethylenglycol 6000	40,0 g	ad 100 ml H ₂ O _{dest.} (12 min. autoklavieren)
	<u>2 x SMM</u>	<u>50 ml</u>	
<u>DM3-Regenerationsplatten:</u>	5 % Agarlösung	200 ml	Lösungen getrennt autoklavieren, auf 55°C abkühlen lassen
	1 M Na-Succinat pH 7,3 (12 min. autoklavieren)	500 ml	
	5 % Caseinhydratlösung	100 ml	
	10 % Hefeextraktlösung	60 ml	
	1,5 % K ₂ HPO ₄	100 ml	
	50 % Glucose	10 ml	
	1 M MgCl ₂	20 ml	
	5 % BSA (steril filtriert)	10 ml	
	<u>evtl. Antibiotikum</u>		
		1000 ml	

Platten nach dem Abkühlen und Zusammengeben der Lösungen sofort gießen

- 400 µl Protoplasten werden auf Eis aufgetaut und mit 1 µg Plasmid-DNA gemischt
- man inkubiert 3 min. auf Eis und gibt dann 2 ml Fusogen zu
- die Protoplasten werden vorsichtig für 1 min. invertiert und dann 1 min. bei RT inkubiert
- man gibt 7 ml SMMP (RT) zu, invertiert 6 – 8 x und zentrifugiert für 20 min. bei 5000 rpm und 20°C
- der Überstand wird vorsichtig abgezogen und das Pellet in 1 ml SMMP aufgenommen
- nach 3 – 4 h Inkubation bei 30°C werden je 150 – 200 µl Listerien auf DM3-Regenerationsplatten ausplattiert und ca. 5 Tage bei 30°C inkubiert

4.1.18 Mutagenese durch homologe Rekombination von *L. monocytogenes* (23, 270)

Die homologe Rekombination ist eine gängige Methode, um mit Hilfe eines temperatursensitiven (ts) Vektors Deletions- oder Insertionsmutanten herzustellen. Dieser Vektor kann aufgrund seines ts-Origins in gram⁺ Bakterien (Listerien) nur bei 30°C, nicht aber bei 37°C replizieren. Besitzt dieser Vektor zum Genom der zu mutierenden Bakterien homologe Bereiche, so kann eine Integration des Vektors ins bakterielle Chromosom erfolgen und die so entstandenen Mutanten können bei 37°C unter Selektionsdruck eines Antibiotikums identifiziert werden.

Für die homologe Rekombination benötigt man mindestens 100 bp des chromosomalen Bereichs, der mutiert werden soll. Je größer dieser Bereich ist, umso wahrscheinlicher tritt das Ereignis der homologen Rekombination ein. Optimal ist eine Größe zwischen 0,5 und 2,5 kb, wobei dieser Bereich keine C- oder N-terminalen Bereiche beinhalten sollte.

In dieser Arbeit sollten Insertionsmutanten hergestellt werden. Es wurden homologe Bereiche mit einer Größe von 1,0 – 1,2 kb gewählt, wobei jeweils 500 – 600 bp die zu inserierenden Gene flankieren.

Konstruktion von Insertionsmutanten

Bei der Herstellung von Insertionsmutanten sind zwei homologe Rekombinationen nötig. Zunächst muss der Vektor mit den zu inserierenden Genen ins bakterielle Chromosom integriert werden, anschließend durch ein weiteres Rekombinationsereignis aber wieder entfernt werden, sodass nur die inserierten Gene im Genom des Bakteriums zurückbleiben.

- das Insertionsplasmid wird in *L. monocytogenes* über Elektroporation (Kap. 4.1.16) transformiert, auf den entsprechenden Selektionsplatten ausplattiert und bei 30°C inkubiert
- nach 3 - 5 Tagen wird mit dem erhaltenen Klon eine ÜN-Kultur mit dem entsprechenden Antibiotikum angelegt und bei 30°C inkubiert
- anschließend wird die ÜN-Kultur auf vorgewärmte BHI-Platten (mit Antibiotikum) in den Verdünnungsstufen 10⁻¹ bis 10⁻⁴ ausplattiert und mindestens 3 Tage lang bei 42°C inkubiert
- die Integration des Insertionsplasmids in das Chromosom wird mittels PCR (Kap. 4.1.8) überprüft; man spricht hier von einem "single crossover" (sco)
- ein positiver Klon wird weiter bei 30°C (ohne Antibiotikum) ca. 10 – 20 x subkultiviert und dann die Verdünnungsstufen 10⁻³ und 10⁻⁴ auf BHI-Platten ohne Antibiotikum ausplattiert
- Einzelkolonien werden parallel auf BHI-Platten mit und ohne Antibiotikum gepickt und über Nacht bei 37°C inkubiert
- die gesuchten Klone mit einer zweiten homologen Rekombination ("double crossover", dco) wachsen auf den antibiotikumfreien Platten, nicht aber auf den Platten mit Antibiotikum, da sie durch den Verlust des Plasmids ihre Antibiotikumresistenz verloren haben
- diese Klone werden mittels PCR (Kap. 4.1.8) auf die Integration des gewünschten Gens und den Verlust des Plasmids getestet

4.1.19 Genome Walking

Das Genome Walking ist eine Methode, um unbekannte genomische DNA-Sequenzen zu finden, die benachbart zu einer bekannten Sequenz liegen. Hierzu wurden im Laufe dieser Arbeit verschiedene Methoden getestet.

Für die durchzuführenden PCRs wurden verschiedene Polymerasen und Kits verwendet, um möglichst große PCR-Produkte zu erhalten:

Expand™ High Fidelity PCR System (Boehringer Mannheim / Roche)

Expand™ Long Template PCR System (Boehringer Mannheim / Roche)

GeneAmp® XL PCR Kit (PE Applied Biosystems)

LA PCR Kit (TaKaRa)

Universal GenomeWalker™ Kit (Clontech)

Mit Hilfe des Universal GenomeWalker™ Kits von Clontech war es möglich, zunächst größere Bereiche unbekannter DNA zu "überspringen" und diese nachfolgend zu sequenzieren und unbekannte DNA-Sequenzen zu identifizieren. Eine schematische Übersicht über das Genome Walking ist in Abb. 4.2 dargestellt.

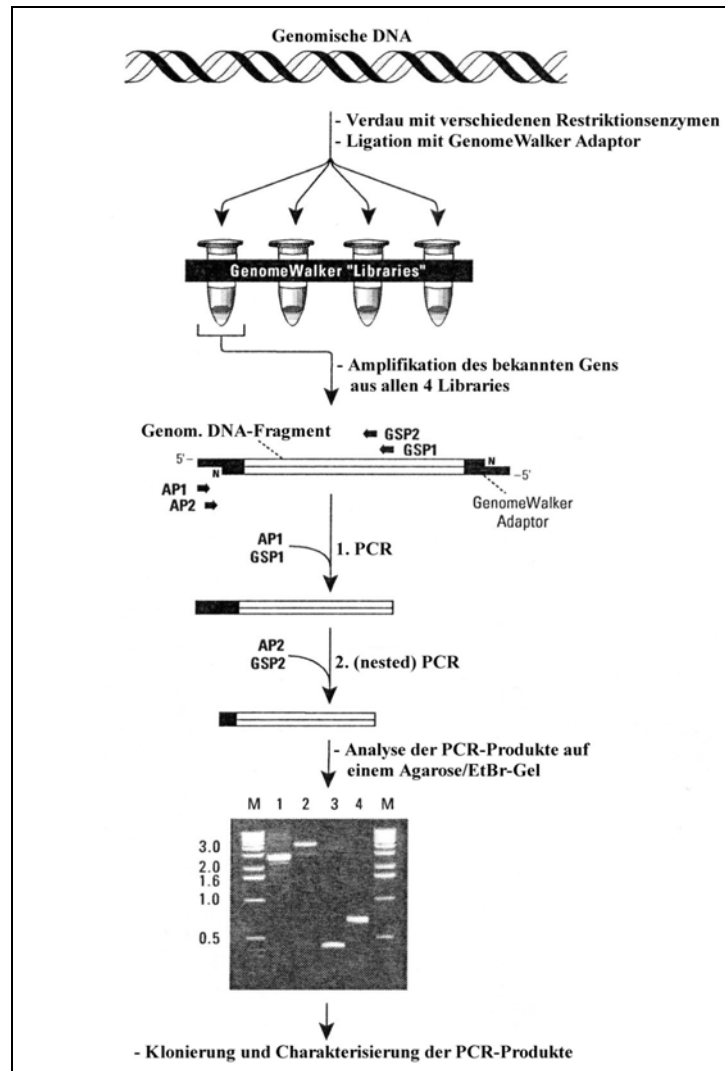


Abb. 4.2: Übersicht über das Genome Walking

GSP1, 2: Gen-spezifischer Primer 1, 2

AP1, 2: Adaptor-Primer 1, 2

Als erstes muss aus der genomischen DNA ein Pool von Adaptor-ligierten genomischen DNA-Fragmenten hergestellt werden (GenomeWalker "Libraries"). Hierzu wird saubere, hoch molekulare chromosomale DNA isoliert (Kap. 4.1.2) und mit verschiedenen Enzymen verdaut, die glatte (blunt) Enden liefern. An diese "Blunt-end"-Fragmente ligiert man den GenomeWalker Adaptor und verwendet diese GenomeWalker "Libraries" als Template für die erste PCR mit einem Gen-spezifischen Primer (GSP1) und dem Adaptor-Primer 1 (AP1). Das Produkt dieser ersten PCR wird dann verdünnt und als Template für die zweite (sog. nested) PCR mit einem weiteren Gen-spezifischen Primer (GSP2) und dem Adaptor-Primer 2 (AP2) eingesetzt. Meist erhält man in der zweiten PCR in mehreren der GenomeWalker "Libraries" spezifische PCR-Produkte, die nachfolgend kloniert bzw. sequenziert werden können.

Für beide PCRs ist es wichtig, eine Polymerase bzw. einen PCR-Kit einzusetzen, mit dem man große PCR-Produkte erhält, um möglichst große Bereiche der unbekannt DNA-Sequenz abdecken zu können. Nach Angabe des Herstellers können so PCR-Produkte bis zu einer Größe von 6 kb erreicht werden. In der Praxis lagen die größten Produkte allerdings nur bei ca. 3 kb.

Eine Besonderheit des GenomeWalker™ Kits ist der mitgelieferte GenomeWalker Adaptor (Abb. 4.3), der an beide Enden der genomischen DNA-Fragmente ligiert wird (Abb. 4.2). Die Aminogruppe am unteren Strang des Adaptors blockiert die Verlängerung der 3'-Enden der Adaptor-ligierten DNA-Fragmente in der ersten PCR und verhindert so die Bildung von unspezifischen PCR-Produkten mit dem Primer AP1 alleine.

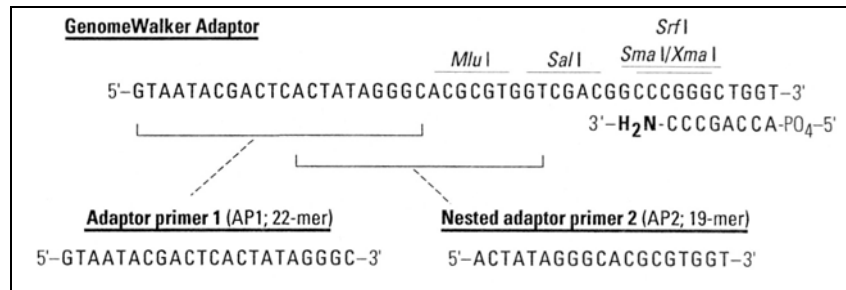


Abb. 4.3: Aufbau des GenomeWalker Adaptors und der Adaptor Primer
MluI, SalI, SmaI, XmaI, SrfI: Restriktionsschnittstellen innerhalb des Adaptors

Die Durchführung erfolgte genau nach dem Protokoll des Herstellers.

Vektorette (112)

Eine dem GenomeWalker Kit ähnliche Methode ist die Sequenzierung unbekannter Bereiche chromosomaler DNA mit Hilfe einer sog. Vektorette. Ein schematischer Überblick ist in folgender Abbildung (Abb. 4.4) gezeigt:

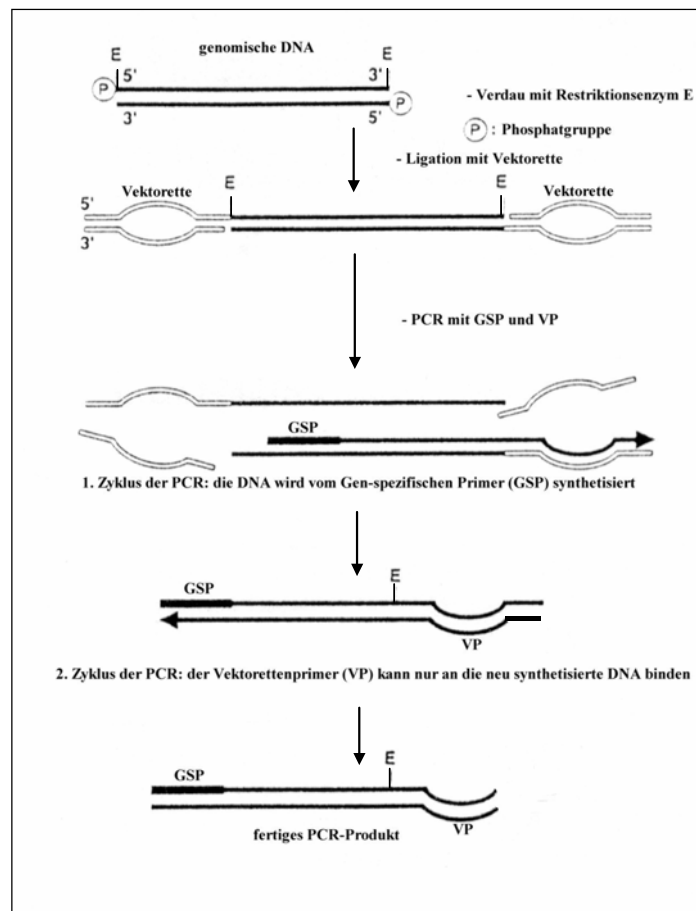


Abb. 4.4: Übersicht über die Vektoretten-Methode
 GSP: Gen-spezifischer Primer; VP: Vektorettenprimer
 E: Restriktionsschnittstelle

Auch hier wird chromosomale DNA zunächst mit einem Restriktionsenzym verdaut und mit einem Adaptor, der sog. Vektorette ligiert. Die Besonderheit der Vektorette liegt darin, dass die Sequenzen ihrer Enden komplementär zueinander sind, die des mittleren Bereiches aber stark voneinander abweichen. So entsteht eine "Blasen-ähnliche" Struktur, weil kein Annealing der Einzelstränge in dem Mittelteil der Vektorette stattfinden kann. Da die Vektorette nicht phosphoryliert ist, bindet jeweils nur ein Strang an jedes Ende der verdauten genomischen DNA unter Benutzung der 5'-Phosphatgruppe.

Führt man nun eine PCR mit einem Gen-spezifischen Primer (GSP) und einem im nicht komplementären Bereich der Vektorette bindenden Primer (VP) durch, so wird im ersten Zyklus der PCR DNA mit dem Primer GSP synthetisiert und DNA hergestellt, die komplementär zur Vektorettens-sequenz ist. Im zweiten Zyklus der PCR kann nun der Vektorettensprimer (VP) nur an die neu synthetisierte DNA binden, was zu einer hohen Spezifität der PCR führt. Das fertige PCR-Produkt kann anschließend direkt sequenziert werden.

In dieser Arbeit wurde die Vektorette modifiziert (Abb. 4.5) und mit zusätzlichen Restriktionsschnittstellen ("sticky end") ausgestattet, um nach Restriktionsverdau überhängende Enden zu erzeugen und so die Ligation der Vektorette an die mit dem gleichen Enzym verdauten genomischen DNA zu erleichtern. Allerdings muss nach dem Verdau der Vektorette zusätzlich eine Dephosphorylierung (Kap. 4.1.13) derselben durchgeführt werden, um bei der Ligation zu verhindern, dass diese mit sich selbst ligiert. Alternativ wurde außerdem eine Vektorette eingesetzt, die gleich mit überhängenden Enden geliefert wurde (Abb. 4.6).

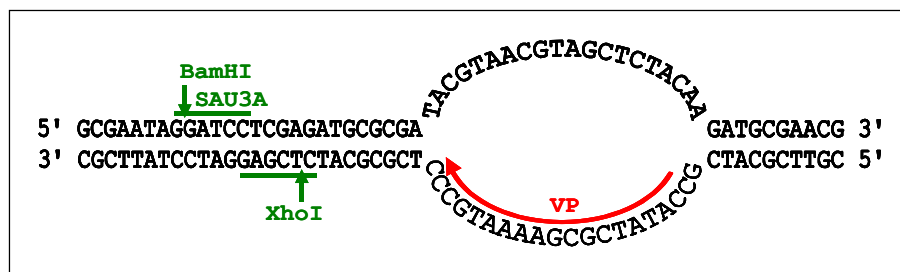


Abb. 4.5: Aufbau der modifizierten Vektorette (mit Restriktionsschnittstellen)
 VP: Vektorettensprimer
*Bam*HI, *SAU*3A, *Xho*I: Restriktionsschnittstellen

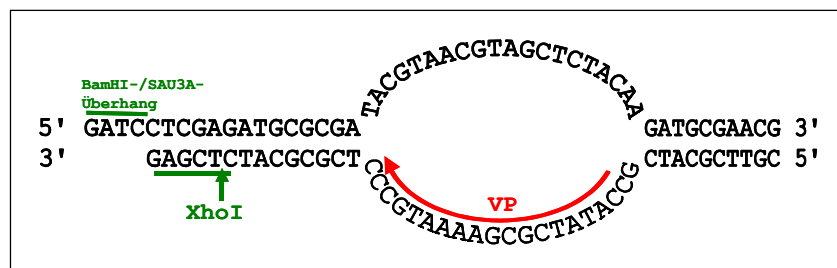


Abb. 4.6: Aufbau der modifizierten Vektorette (mit Überhang)
 VP: Vektorettensprimer
*Xho*I: Restriktionsschnittstelle

In der Praxis hat sich gezeigt, dass die PCR-Produkte wesentlich kleiner (< 1,0 kb) als beim GenomeWalker Kit und zum Teil nicht spezifisch waren.

Genome Walking: Amplifikation aus chromosomaler DNA

Als letzte Methode wurde Genome Walking mit Hilfe von Semi-random Primern durchgeführt, wobei der Vorteil dieser Methode darin liegt, dass die zu untersuchende DNA nicht erst verdaut und mit einem Adaptor ligiert werden muss, sondern gleich für eine PCR eingesetzt werden kann. Allerdings hat sich herausgestellt, dass diese Methode am wenigsten erfolgreich war.

Gen-spezifische Primer: Primer1 (ca. 20 bp, ca. 50 % GC)
Primer2 (nested Primer, downstream von Primer1)

Semi-random Primer: 13 konstante Basen + 3 degenerierte Basen + 4 palindromische Basen
z.B. 5' CACTATAGGGCGA NNN GATC 3'
5' CACTATAGGGCGA NNN CATG 3'
5' CACTATAGGGCGA NNN TCGA 3'

T7-Primer: 5' TACGACTCACTATAGGGCGA 3'
erkennt konstanten Bereich aus Semi-random Primer und wird für nested PCR
(2. PCR) eingesetzt

1. PCR:	25 µl Reaktionsansatz	94°C / 2 min.	} 35 Zyklen
	Template 500 ng chromosomale DNA	94°C / 40 s	
	Primer1 und Semi-random Primer	53°C / 2 min.	
		72°C / 2 min.	
		72°C / 10 min.	

- in der 1. PCR werden 3 Ansätze pipettiert, von denen jeweils 0,5 – 1 µl für die 2. PCR eingesetzt werden
- für die 2. PCR sollten neben den 3 Ansätzen mit beiden Primern zusätzlich auch je 2 Ansätze mit dem Primer2 bzw. T7-Primer einzeln pipettiert werden (d.h. insgesamt 9 Ansätze), um unspezifische PCR-Produkte detektieren zu können

2. PCR (nested PCR):	50 µl Reaktionsansatz	94°C / 2 min.	} low stringency-
	Template 0,5 – 1 µl der 1. PCR	50°C / 2 min.	
	Primer2 und T7-Primer	72°C / 3 min.	} 35 Zyklen
		94°C / 40 s	
		56°C / 1 min.	
		72°C / 2 min.	
		72°C / 10 min.	

- von der 2. PCR werden je 10 µl auf einem Agarosegel aufgetragen (Kap. 4.1.7)
- erhält man in der 2. PCR Produkte bei der Kombination mit beiden Primern, kann man aus der 1. PCR beliebig viel PCR-Produkt amplifizieren bzw. die Produkte der 2. PCR reinigen (Kap. 4.1.4) und direkt sequenzieren (Kap. 4.1.20).

4.1.20 DNA-Sequenzierung

ABI PRISM™ Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Perkin Elmer)

Für die Sequenzierung mit Hilfe dieses Kits wurde die Plasmid-DNA mit dem BioRad Quantum Plasmid-Miniprep-Kit (Kap. 4.1.1) isoliert.

Die Sequenzierungsreaktion wurde genau nach Anleitung des Herstellers des Sequenzierungs-Kits durchgeführt:

Sequenzierungsreaktion

Big Dye	3 µl	PCR-Programm:	96°C / 10 s
DNA (Plasmid-DNA)	200 ng		50°C / 5 s
(PCR-Produkt)	60 ng		60°C / 4 min.
Primer	50 ng		25 Zyklen
ad 20 µl MilliQ-H ₂ O			

EtOH-Fällung

- nach Ende der Sequenzierungsreaktion wird die Probe mit 2 μ l 3 M NaAc, pH 4,8 und 50 μ l 100% EtOH versetzt und gut gemischt
- nach 20minütiger Inkubation auf Eis wird die DNA 30 min. bei 4°C und 15000 rpm gefällt, kurz mit 70% EtOH gewaschen und anschließend in der Speedvac getrocknet

4.1.21 Herstellung von Glycerinkulturen

Um Bakterien längerfristig lagern zu können werden diese bei -80°C eingefroren. Hierfür wird allerdings ein spezielles Medium benötigt:

Einfriermedium: 50 % Glycerin
2,9 % NaCl

- eine Bakterien-ÜNK wird 1:1 mit dem Einfriermedium gemischt und 1,5 ml dieser Lösung bei -80°C eingefroren

4.1.22 Isolierung von RNA aus Listerien

RNA-Isolierung mit heißem Phenol (200)

Beim Arbeiten mit RNA sollten, um Kontaminationen mit RNasen zu vermeiden, Handschuhe getragen und DEPC-behandelte Lösungen und Geräte verwendet werden.

AE-Puffer: NaAcetat 20,0 mM
EDTA 1,0 mM
mit Essigsäure auf pH 5,5 einstellen

SDS: SDS 25 % (w/v)

NaAc-Lsg.: NaAcetat 3,0 M
pH 4,8

Phenol: Aqua Roti Phenol
8-Hydroxychinolin 0,1 %

PCIAA-Lsg.: Phenol : Chloroform : Isoamylalkohol 24 : 24: 1

DEPC-behandelte Lsg.: DEPC 0,01 %
nach Zugabe von DEPC 12 h bei 37°C inkubieren und anschließend autoklavieren;
nicht geeignet für Aminogruppen-haltige Puffersysteme wie z.B. Tris

- eine Übernachtskultur wird 1:10 in BHI verdünnt und im Schüttler inkubiert
- bei einer optischen Dichte von 180 – 200 KE (OD₆₀₀ von 1,0; spätlogarithmische Wachstumsphase) werden 50 ml der Listerienkultur abzentrifugiert (6000 rpm; 4°C; 15 min.)
- anschließend werden die Bakterien mit 12 ml 65°C heißer PCIAA-Lösung, 150 μ l SDS und 6 ml AE-Puffer aufgeschlossen
- die Proben werden 20 min. bei 65°C im Wasserbad inkubiert und während dieser Zeit mehrmals gut gevortext
- nach 10minütiger Inkubation auf Eis zentrifugiert man 10 min. (6000 rpm; 4°C) zur Phasentrennung
- der wässrige Überstand wird mit 670 μ l NaAc (3 M, pH 4,8) versetzt und erneut mit 6 ml PCIAA-Lösung extrahiert (10 min., 6000 rpm, 4°C)
- anschließend wird die wässrige Phase mit 2 ml Chloroform ausgeschüttelt (zur Entfernung von Phenolresten) und wieder für 10 min. bei 6000 rpm und 4°C zentrifugiert
- die Fällung der RNA erfolgt durch Zugabe von 2,5 Vol. absolutem EtOH bei -80°C ÜN
- am nächsten Tag wird die RNA abzentrifugiert (JA-20-Rotor; 10000 rpm; 4°C; 30 min.), mit 70 % EtOH gewaschen (JA-20-Rotor; 10000 rpm; 4°C; 10 min.) und in der Speedvac getrocknet
- das Pellet wird anschließend in DEPC-H₂O bzw. DNase-Puffer gelöst und eine DNase-Behandlung durchgeführt (Kap. 4.1.23)

Isolierung von RNA mit RNA-FastPrep und E.Z.N.A.® Bacterial RNA Kit (53)

- eine Übernachtskultur wird 1:10 in BHI verdünnt und im Schüttler inkubiert
- bei einer optischen Dichte von 180 – 200 KE (OD_{600} von 1,0; spätlogarithmische Wachstumsphase) werden 10 ml der Listerienkultur abzentrifugiert (6000 rpm; 15 min.)
- das Pellet wird in 200 μ l BRL-Puffer resuspendiert und mit 1 ml TRK-Puffer (+ 20 μ l β -Mercaptoethanol/ml TRK) gemischt
- man überführt die Lösung in ein FastRNA-Cap mit Glaskügelchen und lysiert die Listerien im RNA-FastPrep (Speed 6,5; Zeit 45 s; 2 – 3 x); um ein starkes Erwärmen der Lösung zu vermeiden, wird das Cap zwischen den einzelnen Vorgängen kurze Zeit auf Eis inkubiert
- die Bakterentrümmer und Glaskügelchen werden für 1 min. bei 15000 rpm abzentrifugiert, der die RNA enthaltende Überstand abgenommen und mit 0,83 Volumen absolutem EtOH gemischt
- man verteilt die RNA-Lösung auf 2 Säulen und isoliert nun die RNA nach Anleitung des Herstellers
- die isolierte RNA wird anschließend mit DNase behandelt (Kap. 4.1.23) und kann aliquotiert bei -80°C aufbewahrt werden

4.1.23 DNase-Behandlung von RNA

DNase-Behandlung mit DNase I von Pharmacia/Amersham

<u>DNase-Puffer:</u>	MgCl ₂	(Stammlsg. 1 M)	6 mM
	TrisHCl	(Stammlsg. 1 M)	40 mM

- das RNA-Pellet wird in 500 μ l DNase-Puffer gelöst, mit 10 – 15 μ l DNase I (10 U/ μ l) versetzt und für 45 min. bei 25°C (RT) inkubiert
- anschließend werden die Proben mit 400 μ l Phenol/Chloroform 1:1 (v:v) ausgeschüttelt (15000 rpm; 4°C; 3 min.)
- durch Extraktion mit 400 μ l Chloroform (15000 rpm; 4°C; 3 min.) wird das restliche Phenol aus der wässrigen Phase entfernt
- der wässrige Überstand wird abgenommen und die RNA durch Zugabe von 1/10 Vol. NaAc (3 M, pH 4,8) und 2,5 Vol. absolutem EtOH mindestens 1 h bei -80°C gefällt
- nach Zentrifugation (15000 rpm; 4°C; 30 min.) wird das Pellet mit 70 % EtOH gewaschen und in der Speedvac getrocknet
- die RNA wird in 50 μ l DEPC-H₂O gut gelöst und aliquotiert bei -80°C aufbewahrt (ein häufiges Auftauen der RNA führt zu deren Abbau)

Um zu überprüfen, ob die RNA frei von DNA ist, sollte nach der DNase-Behandlung eine PCR (Kap. 4.1.8) mit RNA als Template durchgeführt werden. Erhält man kein PCR-Produkt, so kann davon ausgegangen werden, dass die DNA vollständig entfernt wurde.

DNase-Behandlung mit dem DNA-free™ Kit von Ambion

Der DNA-free™ Kit ist eine schnelle und sehr effiziente Alternative zur üblichen DNase-Behandlung und liefert schon nach 30 min. DNA-freie RNA.

Die Durchführung erfolgte genau nach Anleitung des Herstellers.

Auch hier sollte nach der DNase-Behandlung eine PCR (Kap. 4.1.8) mit RNA durchgeführt werden, um zu überprüfen, ob die RNA frei von DNA ist.

4.1.24 Konzentrationsbestimmung von RNA

Die Konzentrationsbestimmung von RNA erfolgt wie für DNA (Kap. 4.1.6), aber mit folgender Umrechnungsformel:

$$\text{RNA-Konzentration } [\mu\text{g/ml}] = \text{OD}_{260 \text{ nm}} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 40$$

Der Quotient $\text{OD}_{260 \text{ nm}}/\text{OD}_{280 \text{ nm}}$ gibt wieder den Reinheitsgrad an und sollte bei 2,0 liegen.

4.1.25 Elektrophoretische Auftrennung von RNA im Formaldehydgel

Puffer für ein Formaldehydgel

<u>10 x MOPS-Puffer:</u>	MOPS	41,8 g
	DEPC-H ₂ O	800 ml
	mit 5 M NaOH auf pH 7,0 einstellen	
	3,0 M NaAc	16 ml
	<u>0,5 M EDTA pH 8,0</u>	<u>20 ml</u>
	ad 1000 ml DEPC-H ₂ O	
<u>Formamid (deionisiert):</u>	Formamid	100 ml
	Mixed Bed Resin (BioRad)	10 g
	Das Gemisch wird bis zur Farbänderung (blau→golden) gerührt, filtriert und bei -20°C gelagert	
<u>Bromphenolblau-Lsg.:</u>	Glycerin (80 %)	100 µl
	BPB, gesättigte Lsg. in H ₂ O	80 µl
<u>RNA-Probenpuffer:</u>	Formamid (deionisiert), Formaldehyd (37 %), 10 x MOPS, BPB-Lsg. im Verhältnis 4:2:2:1	

Herstellung eines Formaldehydgels

- 1,0 g Agarose wird in 100 ml 1 x MOPS-Puffer aufgekocht und nach Abkühlen auf ca. 50°C mit 3 ml Formaldehyd (37 %, pH > 4,0) und 8 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) versetzt
- anschließend wird das Gel in einer mit DEPC-H₂O gespülten Gelkammer gegossen
- man lässt das Formaldehydgel 30 min. erstarren und gibt dann den Laufpuffer 1 x MOPS zu
- pro aufzutragende Spur werden 2 - 6 µg RNA in 6,7 µl DEPC-H₂O mit 15,3 µl Probenpuffer vermischt
- zur Denaturierung werden die Proben für 5 min. auf 65 - 70 °C erhitzt und anschließend auf Eis gestellt
- die elektrophoretische Auftrennung erfolgt bei ca. 100 Volt / 80 mA, bis die BPB-Front knapp 2/3 der Gelstrecke zurückgelegt hat
- alle Arbeitsschritte werden unter dem Abzug durchgeführt, da durch die Erwärmung toxische Formaldehyddämpfe freigesetzt werden
- nach Beendigung des Laufs wird die RNA unter UV-Licht betrachtet und fotografiert

Mittlerweile hat sich gezeigt, dass zur Kontrolle der isolierten RNA ein frisch gegossenes 3%iges Agarosegel (Kap. 4.1.7; ca. 100 Volt / 80 mA) ausreichend ist und eine mit dem Formaldehydgel vergleichbar gute Auftrennung der RNA erreicht wird.

4.1.26 Reverse Transkription (RT) und PCR mit cDNA

Der Ausdruck cDNA steht für komplementäre DNA, d.h. der Ursprung der DNA liegt nicht in der DNA selbst, sondern in der RNA. Retroviren, wie z.B. Vogel-Leukämie-Virus, Maus-Leukämie-Virus oder HIV, enthalten ein RNA-Genom, das mit Hilfe der Virus-codierten reversen Transkriptase (RNA-abhängige DNA-Polymerase) in einer eukaryotischen Zelle in dsDNA umgeschrieben werden kann.

Die reverse Transkriptase ist ein äußerst nützliches Werkzeug in der molekularen Genetik geworden, denn nicht nur virale RNA-Moleküle, sondern jede beliebige RNA wird unter geeigneten Bedingungen als Matrize von der reversen Transkriptase akzeptiert. Auf diese Weise lassen sich DNA-Kopien von mRNA-Molekülen herstellen.

Das Protokoll vom 1st Strand Synthesis Kit, das eigentlich für die RNA von eukaryotischen Zellen vorgesehen ist, wurde in dieser Arbeit für prokaryotische mRNA angewendet. Der 1st Strand Buffer und die reverse Transkriptase wurden von Stratagene bezogen. Die M-MuV-RT ist ein Produkt des *pol*-Gens des *Moloney-Murine-Leukämie-Virus* und besitzt zwei Aktivitäten:

- ⇒ eine 5'-3'-primerabhängige Polymeraseaktivität
- ⇒ eine 3'-5'-RNaseH-Aktivität, die den RNA-Anteil des RNA-DNA-Hybrids abbaut.
Durch Zugabe des RNase-Inhibitors wird diese Aktivität jedoch gehemmt.

Reverse Transkription mit der M-MuLV-RT

- 0,05 – 10,0 µg RNA (je nach RNA-Isolierung und untersuchten Genen) werden in 35 µl DEPC-H₂O aufgenommen, wobei im H₂O die verschiedenen spezifischen Downstream-Primer, die invers am 3'-Ende der mRNA binden, schon enthalten sind
- in einem RT-Ansatz werden mehrere Primer (je 3 µl Primer mit einer Konz. von 100 ng/µl) gleichzeitig verwendet; es sollten aber pro RT-Ansatz nicht mehr als 8 Primer verwendet werden
- der Ansatz wird 5 min. bei 65°C inkubiert, damit die Sekundärstruktur der RNA zerstört wird und die Primer an die komplementäre mRNA-Sequenz binden können
- dann lässt man den Ansatz 10 min. bei RT abkühlen und pipettiert anschließend in folgender Reihenfolge:

10 x 1st Strand Buffer	5 µl
0,1 M DTT	5 µl
RNase-Inhibitor (Pharmacia)	1 µl
gut mischen	
dNTPs 25 mM	3 µl
M-MuLV-RT (20 U/µl)	1 µl

- der Gesamtansatz wird gut gemischt und für 1 h bei 37°C inkubiert
- die fertige cDNA kann entweder sofort für die PCR eingesetzt oder bei -20°C eingefroren werden

PCR mit cDNA

Die PCR mit der durch reverse Transkription entstandenen cDNA lässt eine semiquantitative Analyse der mRNA-Konzentration zu. Wählt man für die PCR eine geeignete Verdünnung der entstandenen cDNA aus, so kann die PCR anhand der Stärke der DNA-Bande im Agarosegel die Menge an mRNA-Transkript widerspiegeln. Für die PCR wurden cDNA-Verdünnungen von 1:10, 1:50 und 1:100 eingesetzt, da in diesem Bereich noch keine Sättigung der PCR auftrat und somit Aussagen über die Transkriptionsstärke gemacht werden konnten.

Standard-PCR-Ansatz:	cDNA	5,0 µl
	Silverstar Polymerase Puffer 10 x	10,0 µl
	MgCl ₂ 25 mM	6,0 µl
	dNTPs 20 mM	1,0 µl
	Primer I (0,5 µg/µl)	1,0 µl
	Primer II (0,5 µg/µl)	1,0 µl
	Silverstar Polymerase (5 U/µl)	0,1 µl
	ad 100 µl H ₂ O _{steril}	

Standard-PCR-Bedingungen:	94°C / 3 min. first step delay	} 30 Zyklen
	94°C / 1 min. Denaturierung	
	54°C / 1 min. Annealing	
	72°C / 1 min. Elongation	
	72°C / 3 min. last step delay	

Bei der PCR mit cDNA wurden von den Standard-PCR-Bedingungen abweichende Zeiten und Annealingtemperaturen verwendet.

4.2 Zellkultur

Eukaryotische Zellen werden im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂ in speziellen Petrischalen oder Kulturflaschen gehalten. Die verwendeten Puffer und Medien werden stets auf 37°C vorgewärmt.

<u>RPMI-Komplettmedium:</u>	FCS (fötale Kälberserum, hitzeinaktiviert)	50 ml
	L-Glutamin (Stammlsg. 200 mM)	5 ml
	<u>Penicillin-Streptomycin-Lsg. (P: 500 U/ml; S: 5 mg/ml)</u>	<u>5 ml</u>
	ad 500 ml RPMI 1640-Medium	

<u>RPMI-Komplettmedium ohne Antibiotikum:</u>	FCS (fötale Kälberserum, hitzeinaktiviert)	50 ml
	<u>L-Glutamin (Stammlsg. 200 mM)</u>	<u>5 ml</u>
ad 500 ml RPMI 1640-Medium		

<u>10 x PBS:</u>	NaCl	80,0 g
	KCl	2,0 g
	Na ₂ HPO ₄	11,5 g
	<u>KH₂PO₄</u>	<u>2,0 g</u>
	ad 1000 ml H ₂ O _{dest.}	

<u>10 x Ca²⁺/Mg²⁺:</u>	MgCl ₂ x 6 H ₂ O	1,0 g
	<u>CaCl₂</u>	<u>1,0 g</u>
	ad 1000 ml H ₂ O _{dest.}	

<u>PBS + Ca²⁺/Mg²⁺:</u> nicht autoklavieren	10 x PBS	100 ml
	<u>10 x Ca²⁺/Mg²⁺</u>	<u>100 ml</u>
	ad 1000 ml H ₂ O _{dest.}	

<u>Trypsin/EDTA-Lösung:</u>	Trypsin	0,5 %
	<u>EDTA</u>	<u>0,2 %</u>
	PBS	

4.2.1 Auftauen und Einfrieren von eukaryotischen Zellen (77)

Auftauen eukaryotischer Zellen

Man lagert eukaryotische Zellen in flüssigem Stickstoff. Dort können die Zellen über mehrere Jahre aufbewahrt werden. Das den Eukaryotenzellen zugesetzte Gefrierschutzmittel DMSO (Dimethylsulfoxid, 10 %) verhindert dabei die Entstehung von intrazellulären Eiskristallen. Da DMSO zytotoxisch ist, ist es wichtig, das Medium so bald wie möglich zu wechseln.

- die in flüssigem Stickstoff gelagerten Zellen werden bei 37°C im Wasserbad aufgetaut und sofort in einer Flasche mit 10 ml vorgelegtem Kulturmedium ausgesät
- nach 3 - 6 h überprüft man, ob sich die Zellen am Flaschenboden abgesetzt haben und wechselt dann das (noch DMSO enthaltende) Medium

Einfrieren eukaryotischer Zellen

- zunächst werden die Zellen durch Trypsinisieren (MDBK, TIB-73) oder Abschaben (J774) (Kap. 4.2.2) abgelöst
- dann wird die Zellzahl bestimmt (Kap. 4.2.3) und auf 2 - 4 x 10⁶ Zellen/ml eingestellt
- auf Eis werden jeweils 900 µl Zellsuspension in einem Kryoröhrchen mit 100 µl DMSO versetzt und ÜN bei -80°C eingefroren, bevor sie in flüssigem Stickstoff aufbewahrt werden.

4.2.2 Subkultivierung von eukaryotischen Zellen

Trypsinisierung von MDBK- und TIB73-Zellen

- das Medium wird aus der Kulturflasche (250 ml) abgesaugt und die Zellen 1 x mit 10 ml 1 x PBS ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ gewaschen (zur Entfernung von Ca^{2+} - und Mg^{2+} -Ionen aus dem Medium)
- man gibt 2 ml Trypsin/EDTA-Lösung auf die Zellen und inkubiert für 1 min bei RT (das EDTA fängt die Ca^{2+} -Ionen ab und verhindert so, dass diese das Trypsin inhibieren)
- anschließend wird die überschüssige Trypsin/EDTA-Lösung abgezogen und die Zellen für ca. 5 min. im Brutschrank (37°C; 5 % CO_2) inkubiert
- sobald man das Ablösen der Zellen in Form von "weißen Schlieren" beobachten kann, werden die Zellen in 10 ml Kulturmedium resuspendiert und 2 ml der Suspension in einer neuen Kulturflasche mit 20 ml vorgelegtem Kulturmedium ausgesät

Splitten von J774-Makrophagen

- das Medium wird aus der Kulturflasche (250 ml) abgesaugt und die Zellen 1 x mit 10 ml 1 x PBS ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ gewaschen
- es werden 10 ml Kulturmedium hinzugegeben
- mit Hilfe einer gebogenen Pasteurpipette (die Pasteurpipette wird wie ein Drigalski-Spatel über der Gasflamme gebogen) werden die Zellen vom Flaschenboden abgeschabt
- anschließend werden die Zellen resuspendiert und in Kulturflaschen mit vorgelegtem Komplettmedium verteilt

4.2.3 Bestimmung der Lebendzellzahl (LZZ)

Eine Differenzierung zwischen lebenden und toten Zellen erfolgt mittels des Farbstoffes Trypanblau. Bei toten Zellen dringt der Farbstoff durch die Zellwand in die Zelle ein und diese werden deshalb blau gefärbt. Lebende Zellen nehmen Trypanblau jedoch nur sehr langsam auf und sind deshalb unter dem Mikroskop als weiße Zellen sichtbar.

Die Bestimmung der Lebendzellzahl erfolgt mit Hilfe der Neubauer improved-Zählkammer:

- 20 μl der abtrypsinisierten bzw. abgeschabten Zellen (Kap. 4.2.2) werden mit 20 μl Trypanblau gemischt und in der Zählkammer ausgezählt
- es werden 2 Großquadrate mit je 25 Kleinquadraten ausgezählt
- die Lebendzellzahl wird folgendermaßen berechnet:

$$\text{Lebendzellzahl/ml} = 2 \text{ Großquadrate} \times 10^4$$

4.2.4 Infektion von Säugerzellen mit Listerien

Herstellung von Bakterienaliquots

Um vergleichbare Bakterienzahlen bei der Infektion eukaryotischer Zellen zu erhalten, wurden Bakterienaliquots angelegt, die für alle nachfolgenden beschriebenen Infektionsversuche verwendet wurden.

Einfrriermedium: 1 x PBS + 20 % Glycerin

- eine Listerien-ÜNK wird 1:25 mit BHI-Medium auf 25 ml verdünnt und bis zur spät-logarithmischen Phase (180 KE) hochgezogen
- man entnimmt 20 ml und zentrifugiert für 10 min. bei 6000 rpm, 4°C
- anschließend werden die Bakterien 2 x mit 1 x PBS gewaschen, erneut abzentrifugiert (10 min., 10000 rpm, 4°C) und in 30 ml 1 x PBS + 20 % Glycerin aufgenommen
- man aliquotiert die Bakteriensuspension und bewahrt die Eppendorfcaps bei -80°C auf
- am nächsten Tag wird eine Verdünnungsreihe angelegt und verschiedene Verdünnungsstufen auf BHI-Platten ausplattiert, um die Lebendzellzahl der Bakterienaliquots zu bestimmen

$$\text{Lebendzellzahl/ml} = \text{gezählte Kolonien} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10$$

Infektion von MDBK-Zellen

Die Zellen werden vor der Infektion über Nacht in antibiotikumfreiem RPMI-Komplettmedium in 250 ml-Zellkulturflaschen inkubiert. Zur Infektion werden Aliquots (Kap. 4.2.4) von Listerien (*L. ivanovii* ATCC19119 und *L. ivanovii* PDC22) eingesetzt.

MOI: Die MOI (multiplicity of infection) betrug in den durchgeführten Infektionen 10:1 und 50:1. Dies bedeutet, dass auf eine MDBK-Zelle 10 bzw. 50 Bakterienzellen kommen.

Infektionsdauer: Die Initialinfektion betrug 45 min., anschließend wurde eine 5stündige Infektion durchgeführt.

- die Zellen einer Kulturflasche werden abtrypsinisiert (Kap. 4.2.2) und die Lebendzellzahl bestimmt (Kap. 4.2.3)
- anhand der Lebendzellzahl wird die MOI für die Infektion ausgerechnet und anschließend ein Bakterienaliquot auf Eis aufgetaut
- aus einer weiteren Kulturflasche wird das Medium abgesaugt und die MDBK-Zellen 1 x mit 10 ml 1 x PBS + $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ gewaschen
- es werden 20 ml Kulturmedium ohne Antibiotikum und FCS mit einer entsprechenden Menge Bakterienaliquot (abhängig von MOI) gemischt und in die Kulturflasche pipettiert
- man inkubiert 45 min. im Brutschrank (37°C; 5 % CO_2) (Initialinfektion)
- anschließend werden die Zellen 2 x mit 10 ml 1 x PBS + $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ gewaschen, 20 ml frisches Medium mit FCS und 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Gentamycin (zur Abtötung extrazellulärer Bakterien) zugegeben und wieder im Brutschrank (37°C; 5 % CO_2) inkubiert; ab diesem Zeitpunkt beginnt die eigentliche Infektionszeit
- nach 1 h zieht man das Medium wieder ab, pipettiert 20 ml RPMI mit FCS und 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Gentamycin in die Flasche und inkubiert diese weitere 4 h im Brutschrank (37°C; 5 % CO_2)
- nach Infektionsende (5 h) entfernt man das Medium und wäscht die Zellen 2 x mit 1 x PBS + $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$
- zur Lyse der MDBK-Zellen gibt man 10 ml eiskaltes $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ zu und inkubiert die Kulturflasche kurze Zeit auf Eis bzw. bei -20°C
- zum besseren Lysieren kann die Flasche zusätzlich geschüttelt werden, bis ein Ablösen der Zellen vom Flaschenboden sichtbar wird; zusätzlich sollte unter dem Mikroskop kontrolliert werden, dass die Zellen lysiert sind und sich komplett vom Flaschenboden abgelöst haben
- anschließend überführt man die Zellsuspension in ein 15 ml-Greiner-Röhrchen, vortext gut und nimmt 100 μl von der Zellsuspension ab, um eine Verdünnungsreihe anzulegen
- von der Verdünnungsreihe werden je 100 μl der Verdünnungsstufen 10^{-3} und 10^{-4} auf je 2 BHI-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert
- am nächsten Tag zählt man die Platten aus und kann die tatsächliche intrazelluläre Zellzahl bestimmen:

intrazelluläre Zellzahl/ml = gezählte Kolonien x Verdünnungsstufe (10^{-3} bzw. 10^{-4}) x 10

intrazelluläre Zellzahl/Flasche = gezählte Kolonien x Verd.stufe (10^{-3} bzw. 10^{-4}) x 10 x 10

- die lysierten Zellen werden in ein 15 ml-Greiner-Röhrchen überführt und 15 min. bei 6000 rpm und 4°C abzentrifugiert
- das Pellet wird bei -80°C eingefroren und kann so längere Zeit gelagert werden

Infektion von TIB-73-Zellen

Die Infektion erfolgt analog zur Infektion der MDBK-Zellen, es wurde zur Lyse der Zellen allerdings längere Zeit auf Eis bzw. bei -20°C inkubiert, da sich die Zellen schlechter ablösen ließen.

MOI: Die MOI (multiplicity of infection) betrug in den durchgeführten Infektionen 10:1. Dies bedeutet, dass auf eine TIB-73-Zelle 10 Bakterienzellen kommen.

Infektionsdauer: Die Initialinfektion betrug 45 min., anschließend wurde eine 5stündige Infektion durchgeführt.

Infektion von J774-Makrophagen

Die Infektion erfolgt analog zur Infektion der MDBK-Zellen, es wurde zur Lyse der Zellen jedoch nicht auf Eis bzw. bei -20°C inkubiert, da sich die Zellen schon bei Zugabe von eiskaltem $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ ablösen und lysieren.

MOI: Die MOI (multiplicity of infection) betrug in den durchgeführten Infektionen 10:1. Dies bedeutet, dass auf eine J774-Zelle 10 Bakterienzellen kommen.

Infektionsdauer: Die Initialinfektion betrug 45 min., anschließend wurde eine 5stündige Infektion durchgeführt.

4.2.5 Intrazelluläre RNA-Isolierung (53)

Die Isolierung intrazellulärer RNA erfolgt mit Hilfe des E.Z.N.A.[®] Bacterial RNA Kits (PeqLab), wobei das Protokoll des Herstellers leicht abgewandelt wurde, da für die Lyse der Zellen der RNA-FastPrep eingesetzt wurde (Kap. 4.1.22).

- das Pellet der eingefrorenen Zellen wird auf Eis aufgetaut, in 200 µl BRL-Puffer resuspendiert und mit 1 ml TRK-Puffer (+ 20 µl β-Mercaptoethanol/ml TRK) gemischt
- man überführt die Lösung in ein FastRNA-Cap mit Glaskügelchen und lysiert die Zellen im RNA-FastPrep (Speed 6,5; Zeit 45 s; 2 – 3 x); um ein starkes Erwärmen der Lösung zu vermeiden, wird das Cap zwischen den einzelnen Vorgängen kurze Zeit auf Eis inkubiert
- die Zelltrümmer und Glaskügelchen werden für 1 min. bei 15000 rpm abzentrifugiert, der die RNA enthaltende Überstand abgenommen und mit 0,83 Volumen absolutem EtOH gemischt; hier kann es bei großen RNA-Mengen möglich sein, dass schon bei Zugabe von EtOH RNA in Form von weißen, fadenförmigen Schlieren ausfällt; diese muss dann auch auf die Säulen überführt werden
- man verteilt die RNA-Lösung auf 2 Säulen (evt. 3 Säulen, wenn zuvor schon RNA ausgefallen ist) und führt nachfolgend die RNA-Isolierung nach Anleitung des Herstellers durch
- die isolierte RNA wird anschließend mit DNase behandelt (Kap. 4.1.23) und kann aliquotiert bei -80°C aufbewahrt werden

4.3 Untersuchung des Wachstumsverhaltens von *Listeria ivanovii*

4.3.1 Wachstum bei 20°C und 37°C

- eine bei 37°C gewachsene Listerien-ÜNK wird 1:10 verdünnt (2 Ansätze) und je 1 Kolben bei 20°C bzw. 37°C im Schüttler (190 rpm) inkubiert
- in regelmäßigen Abständen werden bei beiden Kolben die optische Dichte im Klett-Photometer bzw. im Photometer bei 600 nm gemessen und notiert
- man lässt die Listerien bis zur stationären Phase wachsen und kann dann anhand der gemessenen Werte eine Wachstumskurve erstellen
- alternativ kann bei einer optischen Dichte von 180 – 200 KE (OD₆₀₀ von 1,0; spät-logarithmische Wachstumsphase) die Bakterienkultur abzentrifugiert werden (15 min., 20° bzw. 37°C, 6000 rpm) und das Pellet für die spätere RNA-Isolierung bei -80°C gelagert werden

4.3.2 Wachstum mit und ohne MEM ("MEM-Shift")

- eine Listerien-ÜNK wird 1:10 mit BHI verdünnt und bei 37°C im Schüttler inkubiert
- bei einer optischen Dichte von 180 – 200 KE (OD₆₀₀ von 1,0; spätlogarithmische Wachstumsphase) werden die Listerien auf 2 Greinerröhrchen aufgeteilt und für 15 min. bei 37°C und 6000 rpm abzentrifugiert
- das Pellet des einen Ansatzes wird nach dem Abzentrifugieren für die spätere RNA-Isolierung bei -80°C aufbewahrt
- das zweite Pellet wird 1 x mit 1 x PBS gewaschen und erneut abzentrifugiert (15 min., 37°C, 6000 rpm)
- anschließend resuspendiert man das Pellet in 10 ml MEM, gibt die Lösung in eine Zellkulturflasche und inkubiert diese 30 min. im Zellkulturbrutschrank (37°C, 5 % CO₂)
- nach der 30minütigen Inkubation werden die Bakterien abzentrifugiert (15 min., 37°C, 6000 rpm) und das Pellet für die spätere RNA-Isolierung bei -80°C aufbewahrt

4.3.3 MIC-Test

Wenn keine genaue Angabe vorhanden ist, welche Antibiotikumkonzentration die zu untersuchenden Bakterien noch tolerieren, so kann man dies durch sog. Gradientenplatten (Kap. 3.3) testen. Eine weitere Methode zur Bestimmung der minimalen inhibitorischen Konzentration (MIC) ist der sog. MIC-Test.

- man verdünnt eine Bakterien-ÜNK 1: 100 und pipettiert davon je 50 µl in 10 Kapsenbergröhrchen mit je 5 ml vorgelegtem Medium
- anschließend gibt man eine Antibiotikumlösung zu, die zuvor in Zwischenschritten verdünnt wurde und erhält so eine Reihe von Röhrchen mit abnehmender Antibiotikumkonzentration
- die Röhrchen werden über Nacht bei 37°C im Schüttler inkubiert und am nächsten Tag auf Trübung (= Bakterienwachstum) untersucht; die minimale inhibitorische Konzentration des Antibiotikums kann nun durch das erste Röhrchen, bei dem kein Bakterienwachstum mehr auftritt, bestimmt werden

5 Ergebnisse

Wie im Abschnitt Zielsetzung ausgeführt, sollte zunächst der in verschiedenen Mutanten des *L. ivanovii*-Typstamms ATCC19119 spontan deletierte Chromosomenbereich molekular charakterisiert werden. Dazu wurde die *L. ivanovii*-Mutante GD-3 verwendet. Diese war, wie bereits erwähnt, in der Arbeitsgruppe des spanischen Kooperationspartners durch G. Domínguez-Bernal nach einmonatiger Stationärphasen-Kultivierung eines wildtypischen *L. ivanovii*-Stammes unter Temperaturstress (41,5°C) erhalten worden. Wie die ebenfalls erwähnte Mutante 44/2 fiel auch die Mutante GD-3 durch einen nur schwach hämolytischen Phänotyp auf, vergleichbar etwa dem Hämolyseverhalten von *L. monocytogenes* (60).

Wie bei 44/2 war auch im Kulturüberstand von GD-3 keine Sphingomyelinase-Aktivität und auch nicht das normalerweise stark exprimierte Protein i-InIE nachweisbar. Weiterhin konnten weder das Sphingomyelinase-Gen *smcL* noch die benachbarten Gene *i-inlF* und *i-inlE* oder das schon früher identifizierte "Open Reading Frame 3" in PCR-Reaktionen mit GD-3-DNA als Template amplifiziert werden. Dies ließ den Schluss zu, dass bei der Mutante GD-3 mit großer Wahrscheinlichkeit ein zusammenhängender Chromosomenabschnitt von wenigstens 5 kb spontan deletiert war. Mittels Pulsfeld-Gelelektrophorese konnte G. Domínguez-Bernal die Gesamtgröße des deletierten Bereichs auf etwa 18-20 kb festlegen. In Abb. 5.1 ist schematisch dargestellt, was bei Beginn dieser Arbeit über den Aufbau des fraglichen Genombereichs bekannt war.

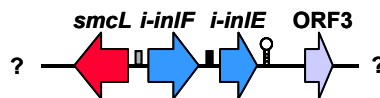


Abb. 5.1: Kenntnisstand bei Beginn der Arbeit über die Genomstruktur von *L. ivanovii* im Deletionsbereich der Mutante GD-3

Dargestellt sind die deletierten Gene bzw. ORFs, die in *L. ivanovii* GD-3 nicht mehr vorhanden sind. Über das Ende der Deletion war zu diesem Zeitpunkt jedoch noch nichts bekannt.

smcL: Gen für die Sphingomyelinase

i-inlF, *i-inlE*: Gene für die kleinen Internaline F und E

ORF3: Open Reading Frame 3, Funktion unbekannt

? flankierende Chromosomenbereiche unbekannter Sequenz

In Zusammenarbeit mit den Kooperationspartnern an der "Universidad Complutense de Madrid", insbesondere mit G. Domínguez-Bernal, sollten dieser gesamte deletionsanfällige Genombereich von *L. ivanovii* sequenziert und vor allem zunächst die genauen Deletionsbruchpunkte bestimmt werden. Eventuelle Besonderheiten der DNA-Bereiche um die Deletionsbruchpunkte wie Repeat-Regionen oder Insertionselemente sollten dabei Hinweise auf den Deletionsmechanismus liefern. Da die bereits charakterisierten Gene in dieser Region (*smcL*, *i-inlF*, *i-inlE*) offensichtlich eine Funktion in der Virulenz von *L. ivanovii* haben (69, 95), stellte sich weiterhin die Frage, ob in dem spontan deletierbaren Genombereich weitere Virulenz-assoziierte Gene liegen und ob Hinweise auf eine Herkunft dieser Region aus einem horizontalen Gentransfer von anderen Mikroorganismen gefunden werden können.

Um diesen umfangreichen Fragenkomplex rasch bearbeiten zu können, wurde eine Arbeitsteilung mit dem spanischen Kooperationspartner vereinbart. Dabei sollte der downstream (in der obigen Darstellung links) von *smcL* gelegene Bereich in Madrid, der upstream (rechts) gelegene Genomabschnitt in der vorliegenden Arbeit sequenziert und charakterisiert werden.

5.1 Sequenzierung des unbekanntes, in der Mutante GD-3 deletierten Bereichs upstream (rechts) von *smcL*

Zur Gewinnung von DNA-Fragmenten aus der gewünschten Region wurde das sogenannte "Genome Walking" eingesetzt. Damit können, ausgehend von bekannten DNA-Sequenzen, angrenzende Chromosomenabschnitte schrittweise isoliert und somit einer Analyse zugänglich gemacht werden.

5.1.1 Suche nach dem rechten Ende der Deletion mittels Genome Walking

Im Laufe dieser Arbeit wurden mehrere Verfahren des Genome Walkings (Kap. 4.1.19) getestet. Mit der Methode der Vektorette erhielt man nur kleine PCR-Produkte, die zum Teil nicht spezifisch waren. Ein weiteres Verfahren des Genome Walkings war die Amplifikation aus chromosomaler DNA mit sog. Semi-random Primern, durch das man allerdings sehr viele unspezifische Nebenbanden in den PCRs erhielt.

Am erfolgreichsten zeigte sich das Genome Walking mit dem Universal GenomeWalker™ Kit von Clontech. Mit Hilfe dieses Kits war es möglich, größere Bereiche im listeriellen Genom zu "überspringen", d.h. von der bekannten Sequenz aus gezielt zu isolieren.

Zunächst wurde chromosomale DNA mit verschiedenen Restriktionsenzymen (*EcoRV*, *HpaI*, *PvuII*, *NruI*, *StuI*) blunt end verdaut und anschließend an den GenomeWalker Adaptor ligiert. So erhielt man verschiedene GenomeWalker "Libraries", aus denen dann der gesuchte DNA-Bereich mittels PCR amplifiziert wurde. Für die erste PCR wurde ein Gen-spezifischer Primer (CORF4.1) aus der Sequenz downstream des Open Reading Frames ORF3 gewählt und als zweites Oligonukleotid der sog. Adaptor Primer (AP1) verwendet, der im Kit mitgeliefert wurde und an den GenomeWalker Adaptor bindet. Anschließend wurde eine zweite, sog. "nested" PCR durchgeführt, wobei das Produkt der ersten PCR 1:50 verdünnt als Template eingesetzt wurde. Auf diese Weise konnten geeignete Fragmente angereichert werden.

Die so erhaltenen PCR-Produkte wurden dann ohne vorherige Klonierung mit dem Gen-spezifischen und Adaptor Primer direkt sequenziert. Aus der Sequenz wurde ein neuer Gen-spezifischer Primer für eine weitere Genome Walking-PCR ausgewählt.

So konnten durch verschiedene PCRs mehrere geeignete Fragmente (Tab. 5.1) identifiziert und sequenziert werden. Vor allem mit den Restriktionsenzymen *EcoRV* und *NruI* konnten brauchbare Genome Walking-Fragmente identifiziert werden. Allerdings lag die Größe der PCR-Produkte unter den im Universal GenomeWalker™ Kit angegebenen Fragmentgrößen (bis zu 6 kb). In dieser Arbeit wurden maximal 2,6 kb erreicht.

StuI stellte sich als ungeeignetes Enzym für die Herstellung einer Genome Walker "Library" in *L. ivanovii* heraus, da in keiner PCR Produkte amplifiziert werden konnten.

Genome Walker "Library"	<i>EcoRV</i>	<i>HpaI</i>	<i>PvuII</i>	<i>NruI</i>	<i>StuI</i>
1. PCR: CORF4.1 x AP2	~ 2,6 kb	(~ 600 bp)	(~ 600 bp)	-	-
2. PCR: LIPI2-3 x AP1	(~ 550 bp)	-	(~ 1,0 kb)	~ 1,1 kb	-
3. PCR: LIPI2-4 x AP1	(~ 300 bp)	(~ 800 bp)	(~ 350 bp)	~ 400 bp	-
4. PCR: LIPI2-5 x AP1	~ 1,7 kb	-	(~ 750 bp)	-	-
5. PCR: LIPI2-6 x AP1	(~ 500 bp)	~ 0,7 kb	(~ 750 bp)	-	-

Tab. 5.1: Überblick über die Genome Walker-PCRs in *L. ivanovii* ATCC19119

EcoRV, *HpaI*, *PvuII*, *NruI*, *StuI*: "blunt end"-Restriktionsenzyme, mit denen die GenomeWalker "Libraries" hergestellt wurden

Dick gedruckt findet man die sequenzierten Fragmente, in Klammern sind weitere GenomeWalking-Produkte dargestellt, die aber aufgrund zu geringer Größe bzw. wegen unspezifischer Sequenzen nicht weiter berücksichtigt wurden.

Da die Genome Walking-Fragmente überlappen, konnte eine zusammenhängende Sequenz von ca. 5,5 kb (Abb. 5.2) hergestellt werden.

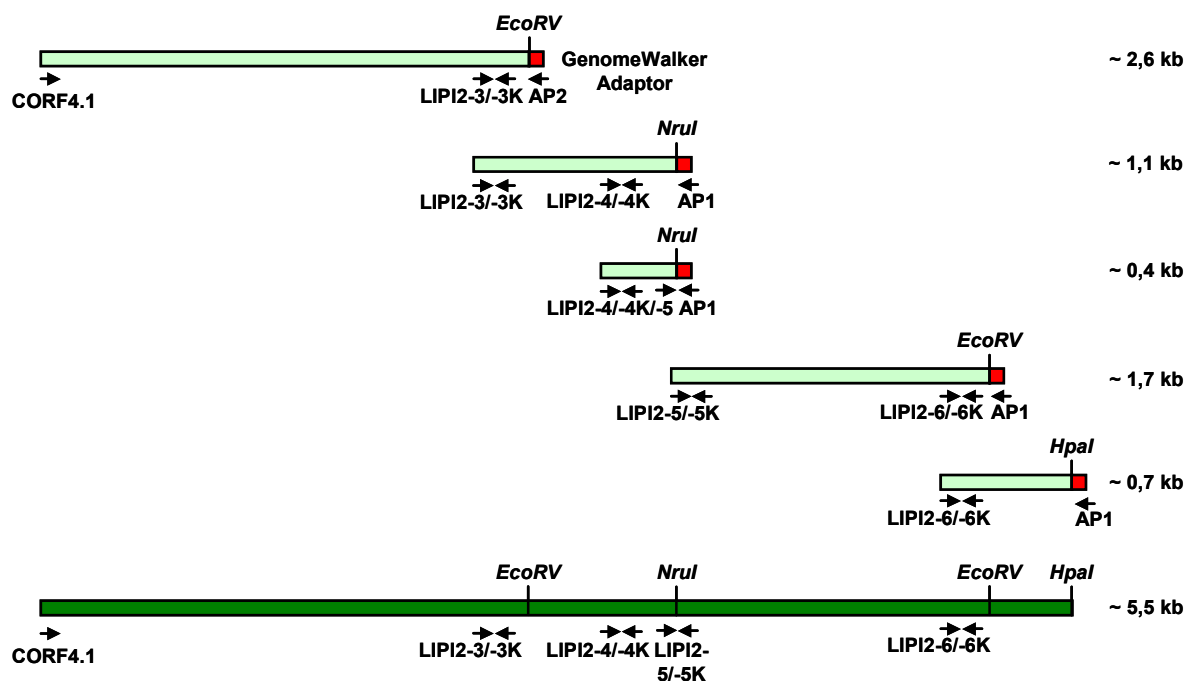


Abb. 5.2: Übersicht über die durch das Genome Walking erhaltenen Fragmente

→, ← für das Genome Walking bzw. die Kontroll-PCRs verwendete Oligonukleotide

In hellgrün sind die einzelnen Genome Walking-Fragmente mit ligiertem Adaptor (rot) dargestellt, in dunkelgrün findet sich die aus den Einzelfragmenten zusammengesetzte Sequenz.

Am rechten Rand der Graphik ist die Größe der einzelnen DNA-Fragmente angegeben.

Zusätzlich wurden nach jeder Genome Walking-PCR Oligonukleotide aus der erhaltenen Sequenz ausgewählt. Mit diesen wurden Kontroll-PCRs mit *L. ivanovii* ATCC19119 und der Deletionsmutante *L. ivanovii* GD-3 durchgeführt, um zu überprüfen, ob die erhaltene Sequenz noch innerhalb der Deletion oder schon außerhalb lag. Die verwendeten Primerkombinationen sind in Abb. 5.2 und Tab. 5.2 zu sehen.

Bei allen in Tab. 5.2 gezeigten PCRs konnte bei *L. ivanovii* GD-3 kein PCR-Produkt nachgewiesen werden. Dies bedeutet, dass die ausgewählten Oligonukleotide auf einem Genomabschnitt liegen, der in der Mutante noch deletiert ist.

Kontroll-PCR	<i>L. ivanovii</i>	<i>L. ivanovii</i> GD-3
LIPI2-3 x LIPI2-3K	+	-
LIPI2-4 x LIPI2-4K	+	-
LIPI2-5 x LIPI2-5K	+	-
LIPI2-6 x LIPI2-6K	+	-

Tab. 5.2: Kontroll-PCRs zur Überprüfung der Deletion

+ PCR-Produkt vorhanden

- kein PCR-Produkt nachweisbar, d.h. Primer liegen innerhalb der Deletion

Im Laufe der Genome Walking- und Sequenzierungsarbeiten konnte beim spanischen Kooperationspartner das linke Ende der Deletion identifiziert werden. Durch geeignete PCRs wurde dann auch das rechte Deletionsende bestimmt. Für die weitere Sequenzierung des rechten deletierten Bereichs wurde von G. Domínguez-Bernal ein Primerpaar (ED-4 x ED-5) zur Verfügung gestellt, mit dem in dieser Arbeit weitere DNA-Fragmente amplifiziert werden konnten.

5.1.2 Sequenzierung des rechts von *smcL* liegenden Bereichs

Die in Abb. 5.2 gezeigte Sequenz enthielt noch große Bereiche mit nicht sequenzierter DNA. Aus diesem Grund wurden Teile dieser Sequenz mit geeigneten Oligonukleotiden nochmals durch PCR amplifiziert und sequenziert. Zudem mussten etliche Bereiche nachsequenziert werden, um fragliche Sequenzen zu überprüfen. Zusätzlich wurden mit den aus Madrid zur Verfügung gestellten Primern ED-4 und ED-5 PCRs durchgeführt, um weitere Bereiche bis zum rechten Ende der Deletion abdecken zu können.

Vom Aufbau der Deletionsenden war zu diesem Zeitpunkt noch nichts bekannt. Deshalb sollte über den rechten Deletionsbruchpunkt hinaus noch ein weiteres Stück der genomischen DNA von *L. ivanovii* sequenziert werden, um den Deletionsbruchpunkt und dessen flankierende Bereiche genauer charakterisieren zu können.

In Abb. 5.3 ist ein Überblick über die durchgeführten PCRs und Sequenzierungsreaktionen gezeigt.

Mit den Oligonukleotiden CORF4.1 und LIPI2-5K wurde ein mit den Genome Walking-Fragmenten überlappendes PCR-Produkt von ca. 3,6 kb amplifiziert, um unsichere Sequenzabschnitte nochmals zu überprüfen.

Ein weiteres, ca. 4,1 kb großes Fragment wurde mit den von G. Domínguez-Bernal zur Verfügung gestellten Primern ED-4 und ED-5 hergestellt, wobei das Oligonukleotid ED-5 im bereits in dieser Arbeit sequenzierten Bereich lag. Zudem überlappt dieses Fragment zur Hälfte mit den Genome Walking-Sequenzen.

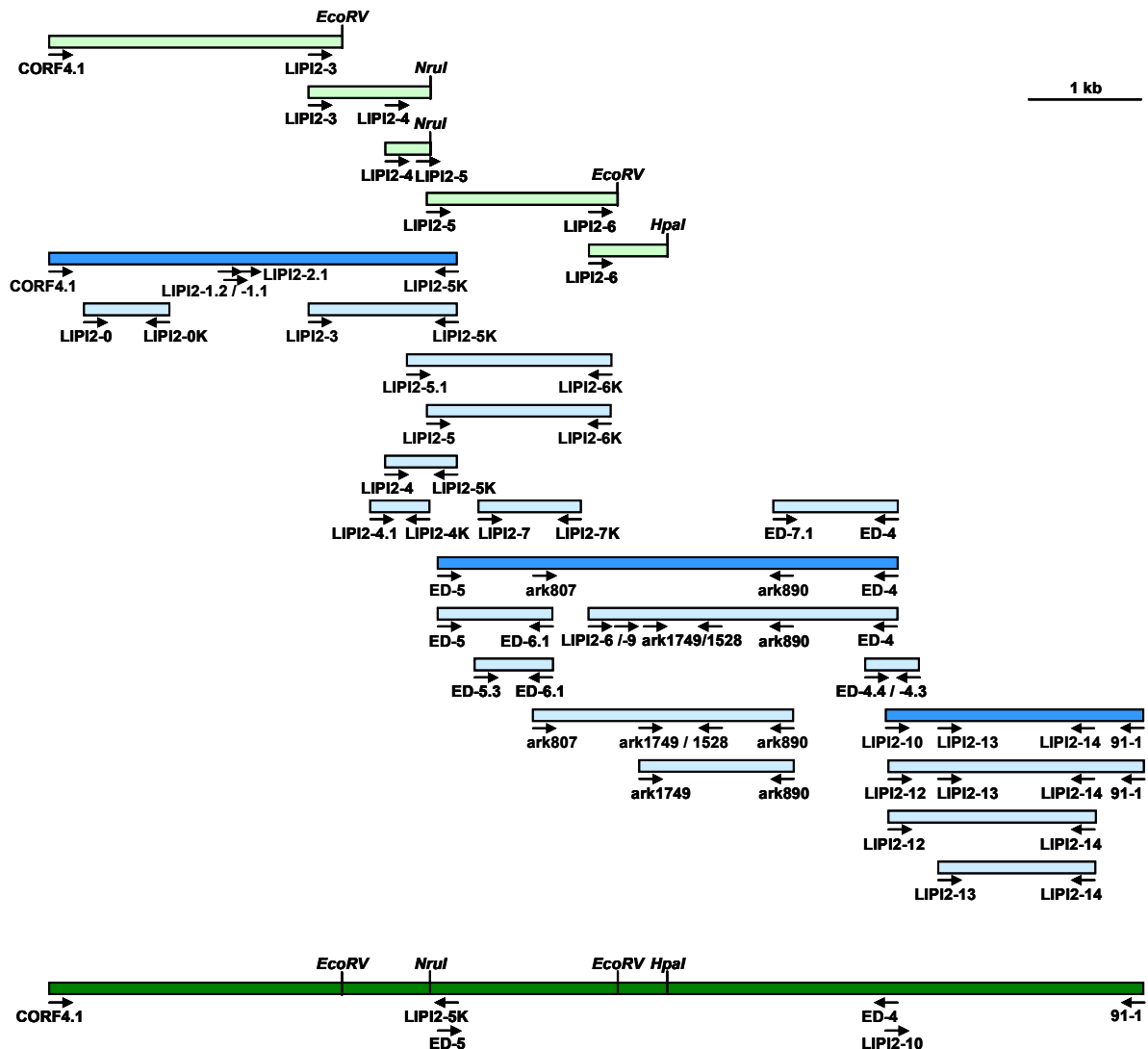


Abb. 5.3: PCRs und Sequenzierungsreaktionen im Bereich rechts von *smcL*

→, ← für die PCRs und Sequenzierungen verwendete Oligonukleotide

In hellgrün sind nochmals die aus Abb. 5.2 bekannten Genome Walking-Fragmente dargestellt.

In blau sind die zusätzlich durchgeführten PCRs gezeigt, wobei die dunkelblauen Fragmente die zuerst amplifizierten DNA-Bereiche darstellen. Zusätzlich wurden zahlreiche Fragmente (hellblau) nochmals amplifiziert, um unsichere Sequenzen zu überprüfen. Die für die Sequenzierungen eingesetzten Oligonukleotide sind bei den jeweiligen Fragmenten als Pfeile angegeben.

In dunkelgrün findet sich die aus den Einzelfragmenten zusammengesetzte Sequenz.

Als letztes wurde ein PCR-Produkt von ca. 2,2 kb amplifiziert, um weitere Informationen über die Bereiche rechts des Deletionsbruchpunkts zu erhalten. Durch die ersten Analysen sequenzierter Bereiche innerhalb der Deletion hatte sich herausgestellt, dass die identifizierten Gene bzw. Open Reading Frames (ORFs) nicht nur in *L. ivanovii*, sondern zum Teil auch in *L. monocytogenes* EGDe zu finden sind (Kap. 5.1.4). Deshalb wurden aus der durch das "Listeria Genome Sequencing Project" bekannten *L. monocytogenes* EGDe-Sequenz vier Oligonukleotide rechts des Deletionsendes ausgewählt und mit geeigneten Primern aus den Sequenzen von *L. ivanovii* kombiniert, um so mit PCR eventuell weitere Fragmente amplifizieren zu können. Wie in Abb. 5.4 gezeigt, stellte sich nur eines der vier getesteten *L. monocytogenes* EGDe-Oligonukleotide (Tab. 5.3) als geeignet für *L. ivanovii* heraus.

Primerkombination	<i>L. ivanovii</i>
LIPI2-10 x 91-1 (1)	+
LIPI2-10 x 91-2 (2)	-
LIPI2-10 x 92-1 (3)	-
LIPI2-10 x 92-2 (4)	-
LIPI2-12 x 91-1 (5)	+
LIPI2-12 x 91-2 (6)	-
LIPI2-12 x 92-1 (7)	-
LIPI2-12 x 92-2 (8)	-

Tab. 5.3: PCR mit unterschiedlichen Primerkombinationen

LIPI2-10, LIPI2-12: Primer aus der *L. ivanovii*-Sequenz

91-1, 91-2, 92-1, 92-2: Primer aus der *L. monocytogenes* EGDe-Sequenz

+ PCR-Produkt vorhanden; - kein PCR-Produkt nachweisbar

In Klammer sind die Spuren angegeben, in denen das PCR-Produkt im nachfolgenden Agarosegel (Abb. 5.4) zu finden ist.

Betrachtet man Abb. 5.4, so konnte nur in Spur 1 und 5 des Agarosegels ein PCR-Produkt detektiert werden. Für beide PCR-Ansätze wurde der *L. monocytogenes* EGDe-Primer 91-1 eingesetzt und zeigt somit Bindung in der in diesem Bereich noch unbekanntem *L. ivanovii*-Sequenz. Die beiden in Abb. 5.4 dargestellten DNA-Fragmente wurden anschließend mit den entsprechenden Oligonukleotiden sequenziert und damit ein Bereich von ca. 2,2 kb rechts des Deletionsendes bestimmt.

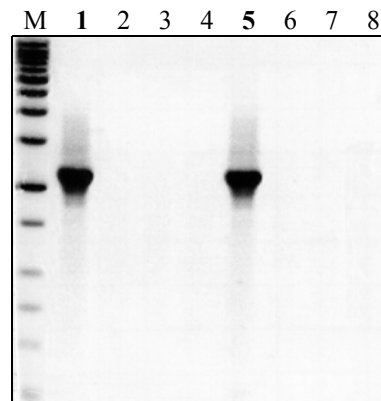


Abb. 5.4: PCR mit chromosomaler DNA von *L. ivanovii* ATCC19119

M: Marker (Stratagene)

Spur 1-8: PCR-Produkte mit den in Tab. 5.3 aufgelisteten Primerkombinationen

Die in Spur 1 und 5 sichtbare Bande besitzt eine Größe von ca. 2,2 kb.

Nach Vervollständigung der in Abb. 5.3 dargestellten Sequenzierungen wurden diese mit dem Computerprogramm Sequencher zu einer Gesamtsequenz (Contig) zusammengesetzt.

Mit Hilfe der Sequencher-Software war es möglich, überlappende DNA-Bereiche zu finden. Das Programm erkennt sowohl Fragmente in 5'→3'-Richtung als auch solche mit entgegengesetzter Orientierung, die dann bei Bedarf umgedreht und mit komplementärer Sequenz an die Gesamtsequenz angepasst werden. Zudem war es möglich, sich die Chromatogramme der Einzelsequenzen anzuschauen und so fragliche Bereiche zu überprüfen bzw. auszubessern.

Insgesamt wurden so 73 Einzelsequenzen zu einer Gesamtsequenz von ca. 7,5 kb zusammengesetzt. Zudem wurde die bekannte Ausgangssequenz mit den Genen *smcL*, *i-inlF*, *i-inlE* und ORF3 hinzugefügt, sodass man schließlich eine zusammenhängende DNA-Sequenz von 14,13 kb (Abb. 5.5) erhielt. Die Basenabfolge dieses Contigs ist im Anhang (Kap. 8.1.1) dargestellt.

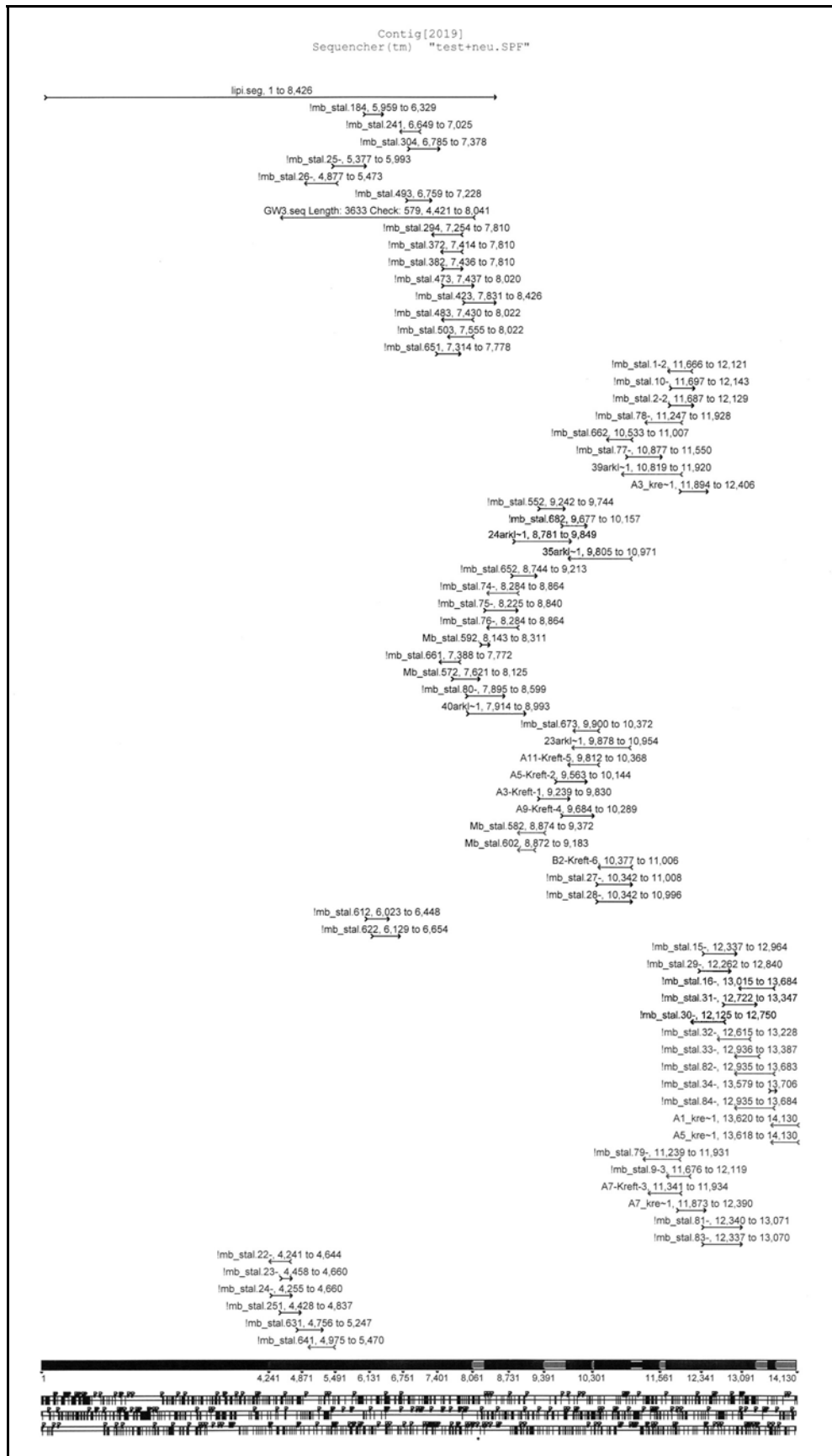


Abb. 5.5: Assembling der Einzelsequenzen mit dem Computerprogramm Sequencher

→, ← einzelne Sequenzierreaktionen

lipi.seq bekannte Ausgangssequenz mit den Genen *smcL*, *i-inlF*, *i-inlE* und ORF

Im unteren Bereich der Abbildung ist die aus den Einzelsequenzen zusammengesetzte Gesamtsequenz als dunkler Balken dargestellt.

5.1.3 Sequenzanalyse des upstream von *smcL* liegenden Bereichs

Der durch Genome Walking und PCRs identifizierte und anschließend vollständig sequenzierte Bereich upstream von *smcL* wurde mit Hilfe des Computerprogramms GCG und Datenbankrecherchen im Internet analysiert. In dem ca. 7,5 kb großen unbekanntem Genomabschnitt von *L. ivanovii* sind in dieser Arbeit 13 neue Open Reading Frames (Abb. 5.6) identifiziert worden.

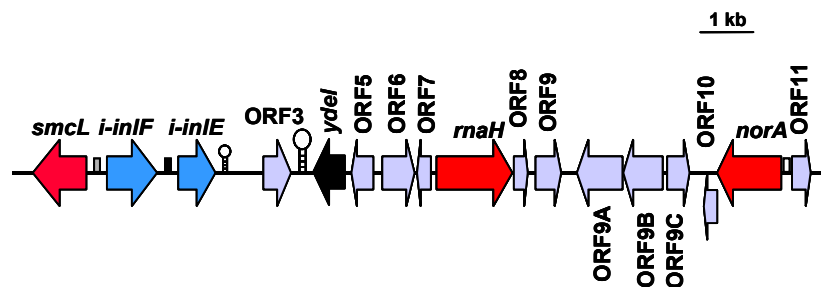


Abb. 5.6: Überblick über die sequenzierten Open Reading Frames in *L. ivanovii* ATCC19119

In obenstehender Abbildung sind die neu identifizierten Open Reading Frames abgebildet. Neben den bereits bekannten Genen *smcL*, *i-inIF*, *i-inIE* und ORF3 sind die 13 neuen ORFs in Form von Pfeilen gezeigt. Rote Pfeile stellen bekannte Gene bzw. Homologien zu bekannten Genen dar; in blau sind die beiden kleinen Internaline *i-inIF* und *i-inIE* gezeigt; in schwarz findet sich das Gen *ydeI*, dessen Funktion unbekannt ist; in lila sind die restlichen ORFs zu sehen, deren mögliche Funktion ebenfalls noch nicht geklärt ist.

smcL: Gen für die Sphingomyelinase

i-inIF, *i-inIE*: Gene für die kleinen Internaline F und E

ydeI: ein zum *ydeI*-Gen aus *B. subtilis* ähnliches Gen

rnaH: Gen für die ATP-abhängige RNA-Helicase

norA: Antibiotikumresistenzgen

ORF3-11: Open Reading Frames 3-11, Funktion unbekannt

Davon konnten drei Gene näher charakterisiert werden:

Downstream des schon vorher bekannten ORF3 liegt das Gen *ydeI* in entgegengesetzter Leserichtung zu ORF3. Dieses ORF zeigt Homologien zu dem *ydeI*-Gen von *B. subtilis*, das für ein Protein mit unbekannter Funktion codiert.

Als weiteres neues Gen ist *rnaH* zu finden, das für eine ATP-abhängige RNA-Helicase codiert. Die RNA-Helicase ist ein Bestandteil des sog. "Degradosoms". Dies ist ein mRNA-Protein-Komplex bestehend aus verschiedenen Enzymen wie z.B. mehreren RNasen, einer Polynukleotidphosphorylase, Poly(A)-Polymerasen und RNA-Helicasen, der am Abbau von mRNA beteiligt ist und somit eine wichtige Rolle bei der metabolischen Instabilität von mRNAs spielt.

Als drittes Gen konnte ein Antibiotikumresistenzgen *norA* identifiziert werden. Dieses Gen codiert für ein membranständiges Protein mit großer Homologie zu Effluxpumpen, die für Antibiotikumresistenzen benötigt werden.

Zudem findet man Homologien zu weiteren Proteinen von *B. subtilis*, *E. coli* oder *L. lactis*, die aber niedrigere Homologiewerte aufweisen (Tab. 5.4).

ORF5 codiert für ein Protein mit Homologie zum YjdN-Protein aus *E. coli*. Über dessen Funktion ist jedoch noch nichts bekannt.

In *B. subtilis* finden sich mehrere homologe Proteine. So ist **ORF6** ähnlich zu Yhfr und könnte möglicherweise die Funktion einer Phosphoglyceratmutase besitzen. **ORF9** besitzt Homologie zu YvcI und ist eventuell eine 8-Oxo-dGTPase. Bei **ORF9A** existieren Ähnlichkeiten zum GlcU-Protein von *B. subtilis*, einem Glucose-Aufnahmeprotein. **ORF9C** schließlich ist homolog zu YraB, einem möglichen Transkriptionsregulator aus der MerR-Familie.

Auch in *L. lactis* subsp. *lactis* gibt es homologe Proteine. **ORF9B** zeigt Ähnlichkeiten zu einer Oxidoreductase, **ORF 11** Homologie zu einem Transkriptionsregulator aus der Fnr-CRP-Familie. Interessant ist zudem, dass ORF11 als einziges eine mögliche PrfA-Box mit zwei Abweichungen von der Konsensussequenz besitzt.

Für die Open Reading Frames ORF3, ORF7, ORF8 und ORF10 lassen sich keine signifikanten Ähnlichkeiten mit Proteinen anderer Prokaryoten (außer *Listeria sp.*, Kap. 5.1.4) in den Datenbanken finden.

In nachfolgender Tabelle (Tab. 5.4) sind die analysierten Gene bzw. Open Reading Frames der rechts von *smcL* identifizierten Region zusammengefasst. Neben Start- und Stopcodon sind mögliche Ribosomenbindungsstellen (RBS) und PrfA-Boxen angegeben. Zudem findet man die Größe der Gene (in bp) und zugehörigen Proteine (in AS bzw. kDa), sowie GC-Gehalt und isoelektrischen Punkt. Die möglichen Funktionen basieren auf den Ergebnissen aus Datenbankrecherchen. Homologien zu Genen bzw. Proteinen in *Listeria sp.* wurden hier noch nicht berücksichtigt, da sie in nachfolgendem Abschnitt (Kap. 5.1.4, Tab. 5.5) ausführlich dargestellt sind.

ORF/Gen	Start-codon	Stop-codon	mögliche RBS (Position) ¹	mögliche PrfA-Box	Größe (bp)	GC-Gehalt (%)	Größe (AS/kDa) ²	Isoelektrischer Punkt ²	Homologe Proteine in den Datenbanken (% Identität/Größe AS) ³	mögliche Funktion ⁴
ORF3	ATG	TAA	GAGGG (-6/-10)	-	516	33,1	171/19,0	9,82	-	unbekannt
<i>ydeI</i>	ATG	TAA	GAGG (-10/-13)	-	594	38,1	197/22,5	6,64	YdeI <i>B. subtilis</i> (62/197)	unbekannt
ORF5	ATG	TAA	GGAGGA (-7/-12)	-	408	36,0	135/15,3	4,24	YjdN <i>E. coli</i> (29/147)	unbekannt
ORF6	ATG	TAA	GGAGGG (-7/-12)	-	612	37,6	203/23,2	7,71	Yhfr <i>B. subtilis</i> (24/193)	evtl. 2,3-Diphosphoglycerat-abhängige Phosphoglyceratmutase
ORF7	ATG	TAA	AGGAGG (-7/-12)	-	261	34,5	86/9,5	4,18	-	unbekannt
<i>rnaH</i>	ATG	TAA	GGGA (-8/-11)	-	1425	36,1	474/53,6	9,25	RnaH <i>B. subtilis</i> (59/479)	evtl. ATP-abhängige RNA-Helicase (DEAD-Motiv)
ORF8	ATG	TAG	GAAGG (-9/-13)	-	264	28,0	87/10,3	7,83	-	unbekannt
ORF9	ATG	TAA	GTAGG (-8/-12)	-	477	36,1	158/18,7	5,29	YvcI <i>B. subtilis</i> (30/158)	evtl. 8-oxo-dGTPase (mutT)
ORF9A	ATG	TAG	GTGGG (-9/-13)	-	864	35,6	287/31,5	9,47	GlcU <i>B. subtilis</i> (46/287)	evtl. Glucose-Aufnahmeprotein
ORF9B	ATG	TAA	GGAGA (-10/-14)	-	738	38,6	245/26,2	5,53	<i>L. lactis</i> (47/250)	evtl. Oxidoreductase
ORF9C	ATG	TAA	GGAG (-11/-14)	-	417	31,9	138/16,7	6,06	YraB <i>B. subtilis</i> (33/140)	evtl. Transkriptionsregulator (MerR-Familie)
ORF10	ATG	TGA	GGGAG (-10/-15)	-	246	32,9	81/9,1	5,83	-	unbekannt
<i>norA</i>	ATG	TGA	AAGGGA (-5/-9)	-	1206	34,7	401/44,4	9,18	NorA <i>S. pyogenes</i> (48/431)	evtl. Antibiotikumresistenzprotein
ORF11	ATG	TAA	AAGGA (-10/-14)	aTAACAA ATGTTgA	348	31,9	115/13,7	9,27	<i>L. lactis</i> (38/228)	evtl. Transkriptionsregulator (Fnr-CRP-Familie)

Tab. 5.4: Übersicht über die rechts von *smcL* identifizierten Gene bzw. Open Reading Frames

¹ Die Position der Ribosomenbindungsstelle (RBS) entspricht der Entfernung in Nukleotiden bis zum möglichen Translations-Startcodon.

² Die Größe in kDa und der isoelektrische Punkt der Proteine wurden mit dem Programm ProtParam, verfügbar unter <http://www.expasy.ch/tools/protparam.html>, bestimmt.

³ Der Grad der Identität in Prozent wurde mit der Anwendung BLAST ohne Filter, mittels des Algorithmus von Altschul (3), verfügbar unter <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> und <http://genolist.pasteur.fr/> ermittelt. Zu *Listeria sp.* homologe Proteine sind in Tab. 5.5 zusammengefasst.

⁴ Die mögliche Funktion basiert auf den Homologiedaten aus den Datenbanken.

5.1.4 Vorkommen des analysierten Bereichs in anderen *Listeria*-Arten: Homologievergleich mit *L. monocytogenes* und *L. innocua*

Da schon die gesamte Sequenz des *L. innocua* CLIP11262- und *L. monocytogenes* EGDe-Genoms verfügbar ist (<http://genolist.pasteur.fr/ListiList>), wurden mit den in dieser Arbeit identifizierten Nukleinsäure- und Aminosäuresequenzen BLAST-Searches mit dem *L. innocua*- und *L. monocytogenes*-Genom durchgeführt und verschiedene homologe Proteine gefunden. Für alle in *L. ivanovii* neu identifizierten ORFs konnten homologe Proteine identifiziert werden (Tab. 5.5), die zum Teil große Ähnlichkeiten (bis zu 92 % Identität) aufweisen.

Betrachtet man die Proteine YdeI, ORF5, ORF6, ORF7, RnaH, ORF9, ORF10 und NorA, so findet man sowohl in *L. monocytogenes* als auch in *L. innocua* homologe Proteine von gleicher bzw. nur geringfügig abweichender (RnaH, ORF6) Größe, die bis zu 92 % identisch (RnaH) sind mit denen von *L. ivanovii*. Hierbei ist festzustellen, dass die meisten in *L. innocua* identifizierten ORFs höhere (wenn auch nur geringfügig) Homologie bzw. Identität aufweisen als die entsprechenden ORFs von *L. monocytogenes* (Tab. 5.5).

YdeI ist ein in *B. subtilis* vorkommendes konserviertes Protein. Über seine Funktion ist aber noch nichts bekannt. Für **ORF5**, **ORF7** und **ORF10** gibt es bis zum heutigen Zeitpunkt auch noch keine Hinweise auf deren mögliche Aufgabe.

ORF6 zeigt eine schwache Ähnlichkeit zur Phosphoglyceratmutase e1 und könnte somit im intermediären Stoffwechsel involviert sein.

RnaH ist eine ATP-abhängige RNA-Helicase, die wie in Kap. 5.1.4 schon erwähnt Bestandteil des sog. "Degradosomes" ist und an der metabolischen Instabilität von mRNAs beteiligt ist.

Für **ORF9** findet sich eine schwache Ähnlichkeit zur 8-Oxo-dGTPase (mutT), was auf eine mögliche Rolle bei der Signaltransduktion hindeutet.

NorA existiert auch stark konserviert (82 bzw. 81 % Identität) in *L. monocytogenes* und *L. innocua* und zeigt Ähnlichkeiten zu einem Antibiotikum-Resistenzprotein auf. Seine mögliche Aufgabe könnte die Beteiligung an Effluxpumpen und Vermittlung von Antibiotikumresistenz sein.

Abweichungen hingegen finden sich bei ORF3, ORF8, ORF9A, ORF9B, ORF9C und ORF11 (Tab. 5.5).

Betrachtet man **ORF3**, so unterscheidet sich dies deutlich von den in den *Listeria*-Genomsequenzen gefundenen Homologen. ORF3 von *L. ivanovii* hat eine Größe von 171 AS. In *L. monocytogenes* wurde ein homologes Protein von 183 AS, in *L. innocua* von 308 AS gefunden. Bei beiden ist der Grad der Identität zudem sehr gering (31 bzw. 27 % Identität). Über eine mögliche Funktion dieses Proteins ist noch nichts bekannt.

Zu **ORF8** findet man in *L. monocytogenes* und *L. innocua* ein homologes Protein von gleicher Größe, das in *L. monocytogenes* 82 %, in *L. innocua* jedoch nur 28 % Identität aufweist. Auch hier gibt es keine Angaben über eine mögliche Aufgabe dieses Proteins.

ORF/Gen	<i>L. ivanovii</i> Größe (AS)	<i>L. monocytogenes</i> EGDe Größe (%Identität/AS) ¹	<i>L. innocua</i> CLIP11262 Größe (%Identität/AS) ¹	mögliche Funktion ²
<i>rph</i>	-	LMO01238 (-/248)	LIN001201 (-/248)	ähnlich zu Ribonuclease PH
<i>ysnA</i>	-	LMO01239 (-/203)	LIN01202 (-/203)	konserviertes hypothetisches Protein, ähnlich zu <i>B. subtilis</i> YsnA Protein
<i>ysnB</i>	-	LMO01240 (-/174)	LIN01203 (-/174)	konserviertes hypothetisches Protein, ähnlich zu <i>B. subtilis</i> YsnB Protein
tRNA ^{Arg}	-	RNA-Arg	RNA-Arg	Transfer-RNA (Arginin)
ORF3	171	LMO02410 (31/183)	LIN01486 (27/308)	unbekannt
<i>ydeI</i>	197	LMO01242 (77/197)	LIN01206 (80/197)	ähnlich zu <i>B. subtilis</i> YdeI Protein, Funktion unbekannt
ORF5	135	LMO01243 (75/135)	LIN01207 (80/135)	unbekannt
ORF6	203	LMO01244 (77/199)	LIN01208 (80/199)	schwache Ähnlichkeit zu Phosphoglyceratmutase e1
ORF7	86	LMO01245 (83/86)	LIN01213 (84/86)	unbekannt
<i>rnaH</i>	474	LMO01246 (91/470)	LIN01214 (92/470)	ähnlich zu ATP-abhängiger RNA Helicase (DEAD Motiv)
ORF8	87	LMO01247 (82/87)	LIN02291 (28/88)	unbekannt
ORF9	158	LMO01248 (75/158)	LIN01215 (74/158)	schwache Ähnlichkeit zur 8-Oxo-dGTPase (mutT)
ORF9A	287	LMO00169 (44/285)	LIN00212 (45/285)	ähnlich zu Glucose-Aufnahmeprotein
ORF9B	245	LMO00432 (47/248)	LIN00452 (46/248)	ähnlich zu Oxidoreductase
ORF9C	138	LMO01478 (41/145)	LIN00818 (33/129)	ähnlich zu Transkriptionsregulator (MerR-Familie)
ORF10	81	LMO01249 (79/81)	LIN01216 (85/81)	unbekannt
<i>norA</i>	401	LMO01250 (82/401)	LIN01217 (81/401)	ähnlich zu Antibiotikum-Resistenzprotein
ORF11	115	LMO01251 (87/219)	LIN01218 (87/219)	ähnlich zu Regulator aus der Fnr-CRP-Familie (incl. PrfA)
<i>yxkD</i>	-	LMO01252 (-/282)	LIN01219 (-/281)	ähnlich zu <i>B. subtilis</i> YxkD Protein, Funktion unbekannt

Tab. 5.5: Vergleich der neu identifizierten *L. ivanovii*-Gene bzw. ORFs mit der *L. monocytogenes* EGDe- und *L. innocua* CLIP11262-Genomsequenz

In dieser Tabelle sind die analysierten ORFs aus *L. ivanovii* mit den homologen ORFs aus der *L. monocytogenes*- und *L. innocua*-Genomsequenz (*Listeria* Genome Sequencing Project, verfügbar unter <http://genolist.pasteur.fr/ListiList>, [91]) verglichen.

Abweichungen sind in Fettdruck dargestellt.

¹ Der Grad der Identität in Prozent wurde mit der Anwendung BLAST ohne Filter, mittels des Algorithmus von Altschul (3), verfügbar unter <http://genolist.pasteur.fr/> ermittelt.

² Die mögliche Funktion basiert auf den Homologiedaten aus den Datenbanken.

Betrachtet man die Lage der zu den *L. ivanovii*-ORFs homologen Gene in *L. monocytogenes* und *L. innocua*, so können jedoch einige Unterschiede im Aufbau dieser Region erkannt werden. Nachfolgend sind die homologen Bereiche von *L. monocytogenes* (Abb. 5.7) und *L. innocua* (Abb. 5.8) zu sehen. Die Abbildungen wurden mit Hilfe der *Listeria*-Genomsequenzen unter <http://genolist.pasteur.fr/ListiList> erstellt.

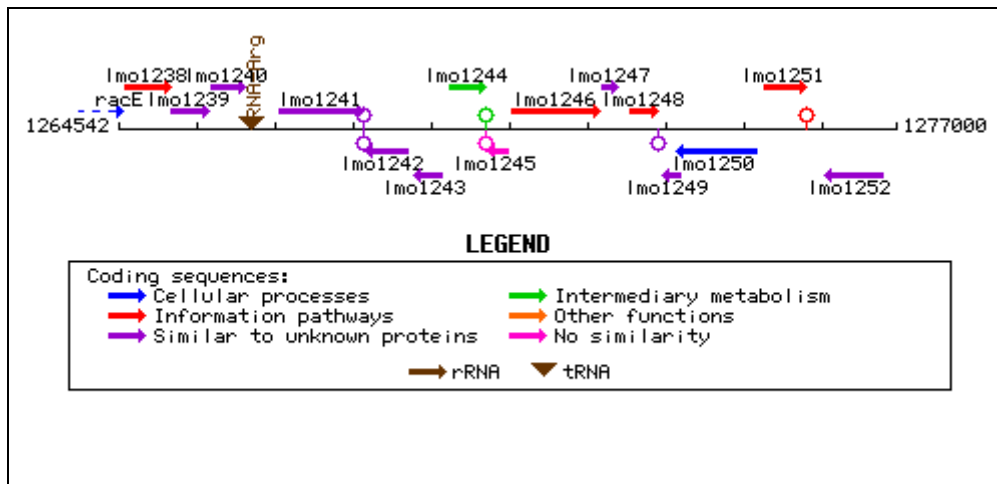


Abb. 5.7: Lage der zu den *L. ivanovii*-ORFs homologen Gene im *L. monocytogenes* EGDe-Genom

In dieser Abbildung sind die in Tab. 5.5 gezeigten homologen Gene von *L. monocytogenes* dargestellt. Die Graphik ist mit Hilfe der *L. monocytogenes*-Genomsequenz unter <http://genolist.pasteur.fr/ListiList> erstellt worden. Pfeile stellen codierende Sequenzen dar. Die Zugangsnummern bzw. Namen der einzelnen Gene sind bei den zugehörigen Pfeilen angegeben.

Vergleicht man die in Tab. 5.5 angegebenen homologen Open Reading Frames von *L. monocytogenes* mit obenstehender Abbildung (Abb. 5.7), so sind einige ORFs der Tabelle nicht in der Abbildung zu finden. Durch Überprüfung der Lage der einzelnen *L. monocytogenes*-ORFs hat sich herausgestellt, dass die zu ORF3 homologe Sequenz LMO02410, sowie die zu den Open Reading Frames ORF9A, ORF9B und ORF9C ähnlichen Gene LMO00169, LMO00432 und LMO01478 an verschiedenen anderen Stellen im *L. monocytogenes* EGDe-Genom zu finden sind.

So liegt **LMO2410** (Homolog zu ORF3) in einem Bereich mit Open Reading Frames unbekannter Funktion, die zum Teil Ähnlichkeiten zu Proteinen von *B. subtilis* besitzen.

In unmittelbarer Nähe von **LMO00169** (Homolog zu ORF9A) finden sich mehrere putative Peptidoglykan-Bindungsproteine mit LPXTG-Motiv, von denen eines Homologie zu den Internalinproteinen von *L. monocytogenes* aufweist. Außerdem liegen mehrere Proteine, die ähnlich zu Transposasen bzw. deren C- oder N-Terminus sind, in dieser Region. Auch **LMO00432** (Homolog zu ORF9B) liegt direkt benachbart zu den zwei schon bekannten großen Internalinen InlA und InlB von *L. monocytogenes*. Zudem finden sich in dieser Region noch die möglichen Gene für einen Transkriptionsregulator aus der LysR-Familie und eine Acetyltransferase. **LMO01478** (Homolog zu ORF9C) schließlich wird flankiert von einer putativen Oxidoreductase und einem möglichen GTP-Bindungsprotein.

Daneben sieht man in Abb. 5.7 ein Open Reading Frame (**Imo1241**), für das keine Homologien zu *L. ivanovii* gefunden werden konnten. Dieses Gen liegt an vergleichbarer Stelle zu ORF3 von *L. ivanovii* und wird in untenstehender Übersicht (Abb. 5.9) auch bei *L. monocytogenes* als ORF3 bezeichnet.

Ähnliches wie bei *L. monocytogenes* (Abb. 5.7) lässt sich auch bei *L. innocua* (Tab. 5.5, Abb. 5.8) beobachten und einige ORFs der Tabelle sind nicht in der Abbildung zu sehen. Betrachtet man die Lage der einzelnen *L. innocua*-ORFs, so findet man auch hier, dass die zu den Open Reading Frames ORF3, ORF8, ORF9A, ORF9B und ORF9C homologen Sequenzen LIN01486, LIN02291, LIN00212, LIN00452 und LIN00818 in diversen anderen Bereichen im *L. innocua* CLIP11262-Genom lokalisiert sind.

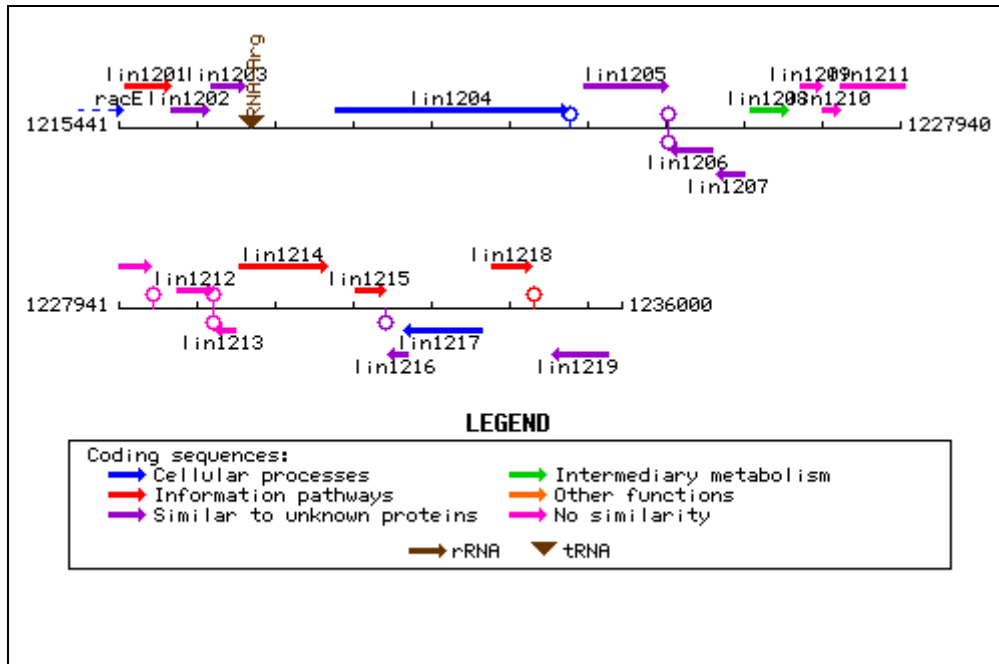


Abb. 5.8: Lage der zu den *L. ivanovii*-ORFs homologen Gene im *L. innocua* CLIP11262-Genom

In dieser Abbildung sind die in Tab. 5.5 gezeigten homologen Gene von *L. innocua* dargestellt. Die Graphik ist mit Hilfe der *L. innocua*-Genomsequenz unter <http://genolist.pasteur.fr/ListiList> erstellt worden. Pfeile stellen codierende Sequenzen dar. Die Zugangsnummern bzw. Namen der einzelnen Gene sind bei den zugehörigen Pfeilen angegeben.

LIN01486 (Homolog zu ORF3) liegt benachbart zu drei *zur*-Genen (*zurR*, *zurM* und *zurA*), die am Transport von Metallen beteiligt sind. Zudem finden sich in diesem Bereich Proteine mit Homologien zu einer Endonuclease IV und einer ATP-abhängigen RNA-Helicase.

Im Bereich um **LIN02291** (Homolog zu ORF8) finden sich eine putative Oligoendopeptidase und einer Reihe von Open Reading Frames unbekannter Funktion.

In unmittelbarer Nähe von **LIN00212** (Homolog zu ORF9A) ist wie bei *L. monocytogenes* EGDe auch ein putatives Peptidoglykan-Bindungsprotein mit LPXTG-Motiv lokalisiert. Gene für Transposasen sind aber nicht zu finden. **LIN00452** (Homolog zu ORF9B) liegt benachbart zu möglichen Genen für einen Transkriptionsregulator der LysR-Familie und eine Acetyltransferase. **LIN00818** (Homolog zu ORF9C) schließlich wird flankiert von einem Gen unbekannter Funktion und einer putativen Oxidoreductase.

Daneben findet man bei *L. innocua* in Abb. 5.8 mehrere Open Reading Frames (*lin1204*, *lin1205*, *lin1209*, *lin1210*, *lin1211* und *lin1212*), für die keine Homologien zu *L. ivanovii* detektiert wurden. **lin1205** ist homolog zu *lmo1241* (ORF3 von *L. monocytogenes*) und liegt an vergleichbarer Stelle zu ORF3 von *L. ivanovii*. Deshalb wird *lin1205* in untenstehendem Überblick (Abb. 5.9) auch bei *L. innocua* als ORF3 bezeichnet.

Betrachtet man den Aufbau dieses Genomabschnittes in *L. monocytogenes* EGDe (Abb. 5.9, A), so kann man feststellen, dass die Gene in ähnlicher Anordnung wie in *L. ivanovii* (Abb. 5.9, C) vorliegen. In *L. innocua* CLIP11262 (Abb. 5.9, B) allerdings findet man trotz vieler hoher Homologiewerte zu den ORFs von *L. ivanovii* eine abweichende Anordnung.

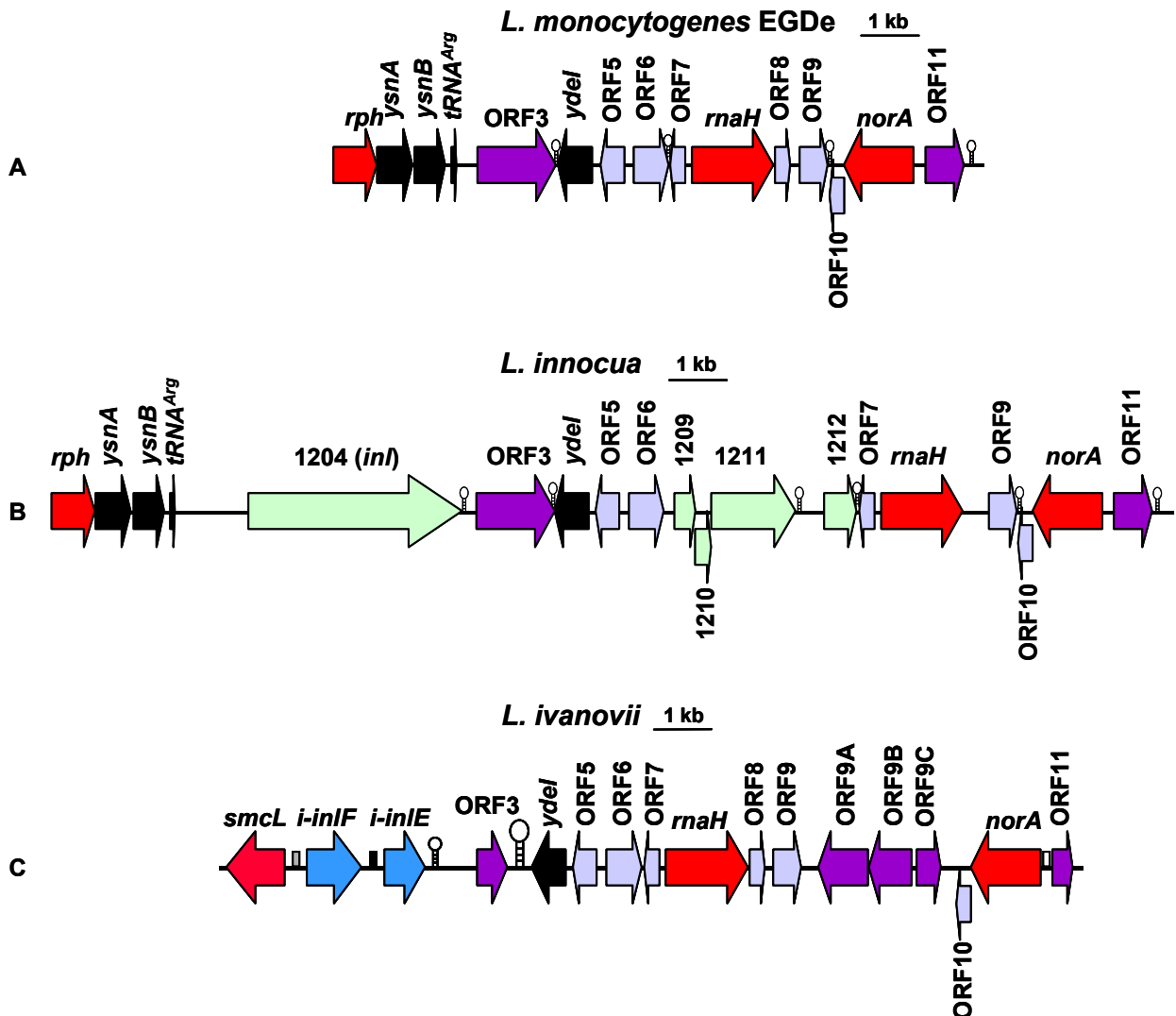


Abb. 5.9: Homologe Gene bzw. ORFs in *L. monocytogenes* EGDe und *L. innocua* CLIP11262

In dieser Abbildung sind die zu den neu identifizierten Open Reading Frames von *L. ivanovii* (C) homologen Gene bzw. ORFs von *L. monocytogenes* (A) und *L. innocua* (B) dargestellt. Voneinander abweichende ORFs sind in dunkellila bzw. hellgrün gezeigt (vgl. Text).

rph: Gen, das für eine Ribonuclease PH codiert

ysnA: ein zum *ysnA* aus *B. subtilis* ähnliches Gen

ysnB: ein zum *B. subtilis ysnB* homologes Gen

tRNA^{Arg}: Gen für Arginin-tRNA

ydeI: ein zum *ydeI* aus *B. subtilis* ähnliches Gen

rnaH: Gen für die ATP-abhängige RNA-Helicase

norA: Antibiotikumresistenzgen

ORF3-11: Open Reading Frames 3-11

1204 (*inl*): ORF von *L. innocua*, besitzt Ähnlichkeit zu den großen Internalinen mit LPXTG-Motiv

1209, 1210, 1211, 1212: Open Reading Frames von *L. innocua*, Funktion unbekannt

smcL: Gen für die Sphingomyelinase

i-inlF, *i-inlE*: Gene für die kleinen Internaline F und E

Beim Vergleich der in *L. ivanovii* identifizierten ORFs (Abb. 5.9, C) mit den homologen Genen in *L. monocytogenes* EGDe (Abb. 5.9, A), lässt sich ab ORF3 eine ähnliche Anordnung der Gene feststellen. Sowohl in *L. ivanovii* als auch in *L. monocytogenes* findet man die Gene *ydeI*, *rnaH* und *norA* in entsprechender Größe und gleicher Orientierung. Auch die Open Reading Frames ORF5, 6, 7, 8, 9 und 10 sind in beiden *Listeria*-Arten in gleicher Anordnung vorhanden.

Man trifft jedoch auch auf einige Unterschiede (in Abb. 5.9 durch Pfeile in dunkellila hervorgehoben, in Tab. 5.5 und Tab. 5.6 in Fettdruck dargestellt).

Links von ORF3 liegen bei *L. ivanovii* das *smcL*-Gen und die Gene für die kleinen Internaline *i-inlF* und *i-inlE*. Diese Gene sind spezifisch für *L. ivanovii* und nicht bei *L. monocytogenes* zu detektieren. Hier findet man hingegen die Gene *rph*, *ysnA* und *ysnB* sowie ein Gen für eine Arginin-tRNA.

Auffällig ist **ORF3**, für das man sowohl auf Nukleinsäure- als auch auf Aminosäureebene keine signifikante Homologie zum ORF3 von *L. ivanovii* findet. ORF3 ist in *L. monocytogenes* wesentlich größer (452 AS) als in *L. ivanovii* (171 AS). Dafür besitzt *L. ivanovii* einen großen intergenischen Bereich (419 bp) zwischen ORF3 und *ydeI*, der bei *L. monocytogenes* nur 42 bp beträgt. Genauere Sequenzanalysen in *L. ivanovii* haben gezeigt, dass dieser große intergenische Bereich einige repeats und inverted repeats beinhaltet, jedoch keine tRNA-Gene oder Homologien zu Phagenproteinen aufweist.

Ein weiterer deutlicher Unterschied ist im Bereich zwischen ORF9 und ORF10 zu finden. In der Sequenz von *L. monocytogenes* liegt nur ein 38 bp großer intergenischer Bereich vor, wohingegen bei *L. ivanovii* eine Sequenz von ca. 2,7 kb identifiziert wurde. Diese enthält drei zusätzliche Open Reading Frames **ORF9A**, **ORF9B** und **ORF9C**. ORF9A und ORF9B sind in entgegengesetzter Leserichtung zum vorausgehenden ORF9 angeordnet und nur durch 22 bp intergenische Sequenz voneinander getrennt. ORF9C, das kleinste der drei zusätzlichen ORFs, ist aber in gleicher Richtung wie ORF9 orientiert.

Als letzte Abweichung zwischen *L. monocytogenes* und *L. ivanovii* fällt das Open Reading Frame **ORF11** auf. Wie oben schon erwähnt, ist das zugehörige Protein in *L. ivanovii* wesentlich kleiner (115 AS) als in *L. monocytogenes* (219 AS). Vergleicht man jedoch die komplette ORF11-Nukleinsäuresequenz von *L. monocytogenes* mit der von ORF11 und der sich anschließenden Sequenz von *L. ivanovii*, so findet man über den gesamten Bereich des *L. monocytogenes*-ORF11 hohe Homologie der beiden Sequenzen zueinander. Dies lässt eventuell auf eine Mutation und dadurch verursachten vorzeitigen Translationsstop in *L. ivanovii* schließen.

Prüft man die Anordnung der zu den *L. ivanovii*-ORFs homologen Gene in *L. innocua* CLIP11262, so sieht man hier wesentlich mehr Abweichungen als in *L. monocytogenes* EGDe.

Links von ORF3 finden sich in *L. innocua* genauso wie bei *L. monocytogenes* die Gene *rph*, *ysnA* und *ysnB* sowie ein Gen für eine Arginin-tRNA. Zusätzlich liegt ein weiteres Open Reading Frame **lin1204** von 1237 AS Größe, das weder in *L. ivanovii* noch in *L. monocytogenes* existiert. Sequenzanalysen zeigen, dass dieses ORF Homologie zu den Internalinproteinen mit LPXTG-Motiv aufweist.

Rechts von diesem zusätzlichen ORF sind eine Reihe von Open Reading Frames zu finden, die in gleicher Größe und Orientierung wie bei *L. ivanovii* vorliegen. **ORF3** besitzt in *L. innocua* die gleiche Größe wie in *L. monocytogenes* (452 AS) und unterscheidet sich so ebenfalls von dem wesentlich kleineren ORF3 von *L. ivanovii* (171 AS).

Der die Gene *ydeI*, ORF5 und ORF6 beinhaltende Abschnitt ist bei *L. innocua*, *L. monocytogenes* und *L. ivanovii* identisch aufgebaut.

Downstream von ORF6 finden sich jedoch vier zusätzliche Open Reading Frames bei *L. innocua* (**lin1209**, **lin1210**, **lin1211** und **lin1212**), die weder bei *L. monocytogenes* noch bei *L. ivanovii* zu sehen sind. Alle vier ORFs sind in gleicher Richtung wie ORF6 orientiert. Über ihre bisherige Funktion bzw. mögliche Homologien zu bekannten Proteinen ist allerdings noch nichts bekannt.

Der Bereich von ORF7 bis ORF11 ist in *L. innocua* ähnlich wie in *L. monocytogenes* aufgebaut. Auch in *L. innocua* fehlen die drei zusätzlichen Open Reading Frames ORF9A, ORF9B und ORF9C von *L. ivanovii*. Ferner ist auch **ORF8** nicht vorhanden und es findet sich an dieser Stelle nur ein größerer intergenischer Bereich von 454 bp. Dieser entspricht der Distanz zwischen *rnaH* und ORF9 von *L. monocytogenes* (456 bp) und *L. ivanovii* (440 bp).

Schließlich ist **ORF11** zu erwähnen, das in *L. innocua* die gleiche Größe wie in *L. monocytogenes* besitzt (219 AS). Somit unterscheidet es sich ebenfalls von dem kleineren ORF11 von *L. ivanovii* (115 AS).

In nachfolgender Tabelle (Tab. 5.6) sind die in Abb. 5.9 gezeigten Gene und Open Reading Frames von *L. ivanovii*, *L. monocytogenes* EGDe und *L. innocua* CLIP11262 nochmals zusammengefasst.

Gen/ORF	<i>L. ivanovii</i> ATCC19119	<i>L. monocytogenes</i> EGDe	<i>L. innocua</i> CLIP11262	Funktion bzw. Homologie
<i>rph</i>	?	+	+	ähnlich zu Ribonuclease PH
<i>ysnA</i>	?	+	+	ähnlich zu YsnA von <i>B. subtilis</i>
<i>ysnB</i>	?	+	+	ähnlich zu YsnB von <i>B. subtilis</i>
tRNA ^{Arg}	?	+	+	Transfer-RNA (Arginin)
<i>smcL</i>	+	-	-	Sphingomyelinase
<i>i-inlF</i>	+	-	-	kleines Internalin
<i>i-inlE</i>	+	-	-	kleines Internalin
1204(<i>inl</i>)	-	-	+	ähnlich zu großen Internalinen mit LPXTG-Motiv
ORF3	+	+	+	unbekannt
<i>ydeI</i>	+	+	+	ähnlich zu YdeI von <i>B. subtilis</i>
ORF5	+	+	+	unbekannt
ORF6	+	+	+	schwache Ähnlichkeit zu Phosphoglyceratmutase e1
1209	-	-	+	unbekannt
1210	-	-	+	unbekannt
1211	-	-	+	unbekannt
1212	-	-	+	unbekannt
ORF7	+	+	+	unbekannt
<i>rnaH</i>	+	+	+	ähnlich zu ATP-abhängiger RNA-Helicase (DEAD-Motiv)
ORF8	+	+	-	unbekannt
ORF9	+	+	+	schwache Ähnlichkeit zur 8-Oxo-dGTPase (mutT)
ORF9A	+	-	-	ähnlich zu Glucose-Aufnahmeprotein
ORF9B	+	-	-	ähnlich zu Oxidoreductase
ORF9C	+	-	-	ähnlich zu Transkriptionsregulator (MerR-Familie)
ORF10	+	+	+	unbekannt
<i>norA</i>	+	+	+	ähnlich zu Antibiotikum-Resistenzprotein
ORF11	+	+	+	ähnlich zu Regulator aus der Fnr-CRP-Familie (incl. PrfA)

Tab. 5.6: Überblick über das Vorkommen der rechts von *smcL* liegenden Gene bzw. ORFs in *L. ivanovii*, *L. monocytogenes* EGDe und *L. innocua* CLIP11262

+ Gen bzw. ORF ist vorhanden; - Gen bzw. ORF ist nicht nachweisbar

? Vorkommen in *L. ivanovii* noch unklar (vgl. Kap. 5.2)

5.1.5 Bestimmung des rechten Endes der Deletion

Betrachtet man den analysierten Deletionsbereich upstream von *smcL*, so sind neben den schon bekannten Genen für die Sphingomyelinase (*smcL*) und die zwei kleinen Internaline (*i-inlF* und *i-inlE*) die Gene *ydeI* und *rnaH* sowie eine Reihe von ORFs in *L. ivanovii* GD-3 deletiert.

Sequenzanalysen zeigen, dass sich der Deletionsbruchpunkt nicht in einem intergenischen Bereich befindet, sondern in einer codierenden Region liegt. Das rechte Deletionsende liegt im *norA*-Gen, wobei die letzten 18 Aminosäuren des zugehörigen Proteins deletiert sind (Abb. 5.10).

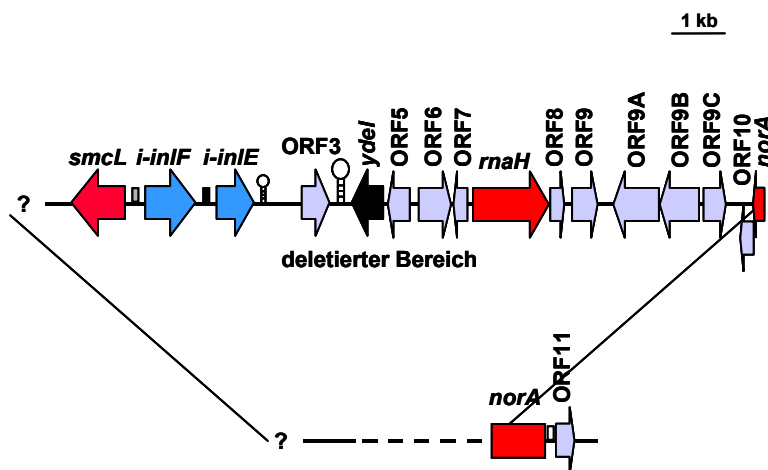


Abb. 5.10: Übersicht über den rechts von *smcL* deletierten Bereich in *L. ivanovii* GD-3

Rechts des *smcL*-Gens sind neben den beiden kleinen Internalinen *i-inlF* und *i-inlE* eine große Zahl an ORFs sowie die Gene *ydeI* und *rnaH* deletiert. Der Deletionsbruchpunkt befindet sich im codierenden Bereich des *norA*-Gens. Die letzten 18 Aminosäuren von NorA sind deletiert, das restliche Gen findet sich in der Mutante GD-3 wieder.

smcL: Gen für die Sphingomyelinase

i-inlF, *i-inlE*: Gene für die kleinen Internaline F und E

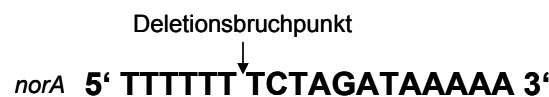
ydeI: ein zum *ydeI*-Gen aus *B. subtilis* ähnliches Gen

rnaH: Gen für die ATP-abhängige RNA-Helicase

norA: Antibiotikumresistenzgen

ORF3-11: Open Reading Frames 3-11, Funktion unbekannt

Durch detaillierte Analysen des Bereichs um den Deletionsbruchpunkt konnte ein AT-reiches, nicht ganz perfektes Palindrom mit zentralem "CTA" identifiziert werden, das sich auch am linken Ende der Deletion findet (Kap. 5.2.4).



Ob es sich hierbei um eine mögliche Zielsequenz für Rekombinasen handelt, ist jedoch noch ungeklärt.

5.2 Eigenschaften des deletierten Bereichs downstream (links) von *smcL*

In diesem Abschnitt sollen die wichtigsten Merkmale des links von *smcL* liegenden, deletierten Bereichs dargestellt werden. Diese Untersuchungen wurden vom spanischen Kooperationspartner, der Arbeitsgruppe von J.-A. Vázquez-Boland, v.a. von G. Domínguez-Bernal (60) durchgeführt und durch eigene Resultate ergänzt (Kap. 5.2.3).

5.2.1 Charakterisierung des links von *smcL* liegenden Bereichs (übernommen von G. Domínguez-Bernal [60])

Die Suche nach dem linken Deletionsende wurde von G. Domínguez-Bernal mittels inverser PCR durchgeführt und lieferte folgendes Ergebnis (Abb. 5.11).

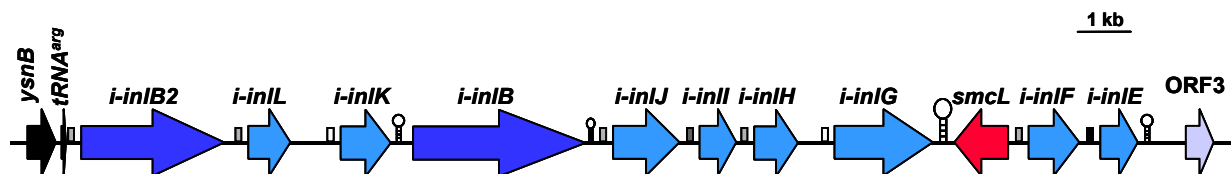


Abb. 5.11: Überblick über den links von *smcL* sequenzierten Bereich von *L. ivanovii* ATCC19119 (modifiziert nach G. Domínguez-Bernal [60])

In obenstehender Abbildung sind die neu identifizierten Internalingene von *L. ivanovii* dargestellt. Neben den bereits bekannten Genen *smcL*, *i-inlF*, *i-inlE* und ORF3 sind 8 neue Internaline sowie das Gen *ysnB* und ein *tRNA*-Gen in Form von Pfeilen gezeigt. PrfA-Boxen sind als kleine Kästchen vor den zugehörigen Internalingenen gezeigt. Schwarze Farbe kennzeichnet eine perfekt mit der Konsensussequenz übereinstimmende PrfA-Box. Dunkelgrau weist auf 1, hellgrau auf 2 mismatches hin. Weiße Kästchen symbolisieren PrfA-Boxen mit 3 Abweichungen von der Konsensussequenz.

i-inlB2, *B*: Gene für die großen Internaline B2 und B

i-inlL-E: Gene für die kleinen Internaline B2, L, K, J, I, H, G, F und E

ysnB: ein zum *B. subtilis*-Gen *ysnB* homologes Gen

tRNA^{Arg}: Gen für Arginin-tRNA

smcL: Gen für die Sphingomyelinase

ORF3: Open Reading Frame 3

Betrachtet man den Bereich downstream von *smcL* (Abb. 5.11), so findet man keine Open Reading Frames unbekannter Funktion wie upstream von *smcL*, sondern eine Reihe von kleinen und großen Internalinen. Neben den beiden schon bekannten Genen für die kleinen Internaline *i-inlF* und *i-inlE* konnten in dieser Region sechs neue kleine Internaline (*i-inlL*, *K*, *J*, *I*, *H* und *G*) und die ersten beiden großen Internaline (*i-inlB2* und *i-inlB*) in *L. ivanovii* identifiziert werden. Alle Internalingene einschließlich des rechts von *i-inlE* liegenden ORF3 werden in der gleichen Richtung transkribiert. Nur *smcL* liegt in entgegengesetzter Orientierung vor und wird zudem auf beiden Seiten von einer je 14 bp langen Sequenz flankiert, die einen perfekten inverted repeat darstellen.

Im von G. Domínguez-Bernal analysierten Genomabschnitt befinden sich ferner mehrere mögliche Terminatoren an den 3'-Enden der Gene *i-inlK*, *i-inlB*, *smcL/i-inlG*, *i-inlE* und ORF3.

Links der zahlreichen Internaline liegt ein Arginin-tRNA-Gen, an das sich ein zum *B. subtilis*-Gen *ysnB* homologes Gen mit unbekannter Funktion anschließt. Diese beiden Gene sind auch in *L. monocytogenes* EGDe (Abb. 5.9, A) und *L. innocua* CLIP11262 (Abb. 5.9, B) zu finden, sodass die für *L. ivanovii* spezifische Region mit den Genen für die zwei großen Internaline *i-inlB* und *i-inlB2*, den 8 kleinen Internalinen *i-inlL*, *K*, *J*, *I*, *H*, *G*, *F* und *E* und dem Sphingomyelinase-Gen *smcL* auf beiden Seiten von Genen bzw. ORFs begrenzt wird, die auch in anderen *Listeria*-Arten (*L. monocytogenes* und *L. innocua*) vorhanden sind.

5.2.2 Eigenschaften der neu identifizierten Internaline von *L. ivanovii*

(übernommen von G. Domínguez-Bernal [60])

Die Familie der Internaline lässt sich in zwei Gruppen einteilen, die kleinen, sekretierten Internaline und die großen, oberflächenassoziierten Internaline.

Der Prototyp der kleinen, sekretierten Internaline ist Internalin C (InlC) von *L. monocytogenes*. G. Domínguez-Bernal konnte in seiner Arbeit neben den bereits bekannten Internalinen i-InlF und i-InlE sechs neue kleine Internaline (i-InlL, K, J, I, H, G) in *L. ivanovii* identifizieren (Abb. 5.12).

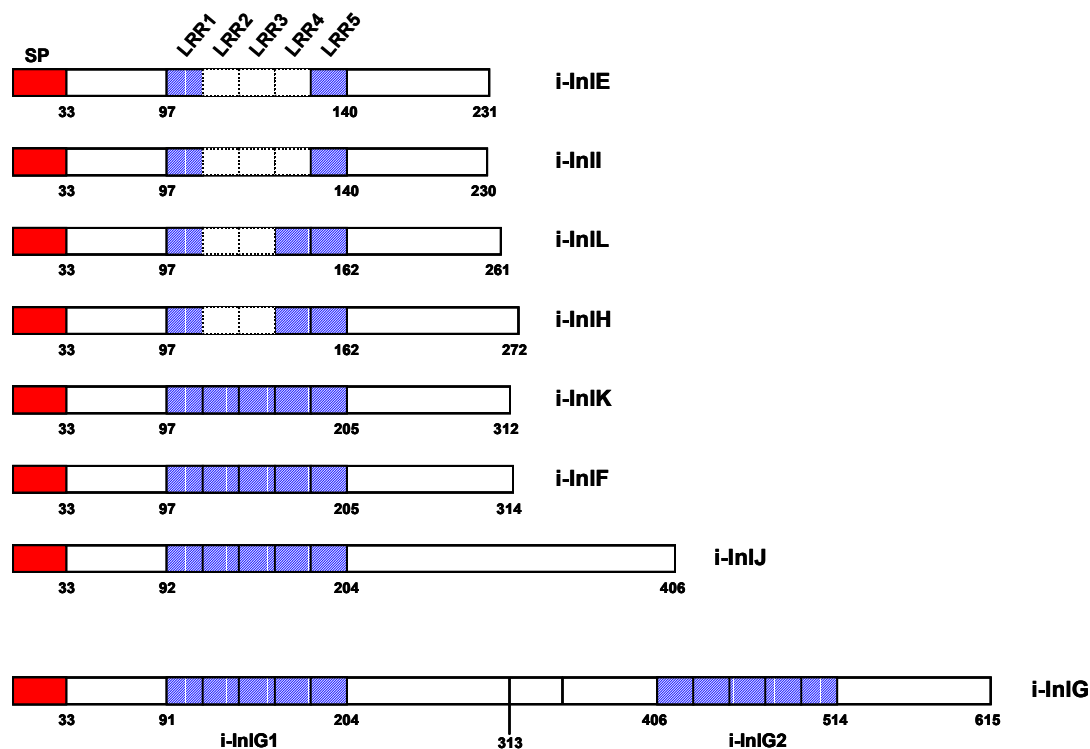


Abb. 5.12: Aufbau der kleinen, sekretierten Internaline von *L. ivanovii*

(modifiziert nach G. Domínguez-Bernal, [60])

Die Internalinproteine sind als Balken dargestellt, ihre Größe (AS) ist unterhalb als Zahl angegeben.

Das Signalpeptid (SP) ist als rotes Kästchen am N-Terminus zu finden.

Blaue schraffierte Kästchen stellen Leucin-reiche repeats (LRR1-5) dar, dazwischen liegende weiße Kästchen sollen fehlende LRRs symbolisieren und wurden eingefügt, um das Alignment zu optimieren.

i-InlG wurde in zwei Bereiche (i-InlG1 und i-InlG2) unterteilt, die möglicherweise durch Tandemfusion zu dem in *L. ivanovii* vorliegenden i-InlG führten.

Im Allgemeinen besitzen die kleinen Internaline (S-InIs) am N-Terminus ein Signalpeptid und eine Region aus Leucin-reichen Repeats (LLRs), die von zwei hoch konservierten Bereichen flankiert wird.

In der Anzahl der Leucin-reichen Repeats finden sich jedoch Unterschiede. So besitzen i-InIE und i-InII nur zwei LRRs, i-InIL und i-InIH drei, i-InIK, i-InIF und i-InIJ fünf und i-InIG schließlich sogar zehn LRRs.

Zudem zeigt i-InIG einen von den restlichen kleinen Internalinen abweichenden Aufbau. Es besitzt als einziges kleines Internalin zehn Leucin-reiche Repeats, die in zwei voneinander getrennt liegenden Bereichen mit jeweils fünf Repeats liegen. Außerdem ist i-InIG ungefähr doppelt so groß (66 kDa) wie die übrigen kleinen Internaline (25 – 32 kDa), was auf eine mögliche Tandemfusion von zwei einzelnen kleinen Internalinen hindeutet.

Ein Alignment der Aminosäuresequenzen der kleinen Internaline zeigt, dass alle hoch homolog zueinander sind (43 - 70 % Identität), wobei i-InIE und i-InII (70,4 % Identität), i-InIL und i-InIH (56,0 % Identität), sowie i-InIK, i-InIF und i-InIJ (44,3 – 56,3 % Identität) die höchsten Homologien zueinander aufweisen. i-InIG weist interessanterweise die größte Homologie zu den beiden an anderer Stelle im Genom liegenden Internalinen i-InIC und i-InID auf. Die linke Hälfte von i-InIG (i-InIG1) ist hoch homolog (63,1 % Identität) zu i-InIC, die rechte Hälfte (i-InIG2) homolog (59,0 % Identität) zu i-InID.

Aus der zweiten Gruppe, den großen, oberflächenassoziierten Internalinen, konnten bisher nur bei *L. monocytogenes* (z.B. InIA, InIB) Gene bzw. Proteine identifiziert werden. Nun wurden vom spanischen Kooperationspartner die ersten beiden großen Internaline i-InIB und i-InIB2 in *L. ivanovii* charakterisiert, die ähnlich zum Internalin InIB von *L. monocytogenes* sind (Abb. 5.13).

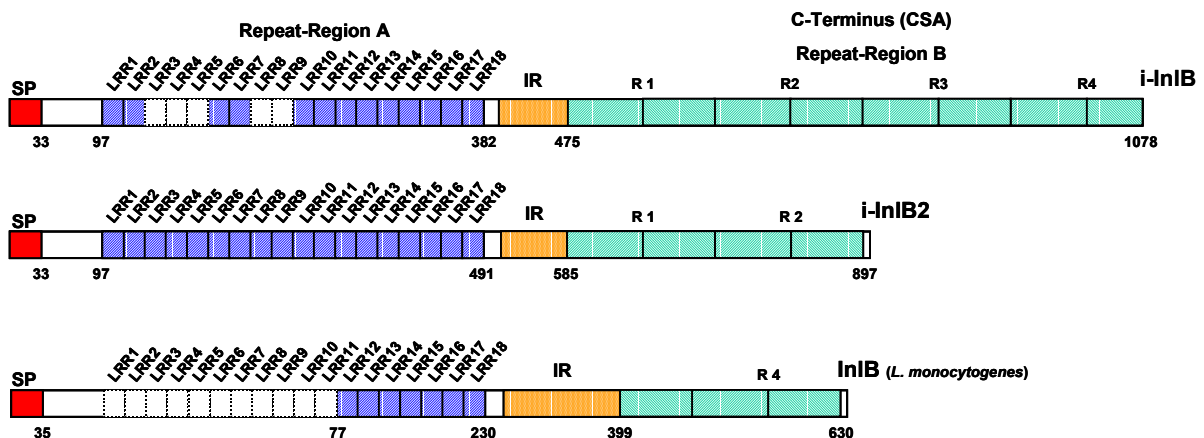


Abb. 5.13: Aufbau der großen Internaline von *L. ivanovii* und Internalin B von *L. monocytogenes* (modifiziert nach G. Domínguez-Bernal, [60])

Die Internalinproteine sind als Balken dargestellt, ihre Größe (AS) ist unterhalb als Zahl angegeben.

Das Signalpeptid (SP) ist als rotes Kästchen am N-Terminus zu finden.

Blau schraffierte Kästchen stellen die Leucin-reichen repeats (LRR1-18) der Repeat-Region A dar, dazwischen liegende weiße Kästchen sollen fehlende LRRs symbolisieren und wurden eingefügt, um das Alignment zu optimieren. In orange ist eine Interrepeat-Region gekennzeichnet, an die sich C-terminal eine weitere Repeat-Region B aus mehreren Repeats (R1-4, grün schraffiert) anschließt.

Die großen, oberflächenassoziierten Internaline sind gekennzeichnet durch ein Signalpeptid am N-Terminus und zwei Repeat-Regionen A und B, die durch eine hoch konservierte Interrepeat-Region voneinander getrennt sind. Am C-Terminus schließlich findet sich ein Zellwandanker, der wie bei allen großen Internalinen außer InlB von *L. monocytogenes* über ein LPXTG-Motiv kovalent mit dem bakteriellen Peptidoglykan verknüpft sein kann oder wie bei InlB von *L. monocytogenes* über einen Zelloberflächenanker (Cell surface anchor, Csa) mit Teichon- oder Lipoteichonsäuren der bakteriellen Zellwand verbunden sein kann (17, 127).

Beide in *L. ivanovii* identifizierten großen Internaline i-InlB und i-InlB2 besitzen einen Zelloberflächenanker (Csa) wie InlB von *L. monocytogenes*, unterscheiden sich aber in der Anzahl der Repeats in Repeat-Region A und B. In Repeat-Region A findet man im Gegensatz zu InlB von *L. monocytogenes* (7 LRRs) bei i-InlB 13 und bei i-InlB2 sogar 18 Leucin-reiche Repeats (LRRs). Die Repeat-Region B ist bei i-InlB aus vier (R1-4), bei i-InlB2 aus zwei Repeats (R1 und 2) aufgebaut, die sich jeweils in zwei "Module" unterteilen lassen. Bei InlB hingegen besteht die Repeat-Region B nur aus einem Repeat (R4), an das sich links ein "Modul", d.h. die "Hälfte" eines weiteren Repeats anschließt.

Prüft man die Sequenzen vor den Translationsstarts der einzelnen Gene, so wurden für alle Internaline bis auf das große Internalin *i-inlB* PrfA-Boxen gefunden (Tab. 5.7).

Jedoch findet man nur für das schon bekannte kleine Internalin *i-inlE* eine perfekt mit der Konsensussequenz übereinstimmende PrfA-Box. Bei allen anderen Internalingenen weicht die PrfA-Box vom Konsensus ab. Für *i-inlI* findet man ein mismatch, für *i-inlB2*, *L*, *J*, *H* und *F* zwei und für *i-inlK* und *G* sogar drei abweichende Basen. Auch die beiden an anderer Stelle im *L. ivanovii*-Genom liegenden Gene für die kleinen Internaline *i-inlC* und *i-inlD* besitzen PrfA-Boxen mit je zwei Abweichungen von der Konsensussequenz.

Gen	PrfA-Box (mismatches)	-10-Box
<i>i-inlB2</i>	TTAA ct TT TG TTAt (2)	TAGAAT
<i>i-inlL</i>	TTAA ct TT TG TTAt (2)	TAAAAT
<i>i-inlK</i>	a TTAA ct TT TG TTAt (3)	TAAAAT
<i>i-inlB</i>	-	-
<i>i-inlJ</i>	TTAA ct TT TG TTAt (2)	TACAAT
<i>i-inlI</i>	TTAA CA TT TG TTAt (1)	TAAAAT
<i>i-inlH</i>	TTAA ct TT TG TTAt (2)	TAAAAT
<i>i-inlG</i>	TTAA ct TT TG TTgt (3)	TAAAAT
<i>i-inlF</i>	TTAA ct TT TG TTAt (2)	TAGAAT
<i>i-inlE</i>	TTAA CA TT TG TTAA (0)	TATGAT
<i>i-inlC</i>	TTAA ct TT TG TTAt (2)	TAACAT
<i>i-inlD</i>	TTAA ct TT TG TTAt (2)	TATTAT

Tab. 5.7: PrfA-Boxen der kleinen und großen Internaline von *L. ivanovii*

Abweichungen von der Konsensussequenz der PrfA-Box sind mit kleinen Buchstaben in Fettdruck dargestellt. In Klammern ist die Zahl der Abweichungen (mismatches) angegeben.

Der Vollständigkeit halber sind auch die beiden an anderer Stelle im *L. ivanovii*-Genom liegenden Gene für die kleinen Internaline *i-inlC* und *i-inlD* bzw. deren PrfA-Boxen aufgeführt.

Bis auf *i-inlB* besitzen alle Internaline von *L. ivanovii* eine PrfA-Box.

5.2.3 Untersuchung des "zusammengesetzten" kleinen Internalins i-InlG

Betrachtet man die kleinen Internaline von *L. ivanovii* (Kap. 5.2.2, Abb. 5.12), so sind alle bis auf Ausnahme von i-InlG durch ähnliche Größe und Aufbau gekennzeichnet. Internalin G aber unterscheidet sich deutlich, da es zum einen fast doppelt so groß wie die anderen kleinen Internaline ist und außerdem eine zweite Region mit Leucin-reichen Repeats (LRRs) aufweist, was auf einen zusammengesetzten Aufbau aus zwei einzelnen kleinen Internalinen (i-InlG1 und i-InlG2) hindeutet. Deshalb sollte dieses Internalin in dieser Arbeit in drei weiteren *L. ivanovii*-Stämmen untersucht werden, um Aufschlüsse darüber zu erhalten, ob in diesen Stämmen auch ein "Fusionsprodukt" aus zwei kleinen Internalinen vorliegt oder vielleicht noch eines oder beide der einzelnen kleinen Internaline zu finden sind.

Zur Untersuchung wurden die Stämme *L. ivanovii* P-24, *L. ivanovii* P-55 und *L. ivanovii* subsp. *londoniensis* herangezogen. Bei *L. ivanovii* P-24 handelt es sich um ein klinisches Isolat aus Neuseeland. *L. ivanovii* P-55 ist ein klinisches Isolat aus Spanien und stammt aus der Stammsammlung des Veterinärmedizinischen Instituts der Universität Madrid. Sowohl *L. ivanovii* P-24 als auch P-55 besitzen einen Phänotyp wie der in dieser Arbeit eingesetzte Typstammstamm *L. ivanovii* ATCC19119 und zählen zur Subspezies *ivanovii*.

L. ivanovii subsp. *londoniensis* schließlich ist ein Isolat aus der anderen Unterart von *L. ivanovii* und unterscheidet sich durch biochemische Eigenschaften von *L. ivanovii* subsp. *ivanovii* (14).

Zur Überprüfung, ob *i-inlG* in den zu untersuchenden *L. ivanovii*-Stämmen vorhanden ist, wurden in dieser Arbeit mehrere PCRs mit verschiedenen Primerkombinationen durchgeführt. Zum einen wurden intragenische Oligonukleotide ausgewählt, um zu kontrollieren, ob *i-inlG* überhaupt nachweisbar ist, zum anderen wurden Primer aus den benachbarten Genen *i-inlH* und *smcL* bzw. den *i-inlG* flankierenden intergenischen Sequenzen verwendet, um die Lage von *i-inlG* zu überprüfen (Abb. 5.14).

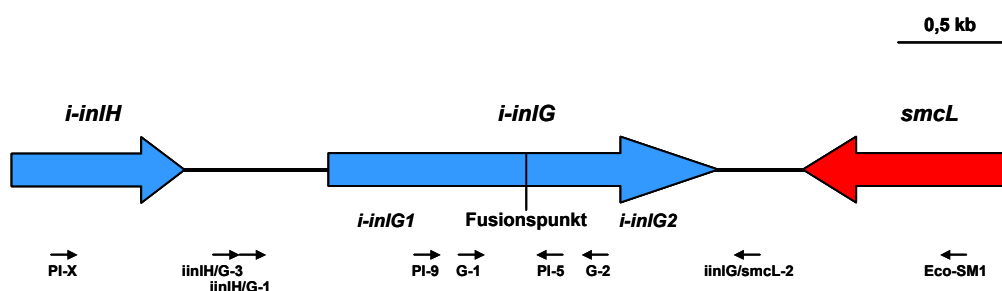


Abb. 5.14: Lage der für die *i-inlG*-PCRs in *L. ivanovii* verwendeten Oligonukleotide

Die Gene für Internalin G (*i-inlG*) und die beiden benachbarten Gene *i-inlH* und *smcL* sind in Form von großen Pfeilen dargestellt. In *i-inlG* ist zudem der Fusionspunkt der beiden einzelnen Internaline *i-inlG1* und *i-inlG2* markiert.

Die für die PCRs eingesetzten Oligonukleotide sind unterhalb in Form von kleinen Pfeilen angegeben. Die Ergebnisse der PCRs sind in Tab. 5.8 zusammengefasst.

Bei den intragenischen PCRs konnte in allen *L. ivanovii*-Stämmen *i-inlG* nachgewiesen werden. Allerdings erhielt man nur mit einer der zwei verwendeten Primerkombinationen bei *L. ivanovii* subsp. *londoniensis* ein positives Ergebnis (Abb. 5.15, Tab. 5.8).

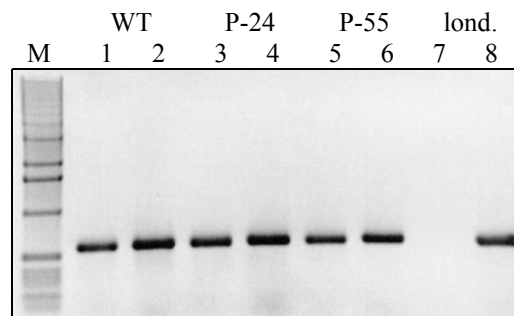


Abb. 5.15: *i-inlG*-PCR mit intragenischen Oligonukleotiden

WT: *L. ivanovii* ATCC19119; lond.: *L. ivanovii* subsp. *londoniensis*

P-24: *L. ivanovii* P-24; P-55: *L. ivanovii* P-55

M: Marker (Gibco BRL)

Spur 1, 3, 5, 7: Primerkombination PI-9 x PI-5 (570 bp)

Spur 2, 4, 6, 8: Primerkombination G-1 x G-2 (586 bp)

Um die Lage von *i-inlG* zu untersuchen, wurden Oligonukleotide aus den benachbarten Genen *i-inlH* und *smcL*, sowie aus den an *i-inlG* angrenzenden intergenischen Bereichen verwendet.

Mit Primerkombinationen aus den benachbarten Genen konnte bei *L. ivanovii* P-24 und P-55 die intergenische Region *i-inlH/G* abgedeckt werden (Abb. 5.16, Spur 3 und 5). Bei *L. ivanovii* subsp. *londoniensis* erhält man jedoch kein PCR-Produkt.

Der Bereich *i-inlG/smcL* konnte bei den zu untersuchenden *L. ivanovii*-Stämmen nicht eindeutig nachgewiesen werden, da man selbst beim Typstamm *L. ivanovii* ATCC19119 mit der gewählten Primerkombination nur ein sehr schwaches PCR-Produkt erhielt. Daneben war noch eine starke zweite Bande kleinerer Größe (ca. 1,4 kb) auf dem Agarosegel (Abb. 5.16, Spur 2) sichtbar, die auch bei den anderen drei untersuchten Stämmen wiederzufinden ist (Abb. 5.16, Spur 4, 6, 8).

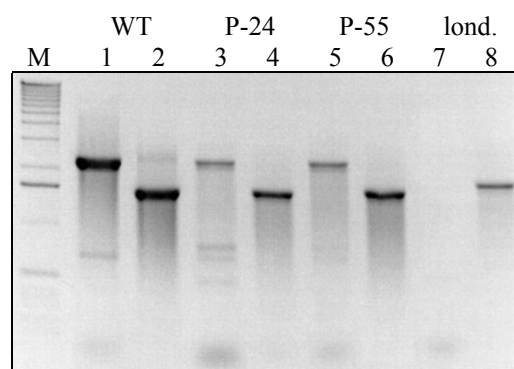


Abb. 5.16: *i-inlG*-PCR mit intergenischen Oligonukleotiden

WT: *L. ivanovii* ATCC19119; lond.: *L. ivanovii* subsp. *londoniensis*

P-24: *L. ivanovii* P-24; P-55: *L. ivanovii* P-55

M: Marker (Gibco BRL)

Spur 1, 3, 5, 7: Primerkombination PI-X x PI-5 (~ 2,3 kb)

Spur 2, 4, 6, 8: Primerkombination PI-9 x Eco-SM1 (~ 2,5 kb)

Da der Nachweis der rechts von *i-inlG* liegenden intergenischen Region (*i-inlG/smcL*) nicht eindeutig war, wurden neue Primerkombinationen aus den intergenischen Bereichen ausgewählt. Mit diesen konnte das gesamte *i-inlG*-Gen mit seinen angrenzenden intergenischen Bereichen bei *L. ivanovii* P-24 und P-55 nachgewiesen werden (Abb. 5.17). Bei *L. ivanovii* subsp. *londoniensis* wiederum war kein PCR-Produkt detektierbar.

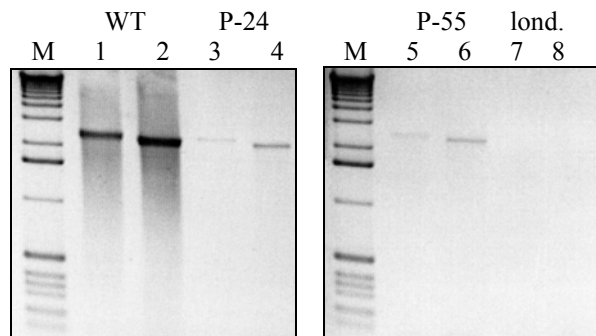


Abb. 5.17: *i-inlG*-PCR mit intergenischen Oligonukleotiden

WT: *L. ivanovii* ATCC19119; lond.: *L. ivanovii* subsp. *londoniensis*

P-24: *L. ivanovii* P-24; P-55: *L. ivanovii* P-55

M: Marker (Gibco BRL)

Spur 1, 3, 5, 7: Primerkombination iinlH/G-3 x iinlG/smcL-2 (~ 2,5 kb)

Spur 2, 4, 6, 8: Primerkombination iinlH/G-1 x iinlG/smcL-2 (~ 2,4 kb)

Somit erhielt man in dieser Arbeit folgendes Ergebnis für *i-inlG*. Bei *L. ivanovii* P-24 und P-55 herrscht ein ähnliches Bild wie beim Typstammstamm *L. ivanovii* ATCC19119 (Tab. 5.8). Sowohl *i-inlG* als auch die angrenzenden Bereiche sind bei diesen beiden Stämmen durch PCR nachweisbar. *L. ivanovii* subsp. *londoniensis* hingegen weicht deutlich ab. Bei dieser *L. ivanovii*-Unterart kann *i-inlG* nur mit dem Primerpaar G-1 und G-2 detektiert werden. Bei allen anderen intra- und intergenischen Oligonukleotiden erhält man kein PCR-Produkt.

Primerkombination	<i>L. iv. ATCC19119</i>	<i>L. iv. P-24</i>	<i>L. iv. P-55</i>	<i>L. iv. subsp. lond.</i>
PI-9 x PI-5	+	+	+	-
G-1 x G-2	+	+	+	+
PI-X x PI-5	+	+	+	-
PI-9 x Eco-SM1	+	(+)	(+)	-
iinlH/G-3 x iinlG/smcL-2	+	(+)	(+)	-
iinlH/G-1 x iinlG/smcL-2	+	+	+	-

Tab. 5.8: Für die *i-inlG*-PCRs in *L. ivanovii* verwendete Primerkombinationen

+ PCR-Produkt vorhanden; - kein PCR-Produkt nachweisbar

(+) nur schwaches PCR-Produkt bzw. unspezifische Banden detektierbar

Eine Übersicht über die Lage der Oligonukleotide ist in Abb. 5.14 zu finden.

Da bei *L. ivanovii* subsp. *londoniensis* offensichtlich Abweichungen im Bereich des *i-inlG*-Gens vorliegen, sollte die Region um den Fusionspunkt von *i-inlG1* und *i-inlG2* bei allen untersuchten *L. ivanovii*-Stämmen sequenziert werden, um Aussagen über eine mögliche Abweichung von der *L. ivanovii* ATCC19119-Sequenz und damit veränderte *i-InlG*-Struktur machen zu können.

Für die Sequenzierungsreaktionen wurden die positiven PCRs mit den intragenischen Primerkombinationen PI-9 x PI-5 und G-1 x G-2 verwendet (Abb. 5.15). Nach Sequenzierung wurden die erhaltenen Sequenzen mit den Computerprogrammen Sequencher und GCG ausgewertet (Abb. 5.18, Abb. 5.19).

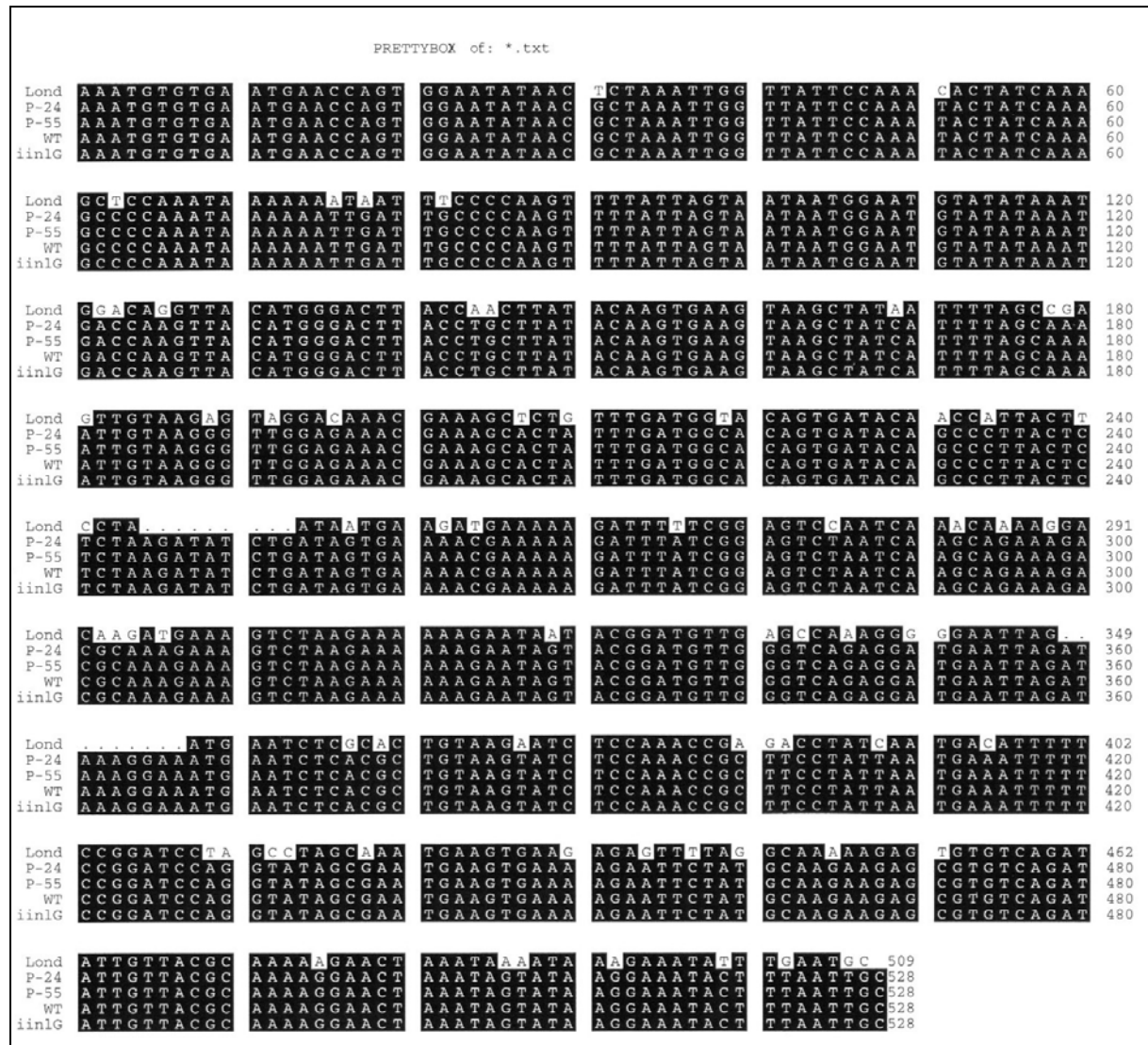


Abb. 5.18: Homologievergleich des sequenzierten *i-inlG*-Bereichs

Lond: *i-inlG* von *L. ivanovii* subsp. *londoniensis*; WT: *i-inlG* *L. ivanovii* ATCC19119

P-24: *i-inlG* *L. ivanovii* P-24; P-55: *i-inlG* *L. ivanovii* P-55

iinlG: entsprechender Bereich aus der *i-inlG*-Sequenz von G. Domínguez-Bernal

Schwarz unterlegte Bereiche kennzeichnen Übereinstimmung in der Sequenz, weiß unterlegte Nukleotide stellen Sequenzabweichungen dar, ... weisen auf fehlende Basen in der *i-inlG*-Sequenz hin.

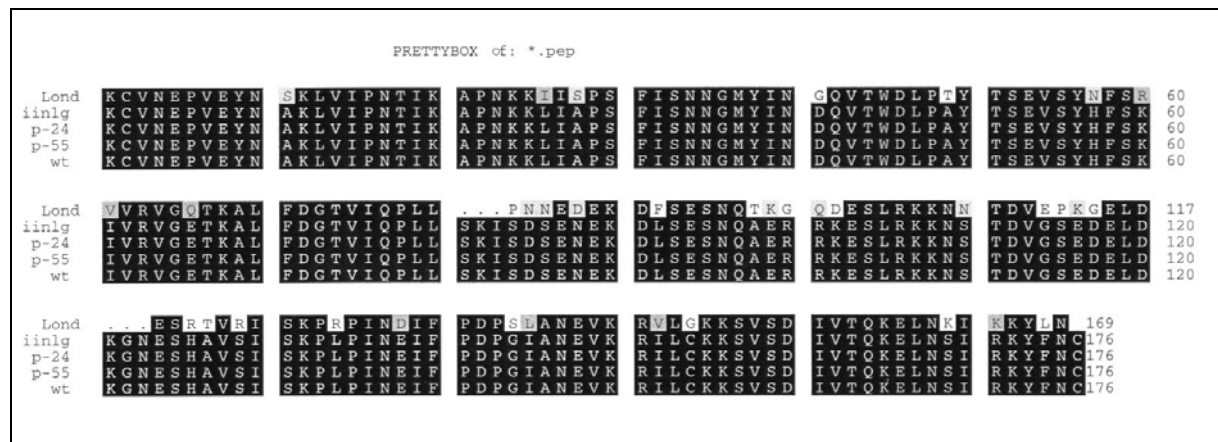


Abb. 5.19: Homologievergleich der Aminosäureabfolge des sequenzierten *i-inlG*-Bereichs

Dargestellt sind die Aminosäureabfolgen der in Abb. 5.18 gezeigten Sequenzen.

Ein Alignment der Nukleinsäuresequenzen (Abb. 5.18) zeigt, dass der sequenzierte *i-inlG*-Bereich von *L. ivanovii* P-24 und P-55 identisch ist mit der entsprechenden Sequenz von *L. ivanovii* ATCC19119 (schwarz unterlegte Bereiche in Abb. 5.18). Betrachtet man *i-inlG* von *L. ivanovii* subsp. *londoniensis*, so findet man auch hier über den Großteil der Sequenz Übereinstimmung mit *L. ivanovii* ATCC19119. Allerdings weichen einige Nukleotide ab (in Abb. 5.18 in heller Farbe markiert) und es existieren zwei Bereiche, in denen jeweils neun Nukleotide deletiert sind.

Da es bei Abweichung der Nukleinsäuresequenz zu einer veränderten Aminosäureabfolge und dadurch eventuell zu einem vorzeitigen Translationsstop kommen kann, wurde zusätzlich von den erhaltenen Nukleinsäuresequenzen die Aminosäureabfolge bestimmt und ein Alignment mit diesen durchgeführt.

Wie zu erwarten ist auch die Aminosäureabfolge von *L. ivanovii* P-24 und P-55 identisch mit der von *L. ivanovii* ATCC19119 (schwarz unterlegte Bereiche in Abb. 5.19). Bei *L. ivanovii* subsp. *londoniensis* kommt es aufgrund der unterschiedlichen Nukleotide zu einigen Abweichungen in der Aminosäureabfolge. Zudem sind in zwei Bereichen jeweils drei Aminosäuren deletiert. Es kommt aber nicht zu einem Frameshift oder vorzeitigem Translationsstop, so dass man davon ausgehen kann, dass *i-InlG* in allen untersuchten *L. ivanovii*-Stämmen identisch bzw. ähnlich wie im Typstamm *L. ivanovii* ATCC19119 aufgebaut ist und somit auch aus zwei fusionierten einzelnen kleinen Internalinen besteht.

5.2.4 Bestimmung des linken Endes der Deletion

(übernommen von G. Domínguez-Bernal [60])

Nach Analyse des downstream von *smcL* deletierten Bereichs in der Mutante GD-3 hat sich herausgestellt, dass neben den Genen für die beiden bekannten kleinen Internaline *i-inlF* und *i-inlE* noch drei weitere Internalingene, *i-inlI*, *i-inlH* und *i-inlG*, deletiert sind (Abb. 5.20).

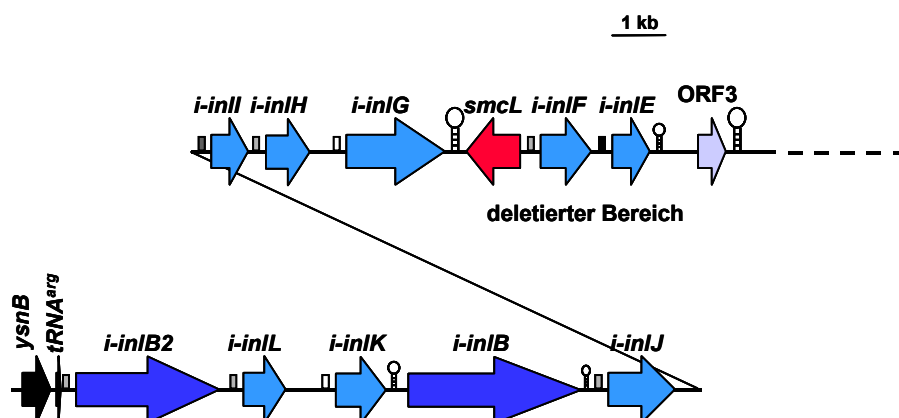


Abb. 5.20: Übersicht über den links von *smcL* deletierten Bereich in *L. ivanovii* GD-3

Links des *smcL*-Gens befinden sich die Gene der kleinen Internaline *i-inlI*, *i-inlH* und *i-inlG* in der deletierten Region. Der Deletionsbruchpunkt liegt im intergenischen Bereich zwischen *i-inlJ* und *i-inlI*.

ysnB: ein zum *B. subtilis*-Gen *ysnB* homologes Gen

tRNA^{Arg}: Gen für Arginin-tRNA

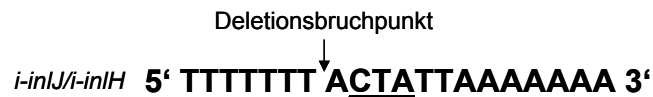
i-inlB2, *B*: Gene für die großen Internaline B2 und B

i-inlL-E: Gene für die kleinen Internaline B2, L, K, J, I, H, G, F und E

smcL: Gen für die Sphingomyelinase

ORF3: Open Reading Frame 3, Funktion unbekannt

Der Deletionsbruchpunkt befindet sich nicht wie am rechten Ende in einer codierenden Region, sondern im intergenischen Bereich zwischen den Genen für die kleinen Internaline *i-inlJ* und *i-inlI*, 142 bp nach dem Stopcodon von *i-inlJ* und 160 bp vor dem Translationsstart von *i-inlI*. Wie auch am rechten Ende der Deletion im *norA*-Gen (Kap. 5.1.5) findet man in der Sequenz um den Deletionsbruchpunkt ein AT-reiches, nicht ganz perfektes Palindrom mit zentralem "CTA".



Betrachtet man nun den gesamten deletierten Bereich der *L. ivanovii* Mutante GD-3 (Abb. 5.21), so handelt es sich um eine große Region von ca. 17,5 kb. Diese kann in zwei deutlich unterschiedliche Abschnitte unterteilt werden.

Der erste Bereich umfasst ca. 10 kb links von *ydeI* und ist spezifisch für *L. ivanovii*. Für alle in diesem Bereich liegenden Gene bzw. Open Reading Frames konnten keine Homologe in anderen *Listeria*-Arten gefunden werden. Dieser Abschnitt beinhaltet neben ORF3 fünf Gene für die kleinen Internaline *i-inlI*, *i-inlH*, *i-inlG*, *i-inlF* und *i-inlE*, die alle die gleiche Orientierung besitzen. Zusätzlich findet man in dieser Region das Gen *smcL*, das für die *L. ivanovii*-spezifische Sphingomyelinase codiert und in entgegengesetzter Richtung zu den Internalingenen vorliegt. Für die drei bekannten Gene *smcL*, *i-inlF* und *i-inlE* konnte zudem schon gezeigt werden, dass sie mögliche Virulenzfaktoren darstellen, da ein Fehlen dieser Gene zu völliger Avirulenz im Mausmodell führte (69, 95).

Der zweite Abschnitt beinhaltet die restlichen 7,5 kb der Deletion und besteht aus verschiedenen Genen bzw. Open Reading Frames unbekannter Funktion, zu denen sowohl in *L. monocytogenes* EGDe als auch in *L. innocua* CLIP11262 Orthologe gefunden wurden (Kap. 5.1.4), die in ähnlicher (*L. monocytogenes*) bzw. leicht veränderter Anordnung (*L. innocua*) wie in *L. ivanovii* vorliegen.

So erhält man eine Deletion mit "zusammengesetzter" Struktur, die allerdings über den gesamten Bereich einen ähnlichen GC-Gehalt aufweist. Der linke Bereich von *i-inlI* bis ORF3 besitzt einen GC-Gehalt von ca. 33,6 %, der rechte Abschnitt von ca. 35,0 %.

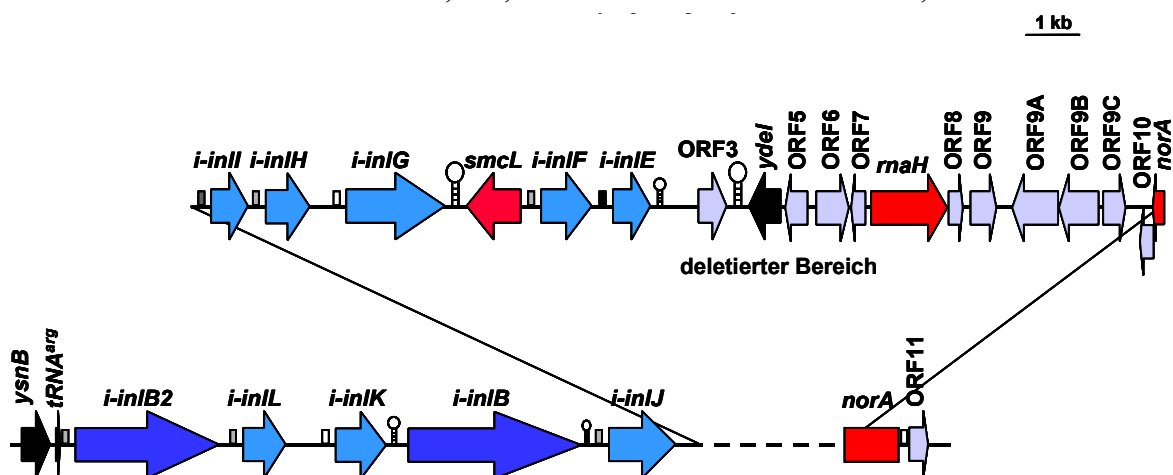


Abb. 5.21: Überblick über den gesamten deletierten Bereich in der *L. ivanovii* Mutante GD-3

Die in der Mutante GD-3 deletierte Region umfasst 17,5 kb und kann in zwei unterschiedliche Bereiche unterteilt werden. Im Abschnitt links von ORF3 sind fünf für *L. ivanovii* spezifische Internalingene und das Gen *smcL* deletiert, im rechten Bereich zahlreiche ORFs, die auch in *L. monocytogenes* und *L. innocua* zu finden sind.

5.3 *Listeria ivanovii* Pathogenitätsinsel 2 (LIPI-2)

(übernommen von G. Domínguez-Bernal [60])

In Virulenzessays konnte G. Domínguez-Bernal zeigen, dass der oben beschriebene deletierte Bereich einen Einfluss auf die Virulenz und Pathogenität von *L. ivanovii* hat.

Untersuchungen der LD₅₀ bei intravenös infizierten BALB/c-Mäusen ergaben, dass die LD₅₀ der *L. ivanovii* Mutante GD-3 eine Zehnerpotenz höher liegt ($5,37 \times 10^7$) als beim Wildtyp ($7,4 \times 10^6$). Auch in der Leber der infizierten Mäuse nahm die Zahl der Bakterien bei der Mutante GD-3 schneller ab als beim Wildtyp.

Ebenfalls konnte in einem natürlichen Wirt von *L. ivanovii* (Schaf) gezeigt werden, dass die Deletion mit einem Verlust der Pathogenität assoziiert ist. Bei einer Infektionsdosis von $3,5 \times 10^{11}$ Bakterien waren nach 48 Stunden alle drei der mit dem Wildtyp infizierten Lämmer tot. Bei Infektion mit der Mutante GD-3 überlebten zwei von drei infizierten Lämmern. Außerdem konnten bei einer niedrigeren Infektionsdosis ($1,5 \times 10^{11}$), bei der alle infizierten Tiere überlebten, nur in mit *L. ivanovii* Wildtyp infizierten Lämmern Bakterien in der Leber nachgewiesen werden.

Wie oben schon erwähnt (Kap. 5.2.4), kann die analysierte Deletion in zwei deutlich unterschiedliche Bereiche unterteilt werden. Der rechte Abschnitt besteht aus Genen, die in *L. monocytogenes* und auch in der apathogenen Art *L. innocua* vorhanden sind und Homologien zu Stoffwechselgenen aufweisen. Im Gegensatz dazu finden sich die Gene des linken Bereichs nur in *L. ivanovii* wieder. Neben dem Gen für die Sphingomyelinase *smcL* beinhaltet diese Region eine Reihe von Internalingenen, deren Proteine mit der Virulenz assoziiert sind. Allerdings befindet sich das linke Deletionsende zwischen zwei Internalingenen und nicht am Ende einer für *L. ivanovii* spezifischen Region, wie man es für ein bewegliches, Virulenz-assoziiertes Element erwartet hätte.

Abweichend von der Deletion der Mutante GD-3 existiert in *L. ivanovii* also eine spezifische Region, die nur in *L. ivanovii* und nicht in anderen *Listeria*-Arten zu finden ist. Da diese einige Merkmale einer Pathogenitätsinsel aufweist, wurde sie *Listeria ivanovii* Pathogenitätsinsel 2 – kurz LIPI-2 – genannt (Abb. 5.22).

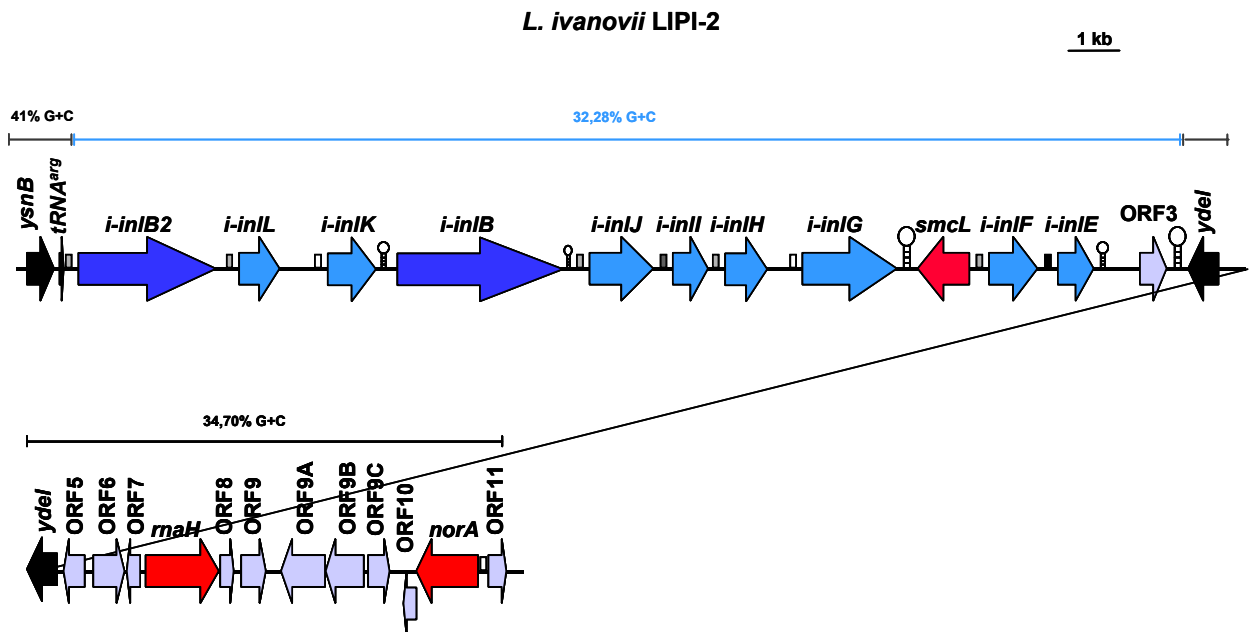


Abb. 5.22: *Listeria ivanovii* Pathogenitätsinsel 2 (LIPI-2)

(modifiziert nach G. Domínguez-Bernal [60])

Überblick über die gesamte analysierte Region in *L. ivanovii*. LIPI-2 besitzt eine Größe von ca. 22 kb und enthält zehn Internalingene (blaue Pfeile), das Gen für die Sphingomyelinase *smcL* (roter Pfeil) sowie ein Open Reading Frame ORF3 unbekannter Funktion (lila Pfeil). Flankiert wird LIPI-2 von den Genen *ysnB*, *ydeI* und einem Gen für eine Arginin-tRNA (schwarze Pfeile).

Der GC-Gehalt der einzelnen Abschnitte ist in entsprechender Farbe oberhalb der Pfeile angegeben.

Die *Listeria ivanovii* Pathogenitätsinsel 2 (LIPI-2) besitzt eine Größe von 22,047 kb und wird flankiert von den beiden zu *B. subtilis* homologen Genen *ysnB* und *ydeI* mit unbekannter Funktion. Zudem liegt am linken Ende ein Gen für eine Arginin-tRNA.

LIPI-2 selbst beinhaltet eine Reihe von Internalingenen, zwei große (*i-inB2* und *B*) und acht kleine (*i-inL*, *K*, *J*, *I*, *H*, *G*, *F* und *E*) Internaline. Daneben findet sich noch das Gen für die Sphingomyelinase *smcL* und ein Open Reading Frame ORF3 unbekannter Funktion, für das bisher jedoch keine signifikanten Homologien zu Genen anderer *Listeria*-Arten (*L. monocytogenes* und *L. innocua*, Kap. 5.1.4) gefunden wurden. Ihr GC-Gehalt beträgt 32,28 % und unterscheidet sich somit deutlich von dem des restlichen *L. ivanovii*-Genoms von ca. 38 % (240).

Somit konnte eine für die pathogene Art *L. ivanovii* spezifische Pathogenitätsinsel (LIPI-2) charakterisiert werden, deren Ursprung aber noch nicht geklärt ist.

5.4 Vorkommen von LIPI-2 in verschiedenen *L. ivanovii*-Stämmen und anderen *Listeria*-Arten

Da ein Hauptmerkmal einer Pathogenitätsinsel das Vorhandensein in einer oder mehreren pathogenen Arten und Fehlen in apathogenen Arten einer Bakteriengattung ist (110), sollte untersucht werden, ob LIPI-2 bzw. einzelne Gene in anderen *Listeria*-Arten zu finden sind. Außerdem sollte der Aufbau des zu LIPI-2 entsprechenden Bereichs in diesen Arten überprüft werden. Zudem sollte analysiert werden, ob LIPI-2 nur für den Typstamm *L. ivanovii* ATCC19119 charakteristisch ist oder auch in anderen *L. ivanovii*-Stämmen oder Unterarten zu finden ist.

5.4.1 Vorhandensein und Struktur von LIPI-2 in verschiedenen *L. ivanovii*-Stämmen

(in Zusammenarbeit mit Petra Herrmann [114])

Da die Internalingene von LIPI-2 aufgrund ihrer zahlreichen Repeat-Regionen ein bevorzugter Ort von Rekombinationsereignissen sein könnten, sollte eine mögliche genetische Variabilität dieses Bereiches in verschiedenen *L. ivanovii*-Stämmen untersucht werden.

Die Art *L. ivanovii* unterteilt sich in zwei Subspezies, von denen *L. ivanovii* subsp. *ivanovii* den Hauptteil ausmacht. Die Unterart *londoniensis* unterscheidet sich deutlich durch biochemische Eigenschaften und genetische Divergenz von *L. ivanovii* subsp. *ivanovii* (14).

Im Rahmen ihrer Diplomarbeit hat Petra Herrmann das Vorkommen und die Anordnung der Gene von LIPI-2 und ihren angrenzenden Bereichen in anderen *L. ivanovii*-Isolaten mittels PCR-Kartierung untersucht (114).

Aus den beiden Subspezies wurden folgende Stämme unterschiedlicher Herkunft überprüft (Tab. 5.9).

<i>Listeria ivanovii</i>	Subspezies	Herkunft
ATCC19119	<i>ivanovii</i>	ATCC, USA
P-24	<i>ivanovii</i>	klin. Isolat, Neuseeland
C-663	<i>ivanovii</i>	klin. Isolat, Madrid
P-19	<i>ivanovii</i>	klin. Isolat, Neuseeland
D-23	<i>ivanovii</i>	klin. Isolat (Abort, Schaf), Madrid
L1PE	<i>ivanovii</i>	Isolat aus Milch, Frankreich
P-55	<i>ivanovii</i>	klin. Isolat, Madrid
NCTC-11846	<i>ivanovii</i>	Madrid
subsp. <i>lond.</i>	<i>londoniensis</i>	Madrid

Tab. 5.9: Für die PCR-Kartierung verwendete *L. ivanovii*-Stämme

Bei den in Tab. 5.9 aufgeführten *L. ivanovii*-Stämmen konnte Petra Herrmann alle LIPI-2-Gene mit Oligonukleotiden aus dem intragenischen Bereich nachweisen. Einzige Ausnahme war *i-inlB2*, das in *L. ivanovii* subsp. *londoniensis* mit der gewählten Primerkombination nicht detektiert werden konnte (114). Ebenso konnte G. Domínguez-Bernal *i-inlB2* in *L. ivanovii* subsp. *londoniensis* nicht nachweisen (60).

Auch die in dieser Arbeit analysierten Open Reading Frames rechts von *smcL* (Kap. 5.1.3) konnten in allen Stämmen mittels PCR identifiziert werden.

Zusätzlich wurde die Orientierung der LIPI-2-Gene untersucht, indem Oligonukleotide von benachbarten Genen kombiniert wurden. Hierbei kam es bei mehreren Stämmen zu Abweichungen. So ist die Orientierung von *i-inlJ/I/H* in *L. ivanovii* P-24 und D-23 fraglich. Auch die Abfolge von *rnaH/ORF8* und *ORF10/norA* konnte bei *L. ivanovii* D-23 nicht eindeutig bestimmt werden. Interessanterweise liegen die unsicheren Bereiche in den Regionen, in denen sich die Deletionsbruchpunkte der Mutante GD-3 befinden.

Für *L. ivanovii* subsp. *londoniensis* schließlich konnte für fast alle Gene deren Reihenfolge nicht eindeutig geklärt werden. Dies bedeutet jedoch nicht zwangsläufig, dass die LIPI-2-Gene eine von *L. ivanovii* ATCC19119 abweichende Anordnung besitzen, sondern kann auch auf Sequenzabweichungen und damit fehlende Bindung der Oligonukleotide in den PCRs beruhen.

Somit finden sich in den untersuchten *L. ivanovii*-Stämmen fast alle Gene der *Listeria ivanovii* Pathogenitätsinsel 2. Die genaue Anordnung dieser Gene konnte von Petra Herrmann allerdings nicht vollständig geklärt werden.

5.4.2 Vorkommen von LIPI-2 in anderen *Listeria*-Arten

Vergleiche mit der Genomsequenz von *L. monocytogenes* EGDe und *L. innocua* CLIP11262 haben gezeigt, dass LIPI-2 nicht in diesen beiden Arten vorhanden ist. Für die restlichen *Listeria*-Arten liegt bis zum heutigen Zeitpunkt noch keine vollständige Genomsequenz vor, so dass nicht ausgeschlossen werden kann, ob sich LIPI-2 oder Teile dieser Pathogenitätsinsel nicht dort wiederfinden. Deshalb sollten in dieser Arbeit LIPI-2 und die flankierenden Gene untersucht werden, um Genaueres über die genetische Organisation dieses Bereichs in den anderen *Listeria*-Arten herauszufinden.

G. Domínguez-Bernal untersuchte in seiner Arbeit das Vorkommen des Bereichs *ysnB-ydeI* in verschiedenen Serovaren von *L. monocytogenes* sowie in allen anderen *Listeria*-Arten einschließlich *L. grayi* und *L. grayi* subsp. *murrayi* (60). Es stellte sich heraus, dass die LIPI-2 flankierenden Gene *ysnB* und *ydeI* in allen *Listeria*-Arten bis auf *L. grayi* und *L. grayi* subsp. *murrayi* vorhanden sind. Das dazwischen liegende ORF3 ist allerdings nur bei *L. monocytogenes* und *L. innocua* mit PCR nachweisbar, was mit den Daten aus den bekannten Genomsequenzen übereinstimmt (Kap. 5.1.4).

Mittels PCR wurde nun in dieser Arbeit untersucht, ob auch die Open Reading Frames rechts von LIPI-2 in den anderen *Listeria*-Arten vorhanden sind.

Hierzu wurden zum einen PCRs mit intragenischen Oligonukleotiden durchgeführt, um das Vorkommen der einzelnen ORFs zu überprüfen, zum anderen wurden sog. "Brücken"-PCRs durchgeführt, um Klarheit über die Anordnung der einzelnen ORFs zu erhalten.

Zunächst wurden Alignments mit den aus der Genomsequenz von *L. monocytogenes* EGDe bekannten Sequenzen und den in dieser Arbeit erhaltenen Sequenzen von *L. ivanovii* durchgeführt und dann aus den Bereichen Oligonukleotide ausgewählt, die bei diesen beiden *Listeria*-Arten größte Übereinstimmung zeigten.

Intragenische PCRs mit *L. ivanovii*, *L. monocytogenes*, *L. seeligeri* und *L. welshimeri*

Mit den aus den Alignments ausgewählten Oligonukleotiden wurden dann zunächst intragenische PCRs durchgeführt (Abb. 5.23, Tab. 5.10).

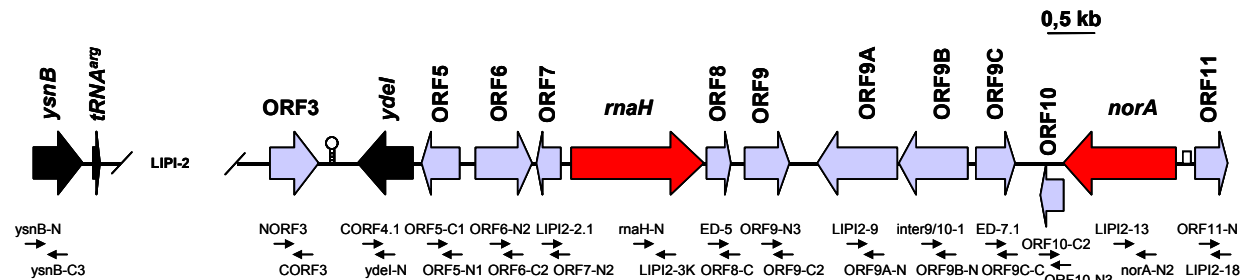


Abb. 5.23: Überblick über die für die intragenischen PCRs verwendeten Oligonukleotide

In Form von großen Pfeilen sind die in *L. ivanovii* identifizierten ORFs dargestellt (vgl. Abb. 5.6, Abb. 5.9). Darunter ist die Lage der für die intragenischen PCRs eingesetzten Primerpaare in Form von kleinen Pfeilen angegeben. Das Ergebnis der PCRs ist in Tab. 5.10 zusammengefasst.

Die ausgewählten Oligonukleotide wurden zuerst mit chromosomaler DNA von *L. ivanovii* getestet und die PCR-Bedingungen optimiert. In nachfolgender Abbildung (Abb. 5.24) sind die in den anderen *Listeria*-Arten verwendeten Primerkombinationen mit chromosomaler DNA von *L. ivanovii* getestet. Für jedes Gen wurden zunächst mehrere Primerkombinationen überprüft und schließlich die am besten funktionierenden für die weiteren PCRs eingesetzt. Mit den optimierten Primerkombinationen konnten für alle in Abb. 5.23 gezeigten Gene bzw. ORFs PCR-Produkte erhalten werden. Wie man in Abb. 5.24 sieht, variiert die Bandenstärke und man erhält nicht in allen Ansätzen gleiche Mengen an PCR-Produkt. Eine Ursache dafür sind vermutlich unterschiedlich gute Bindungseigenschaften der ausgewählten Oligonukleotide an die eingesetzte chromosomale DNA.

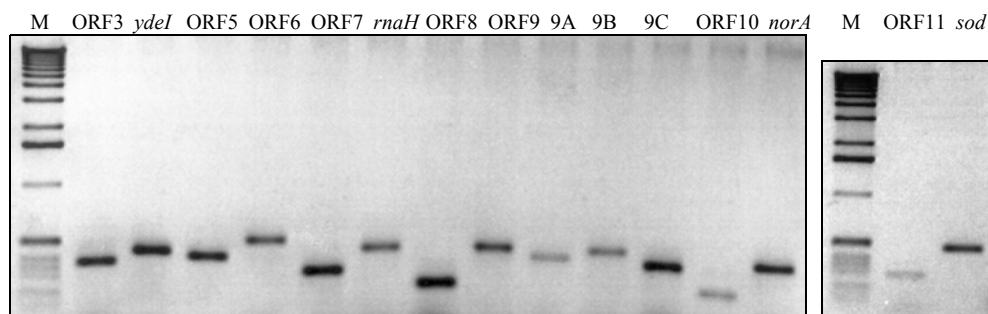


Abb. 5.24: Intragenische PCR mit chromosomaler DNA von *L. ivanovii*
M: Marker (Gibco BRL)

Für die Untersuchung des Vorhandenseins der in *L. ivanovii* identifizierten Gene wurden die drei *Listeria*-Arten *L. monocytogenes*, *L. seeligeri* und *L. welshimeri* ausgewählt. Die apathogene Art *L. innocua* wurde nicht getestet, da schon die komplette Genomsequenz vorliegt (vgl. Kap. 5.1.4). Auch *L. grayi* und *L. grayi* subsp. *murrayi* wurden nicht näher untersucht, da diese im Verwandtschaftsgrad am weitesten entfernt liegen und G. Domínguez-Bernal zudem für die Gene *ysnB*, *ORF3* und *ydel* keine PCR-Produkte nachweisen konnte (60).

Betrachtet man die PCR mit chromosomaler DNA von *L. monocytogenes* (Abb. 5.25), so erhält man für alle überprüften Gene bis auf ORF9, 9A, 9B, 9C, ORF10 und ORF11 ein positives Ergebnis. Dies spiegelt teilweise die in Kap. 5.1.4 dargelegten Vergleiche mit der Genomsequenz von *L. monocytogenes* EGDe wieder und bedeutet, dass in *L. monocytogenes* abgesehen von den drei zusätzlichen Open Reading Frames ORF9A, 9B und 9C die restlichen in *L. ivanovii* identifizierten Gene auch in *L. monocytogenes* vorliegen.

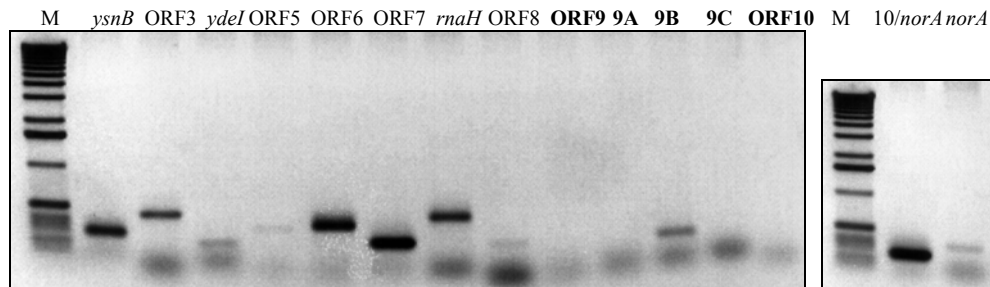


Abb. 5.25: Intragenische PCR mit chromosomaler DNA von *L. monocytogenes*

M: Marker (Gibco BRL)

Abweichungen von *L. ivanovii* sind in Fettdruck hervorgehoben.

Fraglich sind nur die ORF9A, 9B und 9C flankierenden Open Reading Frames ORF9 und ORF10, für die auch kein PCR-Produkt nachgewiesen werden konnte. Zudem erhält man bei ORF9B eine Bande, die aber nicht exakt der Größe in *L. ivanovii* entspricht. Dies bedeutet, dass eventuell ein unspezifisches PCR-Produkt vorliegt bzw. die ausgewählten Oligonukleotide in dem zu ORF9B homologen Open Reading Frame (LMO00432, Kap. 5.1.4) an anderer Stelle im Genom von *L. monocytogenes* EGDe binden könnten. Auch für ORF11 ist kein PCR-Produkt detektierbar, was jedoch auch daran liegen kann, dass die ausgewählten Primer schlecht binden, denn selbst in *L. ivanovii* erhält man für ORF11 nur ein sehr schwaches PCR-Produkt (Abb. 5.24).

Bei *L. seeligeri* (Abb. 5.26) findet sich ein ähnliches Bild wie bei *L. monocytogenes* (Abb. 5.25). Bis auf ORF3, 9A, 9B, 9C und *norA* sind alle anderen Gene bzw. Open Reading Frames von *L. ivanovii* nachweisbar. Selbst die in *L. monocytogenes* fehlenden ORFs ORF9 und ORF10 sind in *L. seeligeri* vorhanden. Dafür fehlen im Gegensatz zu *L. monocytogenes* ORF3 und *norA*.

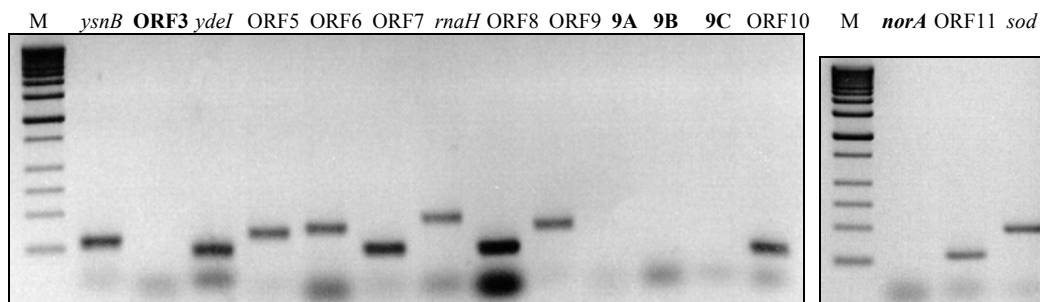


Abb. 5.26: Intragenische PCR mit chromosomaler DNA von *L. seeligeri*

M: Marker (Stratagene)

Abweichungen von *L. ivanovii* sind in Fettdruck hervorgehoben.

Somit scheint zumindest der Bereich zwischen *ydeI* und ORF9 bei *L. seeligeri* und *L. monocytogenes* ähnlich aufgebaut zu sein wie bei *L. ivanovii*. Allerdings fehlen bei beiden untersuchten Arten die sich bei *L. ivanovii* zwischen ORF9 und ORF10 befindlichen zusätzlichen ORFs ORF9A, ORF9B und ORF9C.

Prüft man schließlich *L. welshimeri*, so finden sich – wenn zum Teil auch nur mit schwachen PCR-Produkten – die meisten *L. ivanovii*-ORFs wieder (Abb. 5.27). Abweichungen erhält man für ORF3, ORF9A, 9B, 9C, *norA* und ORF11.

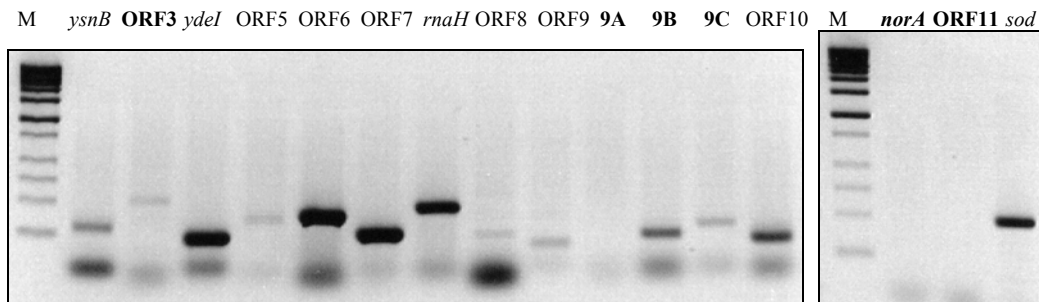


Abb. 5.27: Intragenische PCR mit chromosomaler DNA von *L. welshimeri*
M: Marker (Stratagene)
Abweichungen von *L. ivanovii* sind in Fettdruck hervorgehoben.

Für ORF3 erhält man ein Produkt von 500 bp statt den erwarteten 370 bp. Somit handelt es sich bei ORF3 vermutlich um ein unspezifisches PCR-Produkt, da es neben der falschen Größe auch nur sehr schwach auf dem Agarosegel zu erkennen ist. Die Open Reading Frames ORF9A und 9B sind auch bei *L. welshimeri* nicht zu finden. Man erhält für ORF9B wie schon bei *L. monocytogenes* ein Produkt von geringerer Größe (ca. 260 bp), was auf ein unspezifisches PCR-Produkt bzw. Bindung der Oligonukleotide in einem zu ORF9B homologen Genomabschnitt hindeuten könnte. Für ORF9C erhält man überraschenderweise ein PCR-Produkt in der richtigen Größe (ca. 360 bp), das aber auch nur mit geringer Bandenstärke auf dem Agarosegel sichtbar ist. Das sich anschließende Open Reading Frame ORF10 ist in der korrekten Größe nachweisbar, die nachfolgenden Gene *norA* und ORF11 sind mit den ausgewählten Primerkombinationen aber nicht detektierbar.

In Tab. 5.10 sind die beschriebenen Ergebnisse nochmals zusammengefasst. Mit den optimierten Primern konnten so in allen drei untersuchten *Listeria*-Arten die Gene *ysnB*, *ydeI*, ORF5, ORF6, ORF7, *rnaH* und ORF8 nachgewiesen werden.

Abweichungen gab es allerdings bei ORF3, das in *L. seeligeri* und *L. welshimeri* nicht amplifiziert werden konnte. Weiter konnten ORF9, ORF10 und ORF11 trotz Vorhandensein in der *L. monocytogenes* EGDe-Genomsequenz in dieser Art nicht nachgewiesen werden. Ebenso fehlten bei *L. monocytogenes* die Open Reading Frames ORF9A, 9B und 9C, die jedoch auch in der Genomsequenz nicht zu finden sind.

Auch bei *L. seeligeri* und *L. welshimeri* sind die zwischen ORF9 und ORF10 liegenden Open Reading Frames ORF9A, 9B und 9C vermutlich nicht vorhanden. Für ORF9C wurde in *L. welshimeri* allerdings ein positives PCR-Produkt erhalten. Zudem ist in diesen beiden *Listeria*-Arten *norA* nicht nachweisbar und bei *L. welshimeri* fehlt zusätzlich ORF11.

Gen	<i>L. ivanovii</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. seeligeri</i>	<i>L. welshimeri</i>
<i>ysnB</i>	+	+	+	+
ORF3	+	+	-	-
<i>ydeI</i>	+	(+)	+	+
ORF5	+	(+)	+	(+)
ORF6	+	+	+	+
ORF7	+	+	+	+
<i>rnaH</i>	+	+	+	+
ORF8	+	(+)	+	(+)
ORF9	+	-	+	(+)
ORF9A	+	-	-	-
ORF9B	+	-	-	-
ORF9C	+	-	-	+
ORF10	+	-	+	+
<i>norA</i>	+	+	-	-
ORF11	+	-	+	-

Tab. 5.10: Ergebnis der intragenischen PCRs in den verschiedenen *Listeria*-Arten
 + PCR-Produkt vorhanden; - kein PCR-Produkt detektierbar
 (+) PCR-Produkt der richtigen Größe nur schwach nachweisbar

Intergenische PCRs mit *L. ivanovii*, *L. monocytogenes*, *L. seeligeri* und *L. welshimeri*

Da also durch die intragenischen PCRs nicht vollständig geklärt werden konnte, ob alle in *L. ivanovii* identifizierten Open Reading Frames auch in den drei untersuchten *Listeria*-Arten vorhanden sind, und zudem noch nichts über deren mögliche Lage bekannt ist, wurden zusätzlich sog. "Brücken"-PCRs durchgeführt, um die intergenischen Regionen abzudecken und so die Lage der ORFs zu überprüfen.

Für die intergenischen PCRs wurden teilweise die Oligonukleotide aus den intragenischen PCRs verwendet. Es mussten auch einige neue Primer ausgesucht und die PCR-Bedingungen nochmals optimiert werden. Ein Überblick über die letztendlich erfolgreich durchgeführten "Brücken"-PCRs ist in nachfolgender Abbildung (Abb. 5.28) zu sehen.

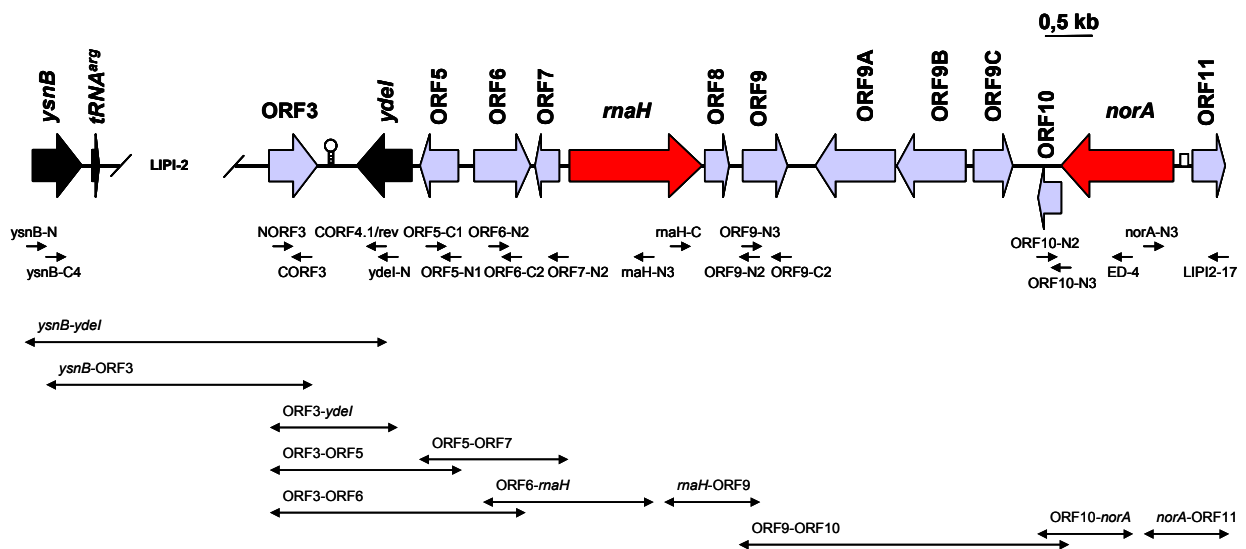


Abb. 5.28: Übersicht über die für die intergenischen PCRs eingesetzten Oligonukleotide

In Form von großen Pfeilen sind die in *L. ivanovii* identifizierten ORFs dargestellt (vgl. Abb. 5.6, Abb. 5.9). Darunter ist die Lage der für die intergenischen PCRs eingesetzten Primerpaare in Form von kleinen Pfeilen angegeben. Die mit den aufgeführten Oligonukleotiden erhaltenen PCR-Produkte sind in Form von Doppelpfeilen dargestellt. Das Ergebnis der PCRs ist in Tab. 5.11 zusammengefasst.

In *L. ivanovii* (Abb. 5.29, Abb. 5.30) konnten mit den ausgewählten Primerpaaren bis auf den Bereich *ysnB-ydeI* (Abb. 5.30 Spur 3-6) bzw. *ysnB*-ORF3 (Abb. 5.30 Spur 1+2) alle in Abb. 5.28 gezeigten intergenischen Bereiche amplifiziert werden. Für die intergenische Region *ysnB-ydeI* wurde kein PCR-Produkt erhalten, da sich bei *L. ivanovii* zwischen diesen beiden Genen die *Listeria ivanovii* Pathogenitätsinsel 2 (LIPI-2) befindet, die eine Größe von ca. 22 kb besitzt.

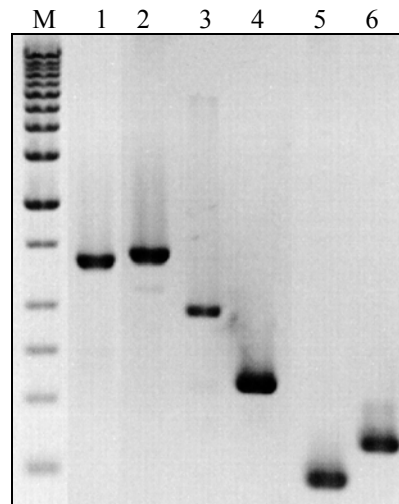


Abb. 5.29: Intergenische PCR mit chromosomaler DNA von *L. ivanovii*

M: Marker (Stratagene)

Spur 1: ORF3-*ydeI*

Spur 2: ORF5-ORF7

Spur 3: ORF6-*rnaH*

Spur 4: *rnaH*-ORF9

Spur 5: ORF10-*norA*

Spur 6: *norA*-ORF11

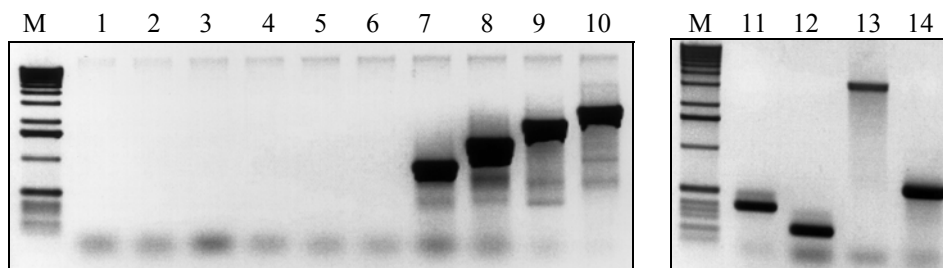


Abb. 5.30: "Brücken"-PCR mit chromosomaler DNA von *L. ivanovii*

M: Marker (Gibco BRL)

Spur 1+2: *ysnB*-ORF3

Spur 3-6: *ysnB-ydeI*

Spur 7+8: ORF3-*ydeI*

Spur 9: ORF3-ORF5

Spur 10: ORF3-ORF6

Spur 11: ORF9

Spur 12: ORF10

Spur 13: ORF9-ORF10

Spur 14: ORF11

Betrachtet man *L. monocytogenes*, so stimmt der Bereich *ysnB-ydeI* mit den Daten aus der *L. monocytogenes* EGDe-Genomsequenz (Kap. 5.1.4) überein. Ebenso findet man alle weiteren untersuchten intergenischen Regionen in gleicher Größe wie bei *L. ivanovii* auch bei *L. monocytogenes* (Abb. 5.31, Abb. 5.32). Zum Teil erhält man in den durchgeführten PCRs nur schwache Banden (Abb. 5.32, Spur 3, 7-10), was möglicherweise auf Sequenzabweichungen und dadurch verminderte Bindung der Oligonukleotide zurückzuführen ist.

Einzige Abweichung in *L. monocytogenes* ist die Region zwischen ORF9 und ORF10. Bei *L. ivanovii* erhält man mit den ausgewählten Oligonukleotiden ein PCR-Produkt mit einer Größe von ca. 3,4 kb (Abb. 5.30, Spur 13). Bei *L. monocytogenes* lässt sich auf dem Agarosegel eine viel kleinere Bande (ca. 700 bp) detektieren (Abb. 5.31, Spur 4, Abb. 5.32, Spur 13). Diese Abweichung von *L. ivanovii* stimmt wiederum mit den *L. monocytogenes*-EGDe-Sequenzdaten überein, da durch Sequenzvergleiche (Kap. 5.1.4) und intragenische PCRs schon festgestellt werden konnte, dass die drei Open Reading Frames ORF9A, 9B und 9C bei *L. monocytogenes* nicht vorhanden sind.

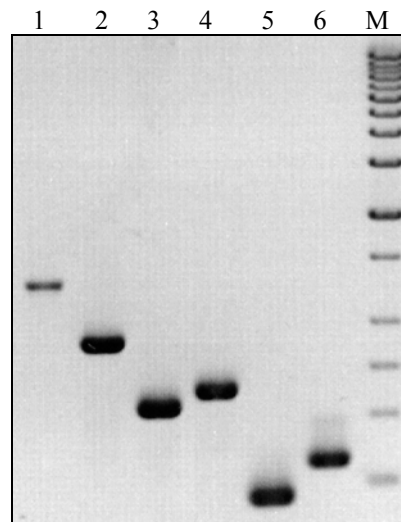


Abb. 5.31: Intergenische PCR mit chromosomaler DNA von *L. monocytogenes*

M: Marker (Stratagene)

Spur 1: ORF5-ORF7

Spur 4: ORF9-ORF10

Spur 2: ORF6-*rnaH*

Spur 5: ORF10-*norA*

Spur 3: *rnaH*-ORF9

Spur 6: *norA*-ORF11

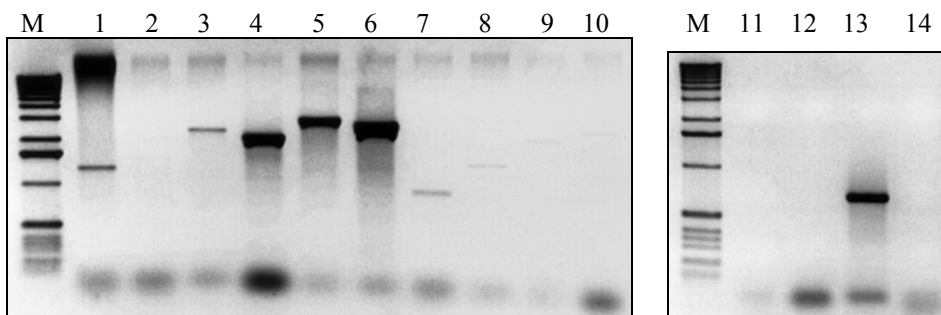


Abb. 5.32: "Brücken"-PCR mit chromosomaler DNA von *L. monocytogenes*

M: Marker (Gibco BRL)

Spur 1+2: *ysnB*-ORF3

Spur 7+8: ORF3-*ydeI*

Spur 11: ORF9

Spur 3-6: *ysnB*-*ydeI*

Spur 9: ORF3-ORF5

Spur 12: ORF10

Spur 10: ORF3-ORF6

Spur 13: ORF9-ORF10:

Spur 14: ORF11

In *L. seeligeri* (Abb. 5.33) findet man keine eindeutigen PCR-Produkte im Bereich *ysnB-ydeI*. Neben etlichen unspezifischen Banden ist nur ein sehr schwaches Produkte der richtigen Größe bei ORF3-*ydeI* auf dem Agarosegel zu erkennen (Abb. 5.33, Spur 3). Auch für die intergenischen Regionen ORF3-ORF5 und ORF3-ORF6 sind keine Produkte der erwarteten Größe detektierbar, sondern nur unspezifische, zum Teil sogar sehr starke Banden auf dem Agarosegel erkennbar.

Ab ORF5 finden sich die in Kap. 5.4.2 identifizierten Open Reading Frames in gleicher Anordnung wie bei *L. ivanovii* bzw. *L. monocytogenes*.

Für den Bereich ORF9-ORF10 erhält man wieder nur ein PCR-Produkt von 700 bp Größe (Abb. 5.33, Spur 9). Dies bedeutet, dass wie schon bei *L. monocytogenes* auch bei *L. seeligeri* keine zusätzlichen Open Reading Frames ORF9A, 9B und 9C zwischen ORF9 und ORF10 zu finden sind.

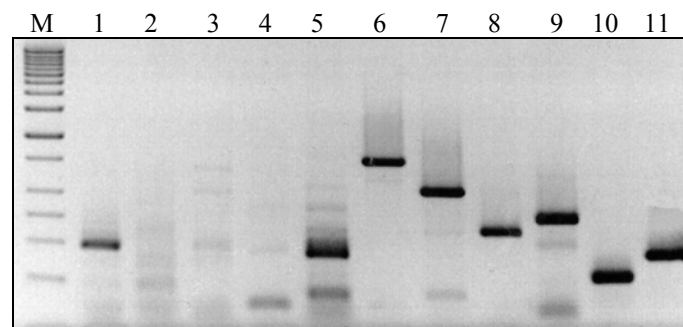


Abb. 5.33: Intergenische PCR mit chromosomaler DNA von *L. seeligeri*

M: Marker (Stratagene)

Spur 1: <i>ysnB</i> -ORF3	Spur 5: ORF3-ORF6	Spur 9: ORF9-ORF10
Spur 2: <i>ysnB-ydeI</i>	Spur 6: ORF5-ORF7	Spur 10: ORF10- <i>norA</i>
Spur 3: ORF3- <i>ydeI</i>	Spur 7: ORF6- <i>rnaH</i>	Spur 11: <i>norA</i> -ORF11
Spur 4: ORF3-ORF5	Spur 8: <i>rnaH</i> -ORF9	

Auch in *L. welshimeri* konnten nicht alle intergenischen Bereiche eindeutig geklärt werden (Abb. 5.34). So erhält man zwar schwache PCR-Produkte für die Regionen *ysnB*-ORF3 und ORF3-*ydeI* (Abb. 5.34, Spur 1 bzw. 3), der gesamte Bereich *ysnB-ydeI* konnte jedoch nicht nachgewiesen werden und es findet sich nur ein PCR-Produkt kleinerer Größe (ca. 400 bp, Abb. 5.34, Spur 2) als beispielsweise bei *L. monocytogenes* (ca. 2,0 kb, Abb. 5.32, Spur 3-6).

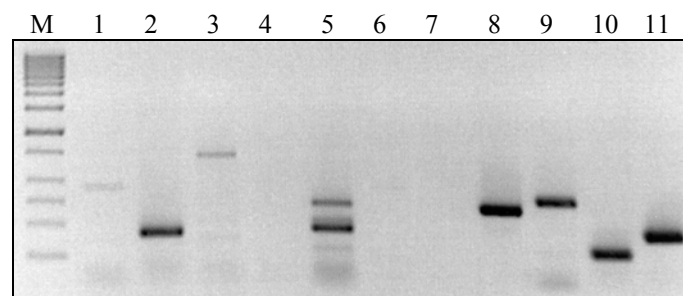


Abb. 5.34: Intergenische PCR mit chromosomaler DNA von *L. welshimeri*

M: Marker (Stratagene)

Spur 1: <i>ysnB</i> -ORF3	Spur 5: ORF3-ORF6	Spur 9: ORF9-ORF10
Spur 2: <i>ysnB-ydeI</i>	Spur 6: ORF5-ORF7	Spur 10: ORF10- <i>norA</i>
Spur 3: ORF3- <i>ydeI</i>	Spur 7: ORF6- <i>rnaH</i>	Spur 11: <i>norA</i> -ORF11
Spur 4: ORF3-ORF5	Spur 8: <i>rnaH</i> -ORF9	

Ferner konnten die sich an ORF3 anschließenden Regionen bis einschließlich *rnaH* nicht bestimmt werden, da mit den meisten Oligonukleotiden keine PCR-Produkte erhalten wurden. Rechts von *rnaH* liegt wieder die gleiche Genanordnung wie schon in *L. monocytogenes* und *L. seeligeri* vor. Ebenso findet man zwischen ORF9 und ORF10 keine zusätzlichen ORFs ORF9A, 9B und 9C, sondern kann nur eine kleine intergenische Region zwischen ORF9 und ORF10 detektieren (Abb. 5.34, Spur 9).

In Tab. 5.11 sind die Ergebnisse der intergenischen PCRs nochmals dargestellt.

Für *L. ivanovii* und *L. monocytogenes* konnten alle intergenischen Bereiche nachgewiesen werden. Nur *ysnB*-ORF3 bzw. *ysnB-ydeI* konnten bei *L. ivanovii* nicht amplifiziert werden, da das zugehörige PCR-Produkt durch die zwischen *ysnB* und *ydeI* liegende Pathogenitätsinsel LIPI-2 eine Größe von mehr als 22 kb erreicht hätte, was mit normalen PCR-Bedingungen nicht durchführbar ist.

"Brücken"-PCR	<i>L. ivanovii</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. seeligeri</i>	<i>L. welshimeri</i>
<i>ysnB</i> -ORF3	(-)	+	-	(+)
<i>ysnB-ydeI</i>	(-)	+	-	-
ORF3- <i>ydeI</i>	+	(+)	(+)	+
ORF3-ORF5	+	(+)	-	-
ORF3-ORF6	+	(+)	-	-
ORF5-ORF7	+	+	+	-
ORF6- <i>rnaH</i>	+	+	+	-
<i>rnaH</i> -ORF9	+	+	+	+
ORF9-ORF10	+	+	+	+
ORF10- <i>norA</i>	+	+	+	+
<i>norA</i> -ORF11	+	+	+	+

Tab. 5.11: Ergebnis der intergenischen PCRs in den verschiedenen *Listeria*-Arten

+ PCR-Produkt vorhanden; - kein PCR-Produkt detektierbar

(+) PCR-Produkt der richtigen Größe nur schwach nachweisbar

(-) kein Produkt vorhanden, da zu groß für eingesetzte PCR-Bedingungen

Fasst man nun die intra- und intergenischen PCRs zusammen, so ergibt sich für das Vorhandensein und die Lage der in *L. ivanovii* neu identifizierten Open Reading Frames in den drei untersuchten *Listeria*-Arten folgendes Bild (Abb. 5.35):

Wie aus den Sequenzdaten schon bekannt (Kap. 5.1.4) sind in *L. monocytogenes* die Open Reading Frames wie in *L. ivanovii* angeordnet. Einziger Unterschied ist das Fehlen der drei ORFs ORF9A, 9B und 9C zwischen ORF9 und ORF10 bei *L. monocytogenes*. Diese ORFs sind auch bei *L. seeligeri* und *L. welshimeri* nicht vorhanden.

L. seeligeri besitzt alle restlichen ORFs (bis auf ORF3) in gleicher Anordnung wie *L. monocytogenes*. Fraglich bleibt nur der Bereich zwischen *ysnB* und *ydeI*. Sowohl *ysnB* als auch *ydeI* konnten mit intragenischen PCRs nachgewiesen werden, das bei *L. ivanovii* und *L. monocytogenes* dazwischen liegende ORF3 aber nicht. Auch mit intergenischen PCRs konnten die Bereiche *ysnB*-ORF3, ORF3-*ydeI* und *ysnB-ydeI* nicht eindeutig geklärt werden, so dass offen bleibt, ob sich in diesem Bereich zusätzliche bzw. andere Gene als in *L. ivanovii* und *L. monocytogenes* befinden.

L. welshimeri schließlich zeigt mehrere Abweichungen. So lassen sich zwar die einzelnen Gene *ysnB* und *ydeI* sowie die intergenischen Regionen *ysnB*-ORF3 und ORF3-*ydeI* nachweisen, der gesamte Bereich *ysnB*-*ydeI* ist jedoch nicht amplifizierbar. Auch die rechts von *ydeI* liegende Region bis *rnaH* ist mit den gewählten Primerkombinationen nicht eindeutig bestimmbar. Zwar sind die meisten Open Reading Frames mit intragenischen PCRs nachweisbar, ihre Lage konnte jedoch nicht eindeutig geklärt werden. Ab *rnaH* aber liegt wieder die gleiche Anordnung der ORFs wie bei *L. monocytogenes* und *L. seeligeri* vor.

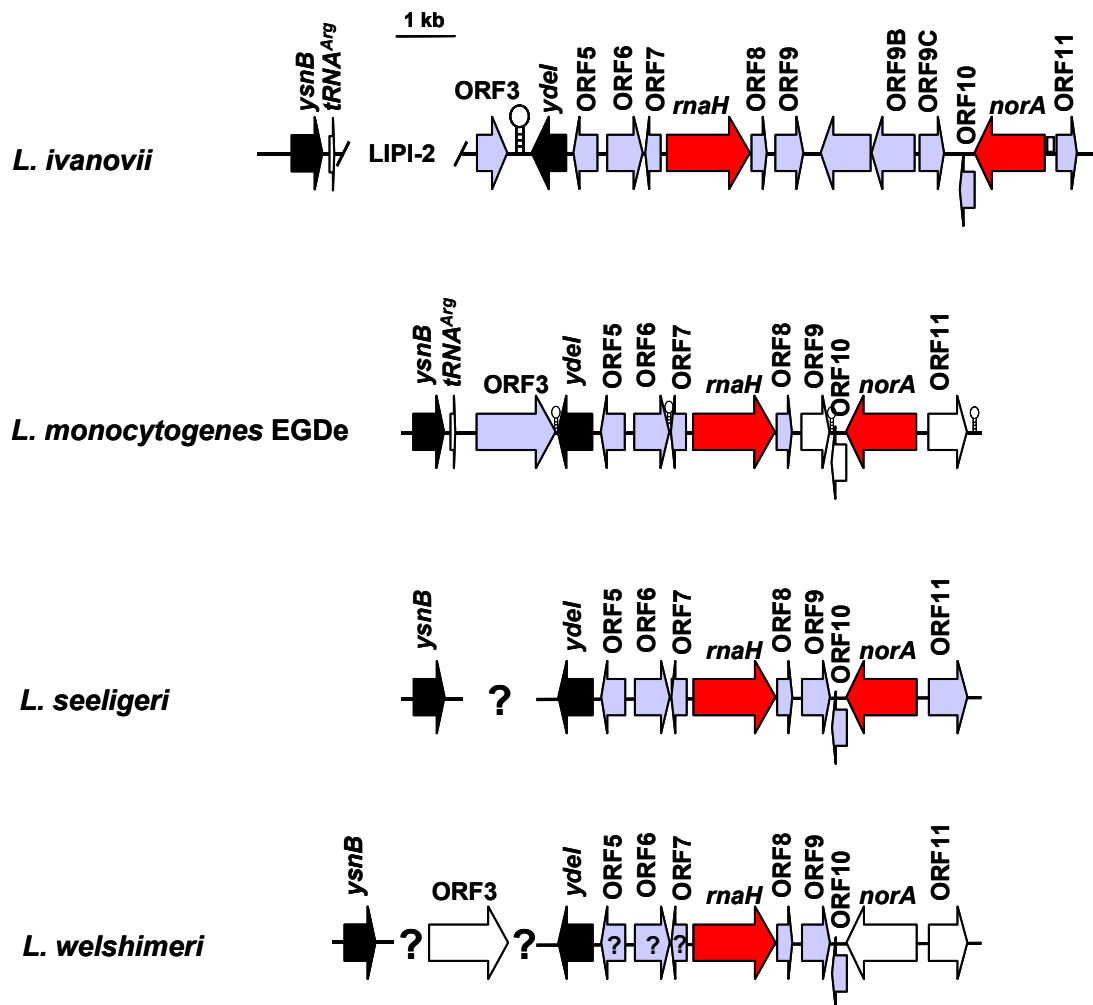


Abb. 5.35: Vorhandensein und Lage der *L. ivanovii*-ORFs in *L. monocytogenes*, *L. seeligeri* und *L. welshimeri*

Übersicht über die intra- und intergenischen PCRs. Bunte Pfeile stellen positive intragenische PCRs dar, d.h. das Gen bzw. Open Reading Frame ist nachweisbar. Weiße Pfeile symbolisieren negative PCR-Resultate.

Fragezeichen weisen auf Unklarheiten bei der Lage der einzelnen Open Reading Frames hin.

5.4.3 Analyse des Bereichs *ysnB-ydeI* in *L. seeligeri* und *L. welshimeri*

Da der Bereich zwischen *ysnB* und *ydeI* in *L. ivanovii* die Pathogenitätsinsel LIPI-2 beinhaltet und bei *L. seeligeri* und *L. welshimeri* nicht eindeutig geklärt werden konnte, scheint diese Region eventuell genetische Variabilität zu besitzen und sollte deshalb bei *L. seeligeri* und *L. welshimeri* genauer untersucht werden.

Hierzu wurden zunächst weitere PCRs mit neuen Primerkombinationen durchgeführt. Zur Auswahl der Oligonukleotide wurde ein weiteres Alignment der Sequenzen von ORF3 von *L. monocytogenes* EGDe und *L. innocua* CLIP11262 durchgeführt und wie schon für die intra- und intergenischen PCRs wurden Primer aus den Bereichen größter Homologie ausgewählt. Somit waren Oligonukleotide aus *L. monocytogenes* / *L. ivanovii*- (*ysnB*, *ydeI*) und *L. monocytogenes* / *L. innocua*-Alignments (ORF3) vorhanden, die miteinander kombiniert wurden (Abb. 5.36).

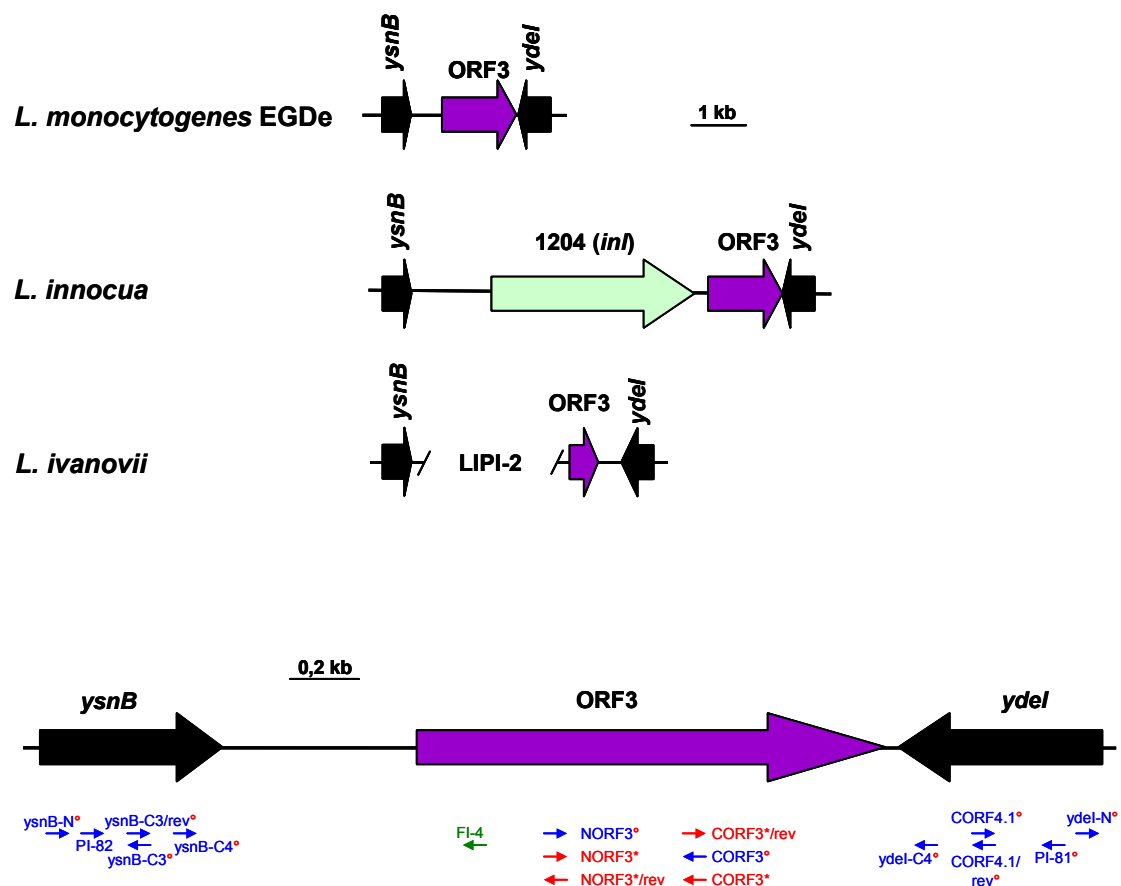


Abb. 5.36: *ysnB-ydeI*-Region in *Listeria* sp. und PCRs in *L. seeligeri* und *L. welshimeri*

In Form von großen Pfeilen ist der genauer untersuchte Bereich *ysnB-ydeI* dargestellt. Im oberen Bereich der Abbildung sind die bei *L. monocytogenes* EGDe, *L. innocua* und *L. ivanovii* bekannten Gene in dieser Region dargestellt. In der unteren Abbildung sind die eingesetzten Oligonukleotide als kleine Pfeile angegeben. Blaue Primer wurden aus der *L. ivanovii*-Sequenz, rote aus der *L. monocytogenes* EGDe-Sequenz und grüne Oligonukleotide aus der *L. innocua* CLIP11262-Sequenz ausgewählt.

° *L. ivanovii*-Primer bindet auch in *L. monocytogenes*

Betrachtet man die durchgeführten PCRs, so sind für alle Primerkombinationen sowohl bei *L. ivanovii* (nicht abgebildet) als auch bei *L. monocytogenes* (Abb. 5.37, Spur 17-24) PCR-Produkte der erwarteten Größe vorhanden. Somit lassen sich die Gene *ysnB*, ORF3 und *ydeI* einzeln mit den intragenischen Primern, aber auch die dazwischen liegenden intergenischen Bereiche *ysnB*-ORF3, ORF3-*ydeI* und *ysnB*-*ydeI* nachweisen (vgl. Kap. 5.4.2). Bei *L. monocytogenes* sind zudem mehrere zusätzliche unspezifische Nebenbanden zu erkennen, die darauf zurückzuführen sind, dass die PCRs mit niedriger Stringenz durchgeführt wurden, um bei *L. seeligeri* und *L. welshimeri* überhaupt PCR-Produkte zu erhalten.

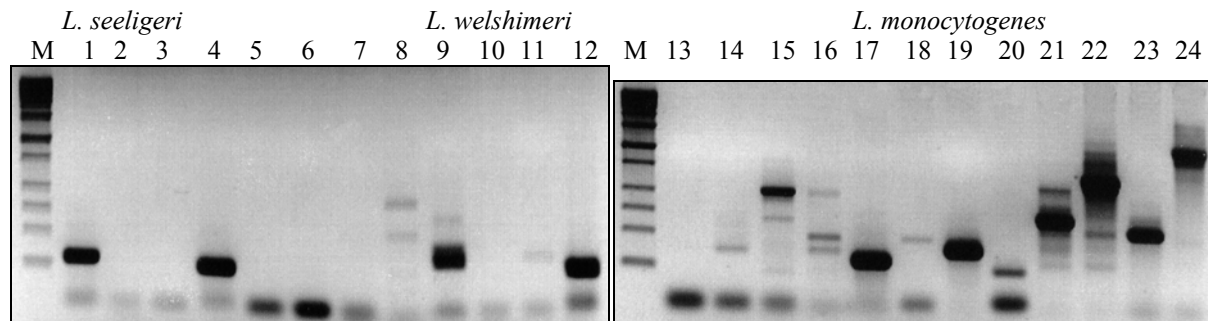


Abb. 5.37: *ysnB*-*ydeI*-PCRs in *L. seeligeri*, *L. welshimeri* und *L. monocytogenes*

PCR mit chromosomaler DNA von *L. seeligeri* (Spur 1-8), *L. welshimeri* (Spur 9-16) und

L. monocytogenes (Spur 17-24)

M:Marker (Stratagene)

Spur 1, 9, 17: *ysnB*

Spur 2, 3, 10, 11, 18, 19: ORF3

Spur 4, 12, 20: *ydeI*

Spur 5, 6, 13, 14, 21, 22: *ysnB*-ORF3

Spur 7, 15, 23: ORF3-*ydeI*

Spur 8, 16, 24: *ysnB*-*ydeI*

Bei *L. seeligeri* konnten mit den neu ausgewählten Primern wiederum die Gene *ysnB* und *ydeI* nachgewiesen werden, ORF3 jedoch nicht. Auch die intergenischen Bereiche konnten mit zahlreichen neuen Primerkombinationen nicht amplifiziert werden. Somit scheint entweder die Sequenz eines möglichen ORF3 stark von dem aus *L. ivanovii* und *L. monocytogenes* bekannten ORF3 abzuweichen, oder es liegt eine völlig andere Organisation unbekannter Gene bzw. ORFs in diesem Bereich vor.

Auch in *L. welshimeri* findet man die Gene *ysnB* und *ydeI*. Zudem erhält man ein schwaches PCR-Produkt mit einer Primerkombination für ORF3. Bei den intergenischen PCRs lassen sich die Bereiche *ysnB*-ORF3 und *ysnB*-*ydeI* aber nicht nachweisen. Nur für ORF3-*ydeI* erhält man eine starke Bande auf dem Agarosegel (Abb. 5.37, Spur 15), die jedoch größer als die entsprechende Bande bei *L. monocytogenes* (Abb. 5.37, Spur 23) ist.

Da die Bande von ORF3-*ydeI* in *L. welshimeri* relativ stark und eindeutig auf dem Agarosegel zu erkennen war, könnte es sich um ein spezifisches PCR-Produkt handeln, das anhand seiner abweichenden Größe auf eine veränderte Genorganisation in dem Bereich ORF3-*ydeI* bei *L. welshimeri* hindeutet. Deshalb wurde dieses PCR-Produkt gereinigt und ansequenziert. Die erhaltene Nukleinsäuresequenz war jedoch schlecht lesbar und wies etliche fragliche Nukleotide auf. Somit war ORF3-*ydeI* von *L. welshimeri* vermutlich ein unspezifisches PCR-Produkt, das aufgrund der niedrigen Stringenz in den durchgeführten PCR-Reaktionen entstanden sein könnte.

In Tab. 5.12 sind die PCR-Ergebnisse nochmals zusammengefasst. Trotz Einsatz zahlreicher neuer Primerkombinationen konnte der Bereich *ysnB-ydeI* bei *L. seeligeri* und *L. welshimeri* nicht geklärt werden.

Gene	<i>L. ivanovii</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. seeligeri</i>	<i>L. welshimeri</i>
<i>ysnB</i>	+	+	+	+
ORF3	+	+	-	(+)
<i>ydeI</i>	+	+	+	+
<i>ysnB</i> -ORF3	(-)	+	-	-
ORF3- <i>ydeI</i>	+	+	-	+
<i>ysnB</i> - <i>ydeI</i>	(-)	+	-	-

Tab. 5.12: Übersicht über die *ysnB-ydeI*-PCRs

+ PCR-Produkt vorhanden; - kein PCR-Produkt detektierbar

(+) PCR-Produkt der richtigen Größe nur schwach nachweisbar

(-) kein Produkt vorhanden, da zu groß für eingesetzte PCR-Bedingungen

Da die Gene *ysnB* und *ydeI* in *L. seeligeri* und *L. welshimeri* zwar nachgewiesen werden konnten, man aber bei den intergenischen PCRs keine positiven Ergebnisse erhielt, sollte überprüft werden, ob diese beiden Gene eventuell in einer anderen Orientierung vorliegen. Dies wäre eine weitere mögliche Erklärung, warum bei den intergenischen PCRs mit den bisherigen Primerkombinationen kein Produkt amplifiziert werden konnte.

Zum Test der Orientierung wurden mit den in Abb. 5.36 aufgeführten Oligonukleotiden neue intergenische PCRs durchgeführt (Tab. 5.13). Es wurden auch Primer miteinander kombiniert, die beide in die gleiche Richtung ($\leftarrow \leftarrow$, $\rightarrow \rightarrow$) oder entgegengesetzt ($\leftarrow \rightarrow$) in *L. ivanovii* und *L. monocytogenes* binden und somit in diesen beiden *Listeria*-Arten kein PCR-Produkt ergeben.

Man erhält für die neuen Primerkombinationen in keiner der untersuchten *Listeria*-Arten PCR-Produkte (Tab. 5.13). Nur mit den bereits vorher eingesetzten Oligonukleotiden *ysnB*-N und CORF3 lässt sich der Bereich *ysnB*-ORF3 in *L. monocytogenes* und eventuell auch in *L. seeligeri* nachweisen. Ebenso lässt sich nur mit den Primern NORF3 und *ydeI*-N die Region ORF3-*ydeI* in *L. ivanovii*, *L. monocytogenes* und *L. welshimeri* detektieren.

Gene	Primerkombination	Lage der Primer	<i>L. iv.</i>	<i>L. mono.</i>	<i>L. seel.</i>	<i>L. welsh.</i>
<i>ysnB</i> -ORF3	<i>ysnB</i> -N x CORF3	$\rightarrow \leftarrow$	(-)	+	(+)	-
	<i>ysnB</i> -C3 x CORF3	$\leftarrow \leftarrow$	-	-	-	-
	<i>ysnB</i> -N x NORF3	$\rightarrow \rightarrow$	-	-	-	-
	<i>ysnB</i> -C3 x NORF3	$\leftarrow \rightarrow$	-	-	-	-
ORF3- <i>ydeI</i>	NORF3 x <i>ydeI</i> -N	$\rightarrow \leftarrow$	+	(+)	-	(+)
	CORF3 x <i>ydeI</i> -N	$\leftarrow \leftarrow$	-	-	-	-
	NORF3 x CORF4.1	$\rightarrow \rightarrow$	-	-	-	-
	CORF3 x CORF4.1	$\leftarrow \rightarrow$	-	-	-	-

Tab. 5.13: Verwendete Primerkombinationen zum Test der Orientierung von *ysnB-ydeI*

Die eingesetzten Oligonukleotide sind in Abb. 5.36 aufgeführt.

+ PCR-Produkt vorhanden; - kein PCR-Produkt detektierbar

(+) PCR-Produkt der richtigen Größe nur schwach nachweisbar

(-) kein Produkt vorhanden, da zu groß für eingesetzte PCR-Bedingungen

$\rightarrow \leftarrow$ Lage der Oligonukleotide in *L. ivanovii* und *L. monocytogenes*

Nachdem mit PCR-Kartierung nicht geklärt werden konnte, wie die Region *ysnB-ydeI* in *L. seeligeri* und *L. welshimeri* aufgebaut ist, sollte in einem zweiten Ansatz versucht werden, die an *ysnB* und *ydeI* angrenzenden Bereiche zu sequenzieren. Hierzu wurde die schon für die Sequenzierung der rechts von *smcL* liegenden Open Reading Frames (Kap. 5.1.1) eingesetzte Methode des Genome Walkings angewendet (Kap. 4.1.19).

Da die Gene *ysnB* und *ydeI* mit intragenischen Primerkombinationen in *L. seeligeri* und *L. welshimeri* nachgewiesen werden konnten, wurden diese Oligonukleotide für das Genome Walking eingesetzt.

Zunächst wurde chromosomale DNA von *L. seeligeri* bzw. *L. welshimeri* mit verschiedenen Restriktionsenzymen (*EcoRV*, *HpaI*, *PvuII*, *NruI*, *StuI*) blunt end verdaut und anschließend an den GenomeWalker Adaptor ligiert. So erhielt man verschiedene GenomeWalker "Libraries", aus denen dann der gesuchte DNA-Bereich mittels PCR amplifiziert wurde. Als Gen-spezifische Primer wurden die Oligonukleotide *ysnB*-C3/rev (*ysnB*) und CORF4.1/rev (*ydeI*) verwendet (Abb. 5.36, Tab. 5.14).

Im Gegensatz zu vorher durchgeführten Genome Walking-PCRs (Kap. 5.1.1) konnten trotz Einsatz spezieller Polymerasen nur Produkte mit einer maximalen Größe von 1,5 kb amplifiziert werden. Diese wurden dann ohne vorherige Klonierung mit dem Gen-spezifischen und Adaptor Primer sequenziert. Aus der Sequenz wurde ein neuer Gen-spezifischer Primer für eine weitere Genome Walking-PCR ausgewählt.

So konnten durch verschiedene PCRs mehrere kleine Fragmente (Tab. 5.14, Abb. 5.38) identifiziert und sequenziert werden.

Primerkombinationen <i>ysnB</i>	<i>L. seeligeri</i>	<i>L. welshimeri</i>
1. PCR: <i>ysnB</i> -C3/rev x AP2	~ 500 bp (<i>HpaI</i>)	~ 550 bp (<i>PvuII</i>)
2. PCR: L _{ysn2} x AP2	~ 350 bp (<i>StuI</i>)	-
2. PCR: L _{wysn2} x AP2	-	~ 1,0 kb (<i>StuI</i>)
Primerkombinationen <i>ydeI</i>	<i>L. seeligeri</i>	<i>L. welshimeri</i>
1. PCR: CORF4.1/rev x AP2	~ 400 bp (<i>EcoRV</i>) ~ 1,5 kb (<i>StuI</i>)	~ 1,5 kb (<i>EcoRV</i>)
2. PCR: L _{syde2} x AP2	-	-
2. PCR: L _{wyde2} x AP2	-	~ 750 bp (<i>StuI</i>)

Tab. 5.14: Überblick über die durch Genome Walking erhaltenen Fragmente des Bereichs *ysnB-ydeI*

Dargestellt sind nur die PCR-Produkte, die auch sequenziert wurden.

EcoRV, *HpaI*, *PvuII*, *StuI*: "blunt end"-Restriktionsenzyme, mit denen die GenomeWalker "Libraries" hergestellt wurden

Nur mit den Restriktionsenzymen *EcoRV* und *StuI* erhielt man Genome Walking-Fragmente von 1,0 –1,5 kb Größe (Abb. 5.38). Alle anderen PCR-Produkte waren wesentlich kleiner. Zudem konnten in vielen PCR-Ansätzen trotz Erhöhung der Stringenz nur multiple Banden amplifiziert werden, die für eine Sequenzierung ungeeignet waren.

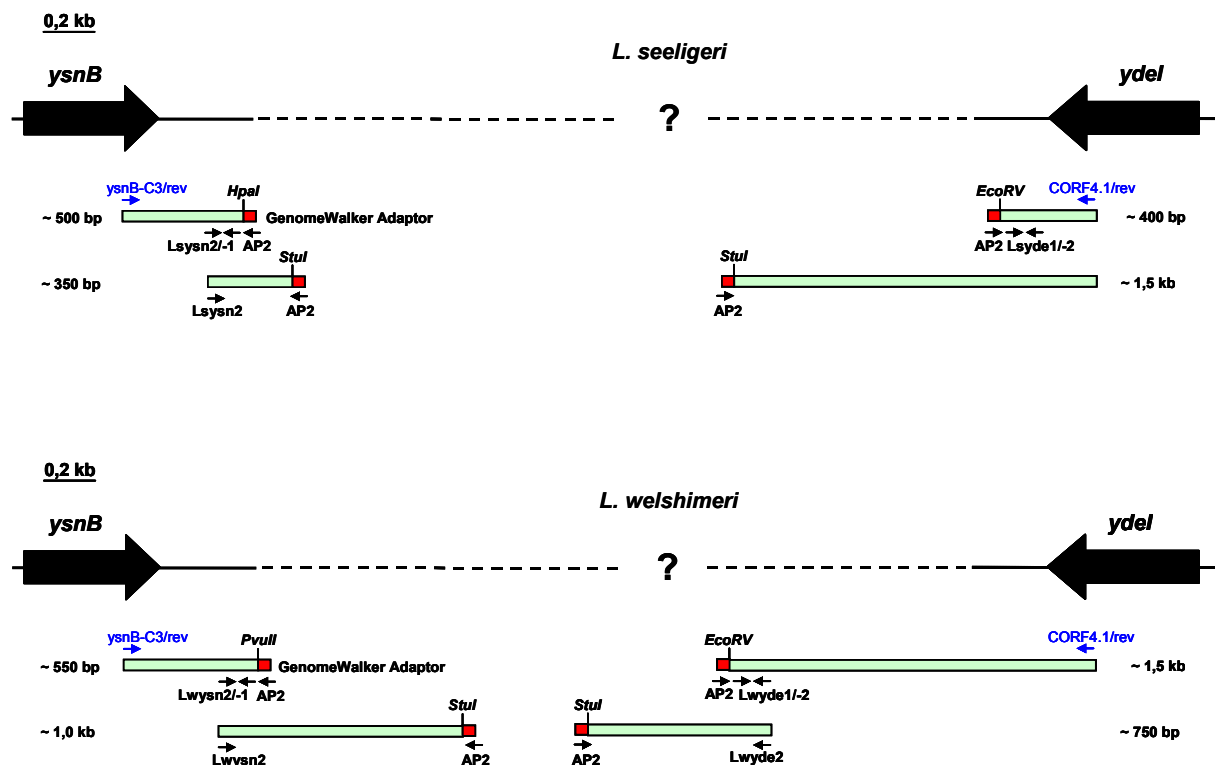


Abb. 5.38: Überblick über die Genome Walking-Fragmente in *L. seeligeri* und *L. welshimeri*

→, ← für das Genome Walking bzw. die Kontroll-PCRs verwendete Oligonukleotide

In hellgrün sind die einzelnen Genome Walking-Fragmente mit ligiertem Adaptor (rot) dargestellt.

Mit den Oligonukleotiden, mit denen die zweite Genome Walking-PCR durchgeführt wurde, wurde zusätzlich eine PCR mit der Primerkombination *Lsysn2* x *Lsyde2* bzw. *Lwysn2* x *Lwyde2* durchgeführt, um eventuell ein durchgehendes PCR-Produkt erhalten zu können. Dies war aber nicht erfolgreich, so dass zwischen *ysnB* und *ydel* vermutlich ein größerer Genomabschnitt liegt, der mit weiteren Genome Walking-PCRs abgedeckt werden muss.

Nach Sequenzierung der bisher erhaltenen Fragmente wurden diese wieder mit dem Programm Sequencher bearbeitet und die so erhaltenen Sequenzen mit den in *L. ivanovii* identifizierten Open Reading Frames (einschließlich LIPI-2) verglichen. Bis auf *ydel* konnten allerdings keine signifikanten Homologien festgestellt werden.

Zusätzlich wurden die sequenzierten Bereiche mit den Genomsequenzen von *L. monocytogenes* EGDe und *L. innocua* CLIP11262 sowohl auf Nukleinsäure- als auch Aminosäureebene verglichen.

Zu dem sich an *ysnB* anschließenden Bereich konnten sowohl für *L. seeligeri* als auch *L. welshimeri* neue homologe Proteine gefunden werden (Tab. 5.15, Abb. 5.39).

Genome Walking-Fragment	<i>L. mono.</i> EGDe (% Identität) ¹	<i>L. innocua</i> CLIP11262 (% Identität) ¹	mögliche Funktion ²
<i>L. seeligeri-ysnB</i> (<i>HpaI</i> , <i>StuI</i>)	LMO00435 (63%)	LIN00457 (64%)	Putatives Peptidoglykan-Bindungsprotein mit LPXTG-Motiv
<i>L. seeligeri-ydeI</i> (<i>EcoRV</i> , <i>StuI</i>)	LMO01242 (62%)	LIN01206 (63%)	ähnlich zu <i>B. subtilis</i> YdeI-Protein
<i>L. welshimeri-ysnB</i> (<i>PvuII</i> , <i>StuI</i>)	LMO008523 (82%)	LIN00845 (86%)	ähnlich zu Transkriptionsregulator aus der TetR/ AcrR-Familie
	LMO00853 (65%)	LIN00846 (65%)	ähnlich zu <i>E.coli</i> SugE-Protein (Transmembran-Chaperone)
<i>L. welshimeri-ydeI</i> (<i>EcoRV</i> , <i>StuI</i>)	-	-	-

Tab. 5.15: Überblick über die zu den Genome Walking-Fragmenten aus *L. seeligeri* und *L. welshimeri* homologen Proteine in *L. monocytogenes* EGDe und *L. innocua* CLIP11262

In dieser Tabelle sind die homologen ORFs aus der *L. monocytogenes*- und *L. innocua*-Genomsequenz (*Listeria* Genome Sequencing Project, verfügbar unter <http://genolist.pasteur.fr/ListiList>) dargestellt.

¹ Der Grad der Identität in Prozent wurde mit der Anwendung BLAST ohne Filter, mittels des Algorithmus von Altschul (3), verfügbar unter <http://genolist.pasteur.fr/> ermittelt.

² Die mögliche Funktion basiert auf den Homologiedaten aus den Datenbanken.

Für *L. seeligeri* findet sich für den downstream von *ysnB* liegenden Bereich sowohl in *L. monocytogenes* (LMO00435) als auch in *L. innocua* (LIN00457) ein homologes Protein (63 bzw. 64% Identität), das Ähnlichkeit zu Peptidoglykan-Bindungsproteinen mit LPXTG-Motiv aufweist. Interessanterweise existiert auch in *L. innocua* ein Protein mit LPXTG-Motiv (Internalingen) rechts von *ysnB* (Kap. 5.1.4, Abb. 5.9, Abb. 5.39), so dass gewisse Ähnlichkeiten zwischen *L. innocua* und *L. seeligeri* bestehen könnten.

Für *L. welshimeri* hingegen trifft man an dieser Stelle in *L. monocytogenes* und *L. innocua* ein Protein mit Ähnlichkeit zu Transkriptionsregulatoren aus der TetR/AcrR-Familie, an das sich ein Homolog zu dem *E. coli* SugE-Protein, einem Transmembran-Chaperone anschließt.

Für den Bereich downstream von *ydeI* konnten bisher noch keine neuen homologen Proteine identifiziert werden, da die beiden Genome Walking Fragmente noch nicht komplett sequenziert sind. Für *L. seeligeri* findet man nur das schon bekannte *ydeI*-Gen in *L. monocytogenes* und *L. innocua* wieder, für *L. welshimeri* konnten noch keine Homologien ermittelt werden.

In weiteren Genome Walking-PCRs soll nun geklärt werden, welche weiteren Gene sich im Bereich *ysnB-ydeI* befinden. Die Arbeiten hierzu sind noch nicht abgeschlossen.

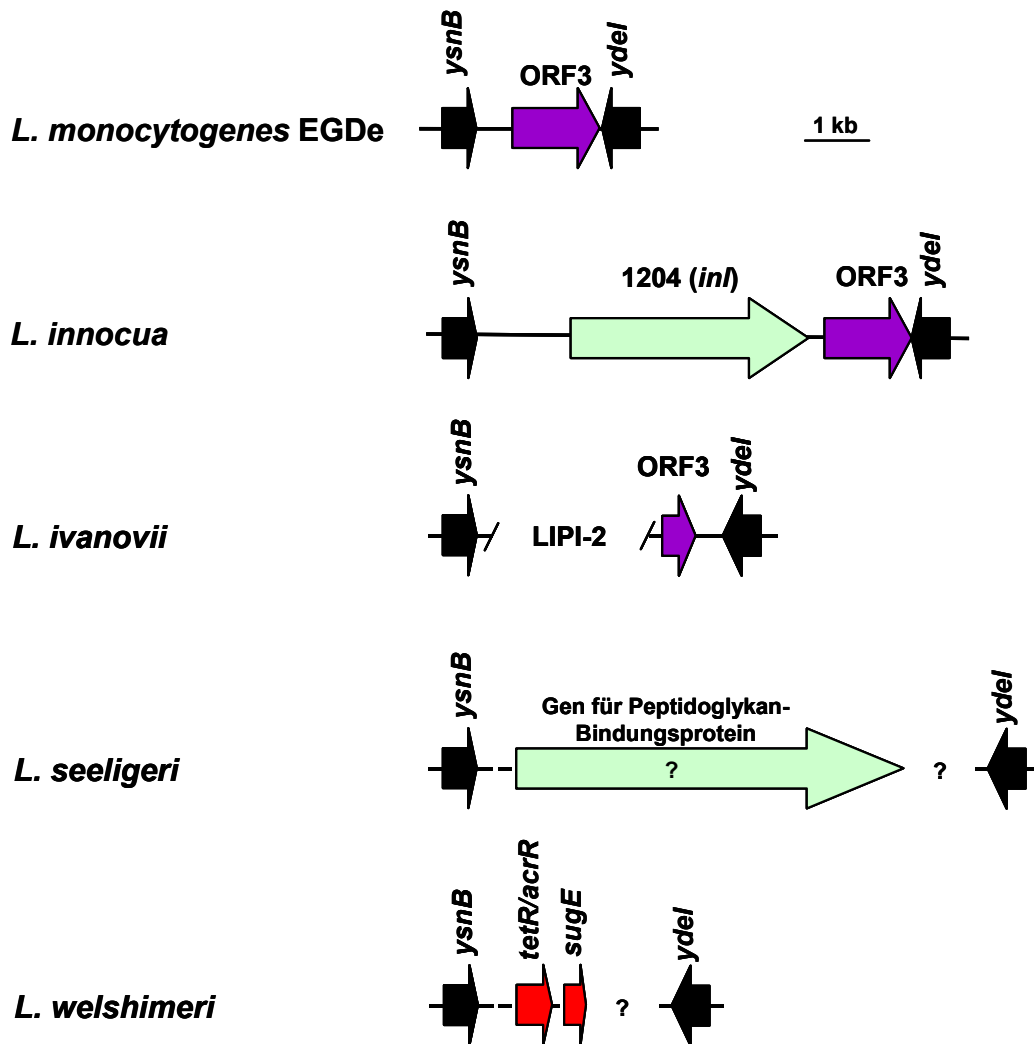


Abb. 5.39: Möglicher Aufbau der Region *ysnB-ydeI* in *L. seeligeri* und *L. welshimeri*

In Form von Pfeilen ist der genauer untersuchte Bereich *ysnB-ydeI* dargestellt. Zum Vergleich ist der schon bekannte Aufbau dieser Region von *L. monocytogenes*, *L. innocua* und *L. ivanovii* gezeigt.

ysnB: ein zum *B. subtilis*-Gen *ysnB* homologes Gen

ydeI: ein zum *ydeI*-Gen aus *B. subtilis* ähnliches Gen

ORF3: Open Reading Frame 3, Funktion unbekannt

1204 (*inl*): ORF von *L. innocua*, besitzt Ähnlichkeit zu den großen Internalinen mit LPXTG-Motiv

tetR/acrR: Gen, das für ein Protein mit Homologie zu den Transkriptionsregulatoren aus der TetR/AcrR-Familie codiert

sugE: Gen, das für ein Protein mit Ähnlichkeit zum SugE-Protein von *E. coli* codiert (Transmembran-Chaperone)

5.5 Vergleich der Expression verschiedener Gene von *L. ivanovii* mittels RT-PCR

Ein weiteres Hauptziel der vorliegenden Arbeit war es, die Expression der LIPI-2-Gene, der flankierenden Open Reading Frames, sowie der Virulenzclustergene von *L. ivanovii* unter verschiedenen Kulturbedingungen *in vitro* und nach Infektion mehrerer Zelllinien, d.h. *in vivo*, zu untersuchen. Es wurde die Genexpression nach Wachstum bei 20°C bzw. 37°C überprüft (Kap. 5.5.3), sowie die Transkriptionsrate mit und ohne "MEM-Shift" analysiert (Kap. 5.5.4). Zusätzlich wurden drei permanente Zelllinien (MDBK, TIB-73 und J774) infiziert und auch hier anschließend die Genexpression bestimmt.

Als Methode zur Bestimmung der Transkriptionsstärke sollte dabei die sog. Reverse-Transkription/Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR; Kap. 4.1.26) dienen, mit der die Expression listerieller Gene auf Transkriptionsebene untersucht werden kann. Anhand der beobachteten mRNA-Mengen können Aussagen über die Transkriptionsstärke der untersuchten Gene gemacht werden. Hierbei macht man sich die Fähigkeit der Virus-codierten reversen Transkriptase zunutze, die nicht nur virale RNA-Moleküle, sondern auch eukaryotische und prokaryotische mRNA in komplementäre DNA (cDNA) umschreiben kann. Durch Verwendung geeigneter Primer bei der reversen Transkription wird die aus den Listerien isolierte mRNA in dsDNA umgeschrieben, die in einer anschließenden PCR-Reaktion als Template eingesetzt werden kann. Wählt man für die PCR eine geeignete Verdünnung der cDNA aus, d.h. eine cDNA-Menge, bei der die PCR-Reaktion nicht gesättigt ist, so kann man anhand der Stärke der DNA-Bande im Agarosegel Aussagen über die Menge an mRNA-Transkript machen. So lässt die RT-PCR-Methode eine semiquantitative Analyse der mRNA-Konzentration zu.

Um Aussagen über die PrfA-Abhängigkeit der untersuchten Gene machen zu können, wurden in allen Versuchsansätzen *L. ivanovii* ATCC19119 (Typstamm) und die PrfA-Mutante PDC22 ($\Delta prfA$), bei der das *prfA*-Gen deletiert ist (157), parallel untersucht.

Da in LIPI-2 mehrere potentielle Terminatoren (Kap. 5.2.1) identifiziert wurden, sollte mit der Methode der RT-PCR zusätzlich überprüft werden, ob die auf LIPI-2 liegenden Gene monocistronisch transkribiert werden oder ein polycistronisches Transkript mehrerer Gene nachweisbar ist.

5.5.1 Vorversuche

Vor Beginn der RT-PCRs musste eine geeignete Methode gefunden werden, um die RNA der zu untersuchenden Bakterien reproduzierbar isolieren zu können. Zunächst wurde die schon in der vorangegangenen Diplomarbeit (2) erprobte Isolationsmethode mit heißem Phenol (200, Kap. 4.1.22) getestet. Es stellte sich heraus, dass diese Methode für die Zwecke dieser Arbeit zu zeitaufwendig war. Deshalb wurde eine neue Isolierungsmethode mit einem RNA-Isolierungskit getestet (Kap. 4.1.22), die nach dem Protokoll von Dietrich et al. (53) abgewandelt wurde. Bei dieser Methode wurden die schwer lysierbaren Listerien zunächst mit Hilfe von Glaskügelchen und dem RNA-FastPrep aufgeschlossen und anschließend eine RNA-Isolierung mit einem Kit durchgeführt. Die zweite Methode erwies sich als geeignet für die nachfolgenden RNA-Isolierungen und RT-PCRs.

Um Aussagen über die PrfA-Abhängigkeit der zu untersuchenden Gene machen zu können, wurden in allen Versuchsansätzen *L. ivanovii* ATCC19119 (Typstamm) und die PrfA-Mutante (*L. ivanovii* PDC22), bei der das *prfA*-Gen deletiert ist (157), parallel untersucht. Deshalb musste ein geeigneter interner Standard gefunden werden, der in beiden *L. ivanovii*-Stämmen gleich stark und PrfA-unabhängig exprimiert wird, um später vergleichende Aussagen über die Transkriptionsrate machen zu können.

Hierfür wurde das *sod*-Gen als Standardgen für alle nachfolgenden RT-PCRs ausgewählt, da schon im Laufe der vorangegangenen Diplomarbeit (2) mittels RT-PCR gezeigt werden konnte, dass dieses Gen unter verschiedenen Bedingungen – sowohl *in vitro* als auch *in vivo* – eine ausreichend starke und konstante, d.h. PrfA-unabhängige Expression liefert.

Da die Internalingene, vor allem aber viele der neu identifizierten Open Reading Frames unter den untersuchten Kulturbedingungen jedoch nur sehr schwach exprimiert wurden, mussten PCR-Bedingungen gefunden werden, unter denen diese schwache Expression nachweisbar, die RT-PCR des Standardgens *sod* aber noch nicht gesättigt war.

Aus diesem Grunde wurden mehrere PCRs mit cDNA unterschiedlicher Verdünnung durchgeführt. In der Praxis zeigte sich aber, dass bei einer niedrigen cDNA-Verdünnung, bei der die schwach exprimierten Gene noch mittels RT-PCR detektierbar waren, die Produkte für das Standardgen *sod* schon zu stark waren und somit geringe Bandenunterschiede auf dem Agarosegel nicht mehr erkennbar waren.

Deshalb wurde in einem weiteren Ansatz getestet, ob es möglich war, durch eine Verdünnung der *sod*-Oligonukleotide (d.h. eine geringere Menge an *sod*-Primern im PCR-Ansatz) eine noch nicht gesättigte PCR mit dem stark transkribierten *sod*-Gen zu erhalten.

Wie man in Abb. 5.40 sieht, kann man durch Reduktion der eingesetzten Primermenge in einen Bereich gelangen, in dem die RT-PCR noch nicht gesättigt ist und somit geringe Bandenunterschiede noch sichtbar sind. Deshalb wurde in allen weiteren RT-PCRs für das *sod*-Gen eine geringere Menge an Oligonukleotiden als für die restlichen untersuchten Gene eingesetzt.

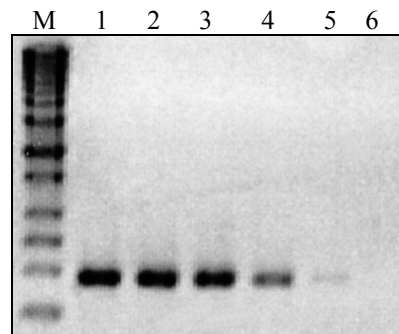


Abb. 5.40: *sod*-PCR mit unterschiedlichen Primerkonzentrationen

M:	Marker (Stratagene)	
Spur 1:	<i>sod</i> -Primer unverdünnt	(0,250 µg)
Spur 2:	<i>sod</i> -Primer 1:2 verdünnt	(0,125 µg)
Spur 3:	<i>sod</i> -Primer 1:4 verdünnt	(0,064 µg)
Spur 4:	<i>sod</i> -Primer 1:8 verdünnt	(0,032 µg)
Spur 5:	<i>sod</i> -Primer 1:16 verdünnt	(0,016 µg)
Spur 6:	<i>sod</i> -Primer 1:32 verdünnt	(0,008 µg)

Schließlich mussten geeignete Oligonukleotide ausgewählt und hinsichtlich Spezifität und Bindungsstärke optimiert werden. Für die hoch homologen Internalingene wurden von G. Domínguez-Bernal Oligonukleotide zur Verfügung gestellt, die zuvor schon auf Spezifität getestet worden waren. Diese wurden sowohl einzeln als auch paarweise unter verschiedenen PCR-Bedingungen getestet, um möglichst spezifische Produkte von gleicher Bandenstärke zu erhalten.

In gleicher Weise wurde mit den Oligonukleotiden verfahren, die für die Open Reading Frames rechts von *smcL* ausgewählt wurden.

Die RT-PCR-Reaktionen wurden nun in folgender Weise durchgeführt:

Es wurde zunächst *in vivo*- bzw. *in vitro*-RNA isoliert und davon eine konstante Menge für die reverse Transkription verwendet. Dann wurde die erhaltene cDNA unverdünnt und in unterschiedlichen Verdünnungen (1:5 bis 1:100) in einer PCR-Reaktion eingesetzt und mit den Primern für das Standardgen *sod* amplifiziert. Anschließend wurde betrachtet, ab welcher Verdünnungsstufe Abschwächungen in der Bandenstärke auftraten. Dies war notwendig, da die PCR-Reaktion bei zu großer cDNA-Menge gesättigt ist und daher keine Rückschlüsse auf die ursprünglich vorhandene mRNA-Menge, d.h. die Transkriptionsstärke, zulässt. Diese Verdünnungsstufe setzte man dann für die weiteren PCR-Reaktionen ein. Zusätzlich wurden Abweichungen der *sod*-Banden voneinander durch das Einsetzen unterschiedlicher cDNA-Mengen ausgeglichen.

Um eine Verfälschung der Ergebnisse durch Reste chromosomaler DNA ausschließen zu können, wurde durch PCR mit *sod*-Primern ohne vorherige reverse Transkription geprüft, ob die eingesetzte RNA auch tatsächlich DNA-frei war.

5.5.2 Nachweis polycistronischer Transkripte der Internalingene

Da G. Domínguez-Bernal in LIPI-2 mehrere potentielle Terminatoren identifizieren konnte (Kap. 5.2.1, [60]), sollte mit der Methode der RT-PCR überprüft werden, ob die auf LIPI-2 liegenden Gene monocistronisch transkribiert werden oder ein polycistronisches Transkript mehrerer Gene nachweisbar ist.

Aus den Randbereichen der Internalingene wurden Oligonukleotide ausgewählt und damit jeweils der zwischen zwei Internalingenen liegende intergenische Bereich amplifiziert. Zudem wurde versucht, ein PCR-Produkt über die gesamte Länge der möglichen polycistronischen Transkripte zu erhalten (Abb. 5.41).

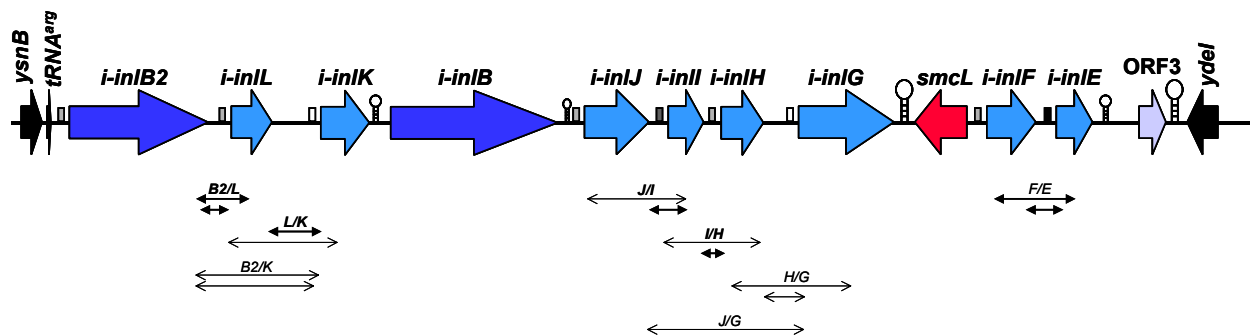


Abb. 5.41: Nachweis polycistronischer Transkripte der Internalingene mittels RT-PCR

Die untersuchten Internalingene sind in Form von blauen Pfeilen dargestellt. Darunter sind die durchgeführten PCRs in Form von Doppelpfeilen angegeben. Fett gedruckte Doppelpfeile stellen positive PCRs dar, d.h. es ist ein bi- bzw. polycistronisches Transkript nachweisbar.

Es wurden für jede intergenische Region diverse Primerkombinationen getestet. Schließlich konnten mehrere bicistronische Transkripte nachgewiesen werden (Abb. 5.42).

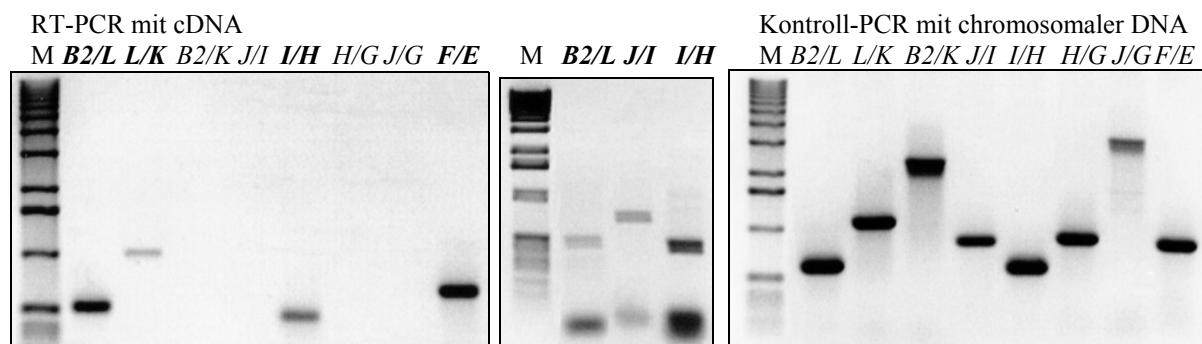


Abb. 5.42: Nachweis polycistronischer Transkripte der LIPI-2-Internalingene in *L. ivanovii*

M: Marker (Gibco BRL)

B2/L, L/K, B2/K: Nachweis auf das polycistronische Transkript *i-inlB2/K*

J/I, I/H, H/G, J/G: Nachweis auf das polycistronische Transkript *i-inlJ/G*

F/E: Nachweis auf das bicistronische Transkript *i-inlF/E*

Die zugehörigen Primerkombinationen sind in Abb. 5.41 aufgeführt.

Für das mögliche polycistronische Transkript *i-inlB2/K* konnte sowohl im Bereich *i-inlB2/L* als auch *i-inlL/K* mRNA nachgewiesen werden. Somit könnte für die Internalingene *i-inlB2/L* und *i-inlL/K* ein bicistronisches Transkript vorliegen oder die gesamte Region polycistronisch transkribiert werden. Für den gesamten Bereich *i-inlB2/K* konnte allerdings keine mRNA nachgewiesen werden, so dass die Frage offen bleibt, ob ein polycistronisches Transkript existiert.

Ein weiteres potentiell polycistronisches Transkript könnte sich für *i-inlJ/G* finden, denn es konnte eine Transkription der Bereiche *i-inlJ/I* und *i-inlI/H* gezeigt werden. mRNA der Region *i-inlH/G* und des gesamten Bereichs *i-inlJ/G* ist jedoch nicht nachweisbar. Somit existieren bicistronische Transkripte für die Bereiche *i-inlJ/I* und *i-inlI/H* - eventuell auch ein polycistronisches Transkript *i-inlJ/H* - dagegen ist noch nicht geklärt, ob eine polycistronische Transkription über die gesamte Region *i-inlJ/G* möglich ist.

Als letzter Bereich wurde *i-inlF/E* untersucht. Auch hier wurde eine bicistronisch mRNA detektiert.

Somit konnte mit der Methode der RT-PCR gezeigt werden, dass die Internalingene von LIPI-2 nicht nur monocistronisch transkribiert werden, sondern zumindest für einige Bereiche bicistronische Transkripte (*i-inlB2/L*, *i-inlL/K*, *i-inlJ/I*, *i-inlI/H*, *i-inlF/E*) vorliegen. Es ist jedoch durchaus möglich, dass für die untersuchten Regionen auch polycistronische mRNA existiert, die aufgrund ihrer Länge von über 1,5 kb durch Reverse Transkription eventuell nicht mehr nachgewiesen werden konnte.

5.5.3 RT-PCR: Vergleich der Transkription verschiedener Gene von *L. ivanovii* nach Wachstum bei 20°C und 37°C

Es konnte beim Kooperationspartner in Madrid gezeigt werden, dass bei einem Wachstum von *L. ivanovii* bei 37°C im Vergleich zu 20°C die Expression bestimmter Gene induziert wird, d.h. eine stärkere Transkription dieser Gene zu beobachten ist.

Deshalb sollten die Expression der LIPI-2-Gene sowie der sie flankierenden Open Reading Frames vergleichend nach Wachstum bei 20°C und 37°C untersucht werden. Es wurden parallel *L. ivanovii* ATCC19119 (WT) und die $\Delta prfA$ -Mutante *L. ivanovii* PDC22 (157) überprüft, um Aussagen über die PrfA-Abhängigkeit der untersuchten Gene machen zu können.

Zusätzlich wurde die Expression der Virulenzclustergene unter den gleichen Bedingungen analysiert.

Zunächst wurde das Wachstum der eingesetzten Bakterien bei 20°C und 37°C überprüft, um für die RNA-Isolierung eine gleiche Anzahl an Bakterien einsetzen zu können. Hierzu wurden Wachstumskurven bei 20°C und 37°C erstellt (Abb. 5.43, Abb. 5.44) und die Zahl der lebenden Bakterien zu verschiedenen Zeitpunkten bestimmt.

Bei *L. ivanovii* ATCC19119 und *L. ivanovii* PDC22 kann man gleiches Wachstum erkennen und beide erreichen zu einem ähnlichen Zeitpunkt die stationäre Phase. Bei 37°C geschieht dies nach ca. 300 Minuten, bei 20°C erst nach ca. 750 Minuten.

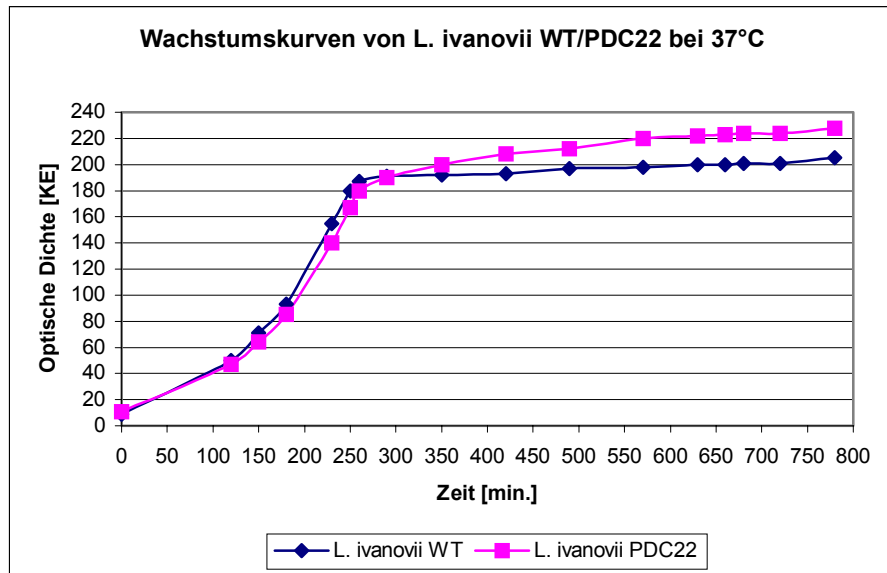


Abb. 5.43: Wachstumskurven von *L. ivanovii* ATCC19119 (WT) und PDC22 bei 37°C
KE: Maß der optischen Dichte in Kletteneinheiten

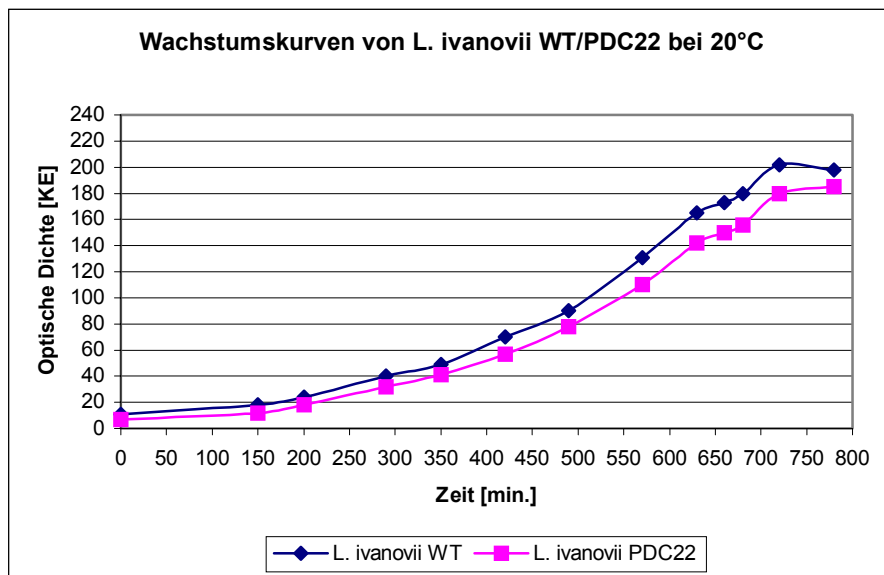


Abb. 5.44: Wachstumskurven von *L. ivanovii* ATCC19119 (WT) und PDC22 bei 20°C
KE: Maß für die optische Dichte in Kletteneinheiten

Für die RNA-Isolierungen wurden Bakterien aus der spät-logarithmischen Wachstumsphase (180 - 190 Klett, entspricht einer optischen Dichte von 1,0 bei 600 nm) eingesetzt. Zu diesem Zeitpunkt wurde zunächst die Zellzahl der Bakterien bestimmt. So wurde sichergestellt, dass unter verschiedenen Bedingungen gleiche Mengen an Bakterien für die RNA-Isolierung eingesetzt wurden.

Expression der LIPI-2-Internalingene bei 20°C und 37°C

Es wurden alle LIPI-2-Internalingene, d.h. die Gene der acht kleinen und zwei großen Internaline, mittels RT-PCR untersucht (Abb. 5.45). Zusätzlich wurde die Expression der beiden an anderer Stelle im *L. ivanovii*-Genom liegenden Gene für die kleinen Internaline *i-inlC* und *i-inlD* analysiert (Abb. 5.46).

Um reproduzierbare Aussagen über die Transkription der untersuchten Gene machen zu können, wurde die RNA in fünf voneinander unabhängigen Ansätzen isoliert und in cDNA umgeschrieben.

Für die Untersuchung der Internalingene zeigte sich eine cDNA-Verdünnung von 1:10 am geeignetsten, da bei dieser cDNA-Menge schwach exprimierte Gene (vor allem in der $\Delta prfA$ -Mutante) noch nachweisbar waren. Die Oligonukleotide für das Standardgen *sod* wurden 1:5 verdünnt, d.h. in einer Menge von 0,05 μ g eingesetzt (vgl. Abb. 5.40).

Betrachtet man das Gen für das große Internalin *i-inlB2*, so kann man einen deutlichen Expressionsunterschied bei Vergleich der beiden untersuchten Temperaturen feststellen. Sowohl in der $\Delta prfA$ -Mutante (*L. ivanovii* PDC22) als auch im Wildtyp wird *i-inlB2* bei 37°C deutlich stärker transkribiert als bei 20°C. Einen deutlichen Expressionsunterschied zwischen der Deletionsmutante und dem Wildtyp kann man jedoch nicht feststellen. In beiden *L. ivanovii*-Stämmen wird *i-inlB2* bei 20°C bzw. 37°C nahezu gleich stark transkribiert.

Für die Gene der kleinen Internaline *i-inlL* und *i-inlK* erhält man ein ähnliches Expressionsmuster wie für *i-inlB2*. Man sieht für *L. ivanovii* WT und $\Delta prfA$ einen klaren Transkriptionsunterschied bei den beiden Wachstumstemperaturen. Bei beiden ist deutlich mehr mRNA nach Wachstum bei 37°C als bei 20°C zu detektieren. Und auch hier findet man keinen signifikanten Expressionsunterschied zwischen der Deletionsmutante und dem Wildtyp.

Interessant ist, dass die drei Gene *i-inlB2*, *i-inlL* und *i-inlK* möglicherweise polycistronisch transkribiert werden (Kap. 5.5.2). Dass sie ein identisches Transkriptionsmuster aufweisen, könnte ein weiterer Hinweis darauf sein, dass eine mRNA über den gesamten Bereich *i-inlB2*-*i-inlK* existiert.

Für das zweite große Internalingen *i-inlB* – das einzige Internalingen ohne PrfA-Box – sieht man ein abweichendes Expressionsmuster. So findet in der $\Delta prfA$ -Mutante nur eine schwache Transkription des *i-inlB*-Gens statt und es lässt sich nur ein geringer Expressionsunterschied zwischen 20°C und 37°C erkennen. Beim Wildtyp dagegen erhält man deutlich unterschiedliche mRNA-Mengen. So wird *i-inlB* bei 20°C genauso schwach wie in der Deletionsmutante transkribiert, bei 37°C aber erfolgt eine wesentlich stärkere Expression dieses Gens.

Die Gene der kleinen Internaline *i-inlJ*, *i-inlI*, *i-inlH* und *i-inlG* werden möglicherweise auch polycistronisch transkribiert (Kap. 5.5.2). Auch hier findet man ein ähnliches Expressionsmuster. Alle vier Gene werden in der *prfA*-Mutante schwächer exprimiert als im Wildtyp und man kann in der Mutante keinen Unterschied in den mRNA-Mengen bei den beiden Wachstumstemperaturen 20°C und 37°C erkennen. Im Gegensatz dazu werden die vier Internalingene im Wildtyp stärker exprimiert und es ist ein signifikanter

Transkriptionsunterschied zwischen 20°C und 37°C zu erkennen. Nach Wachstum bei 37°C werden *i-inlJ*, *i-inlI*, *i-inlH* und *i-inlG* stärker exprimiert als bei 20°C.

Auffällig ist zudem *i-inlH*, das insgesamt eine viel schwächere Transkription als die anderen Internalingene zeigt. Selbst im Wildtyp ist bei 20°C kaum mRNA detektierbar und nur bei 37°C erfolgt eine leicht erhöhte Expression.

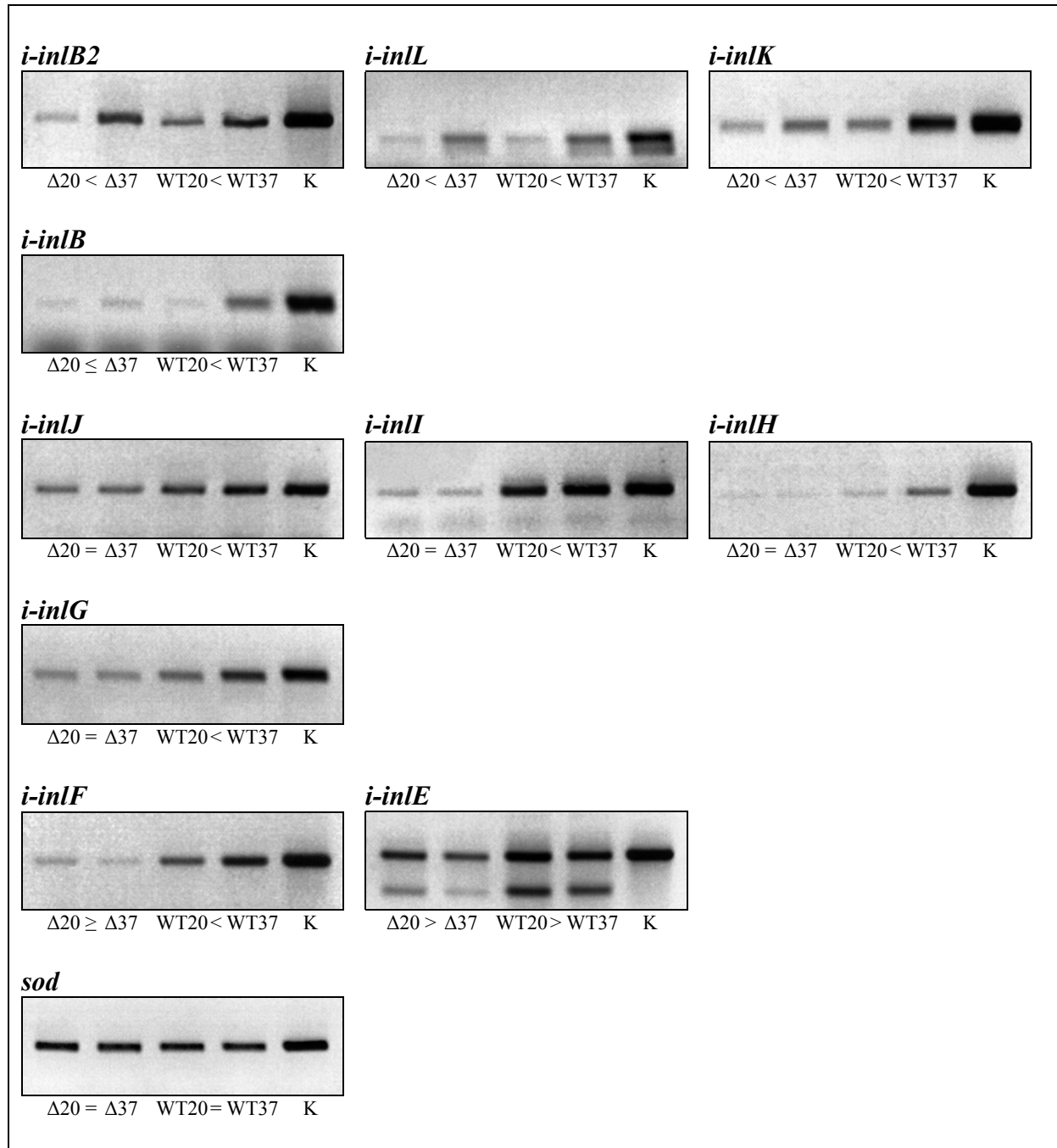


Abb. 5.45: Expression der LIPI-2-Internaline bei 20°C und 37°C

Δ : *L. ivanovii* PDC22, *prfA*-Deletionsmutante; WT: *L. ivanovii* ATCC19119

K: Kontrolle mit chromosomaler DNA von *L. ivanovii* ATCC19119

20, 37: Wachstumstemperatur der Listerien bei 20°C bzw. 37°C

<, > deutlicher Expressionsunterschied; \leq , \geq geringe Abweichung in der Stärke der Transkription = gleich starke Expression

<, \leq Transkription bei 20°C schwächer als bei 37°C; >, \geq Expression bei 20°C stärker als bei 37°C

Allerdings ist zu erwähnen, dass die für *i-inlH* eingesetzten Oligonukleotide zum Teil auch mit der Kontrolle mit chromosomaler DNA nur schwache Banden in der RT-PCR ergaben und diese Auffälligkeit bei *i-inlH* somit auch auf schlechtere Bindung der Oligonukleotide zurückzuführen sein könnte.

Das Expressionsmuster der restlichen LIPI-2-Internalingene *i-inlF* und *i-inlE* weicht allerdings von den bisher beschriebenen ab. So findet man bei beiden in der $\Delta prfA$ -Mutante eine erhöhte Transkription bei 20°C im Vergleich zu 37°C. *L. ivanovii* WT verhält sich jedoch bei *i-inlF* wie die restlichen Internalingene. Die Expression ist deutlich stärker als bei der Deletionsmutante und man erhält mehr mRNA bei 37°C als bei 20°C.

i-inlE wird sowohl in der Deletionsmutante als auch im Wildtyp stark transkribiert, zeigt im Wildtyp aber interessanterweise bei 20°C Wachstum eine stärkere Expression als bei 37°C. Zudem findet sich nicht nur eine Bande auf dem Agarosegel, sondern es taucht wiederholt eine zweite, kleinere Bande auf, die in der Kontrolle mit chromosomaler DNA fehlt (Abb. 5.45). Diese kleinere Bande weist das gleiche Expressionsmuster auf wie *i-inlE*, so dass es sich vermutlich in beiden Fällen um die gleiche mRNA handelt.

In der sich an die RNA-Isolierung anschließenden cDNA-Synthese könnten aufgrund unvollständig zerstörter Sekundärstruktur der *i-inlE*-mRNA zwei cDNAs entstanden sein, die anschließend in der RT-PCR mit der gleichen eingesetzten Primerkombination nachgewiesen wurden. Dies wäre eine mögliche Erklärung für das Auftreten von zwei PCR-Produkten für das kleine Internalingen *i-inlE*.

Das Standardgen *sod* zeigt wie zu erwarten eine gleich starke Expression in der Deletionsmutante und im Wildtyp. Außerdem wird es Temperatur-unabhängig transkribiert, da keine unterschiedlichen mRNA-Mengen bei 20°C und 37°C erkennbar sind.

Betrachtet man die Expression der Internalingene, so findet man für die meisten Gene ein ähnliches Expressionsmuster (Abb. 5.45, Tab. 5.16).

Gen	<i>L. ivanovii</i> $\Delta prfA$ 20°C – 37°C	<i>L. ivanovii</i> WT 20°C – 37°C	Expression $\Delta prfA$ - WT
<i>i-inlB2</i>	<	<	≤
<i>i-inlL</i>	<	<	≤
<i>i-inlK</i>	<	<	≤
<i>i-inlB</i>	≤	<	<
<i>i-inlJ</i>	=	<	<
<i>i-inlI</i>	=	<	<
<i>i-inlH</i>	=	<	<
<i>i-inlG</i>	=	<	<
<i>i-inlF</i>	≥	<	<
<i>i-inlE</i>	>	>	<
<i>sod</i>	=	=	=

Tab. 5.16: Transkription der LIPI-2-Internaline bei 20°C und 37°C

= gleich starke Expression

<, ≤ Transkription bei 20°C bzw. $\Delta prfA$ schwächer als bei 37°C bzw. WT

>, ≥ Expression bei 20°C bzw. $\Delta prfA$ stärker als bei 37°C bzw. WT

Alle Internalingene werden in *L. ivanovii* Wildtyp stärker exprimiert als in der $\Delta prfA$ -Mutante. Bis auf *i-inlE* zeigen sie zudem im Wildtyp eine höhere Transkriptionsrate nach Wachstum bei 37°C verglichen mit 20°C. Nur für *i-inlE* erhält man bei 20°C mehr mRNA als

bei 37°C. In der Deletionsmutante sieht man bei *i-inlB2*, *i-inlL*, *i-inlK* und *i-inlB* verstärkte Expression bei 37°C, bei *i-inlJ*, *i-inlI*, *i-inlH* und *i-inlG* gleich starke Transkription dieser Gene bei 20°C und 37°C. Im Gegensatz dazu findet man bei *i-inlF* und *i-inlE* eine erhöhte Expression bei 20°C.

Auffällig ist zudem, dass sich die Expressionsmuster derjenigen Internalingene ähneln, die möglicherweise polycistronisch transkribiert werden (Kap. 5.5.2). So zeigen *i-inlB2*, *i-inlL* und *i-inlK*, sowie *i-inlJ*, *i-inlI*, *i-inlH* und *i-inlG* jeweils ein gleiches Bild bei der Transkription.

Zusätzlich zu den LIPI-2-Internalingenen wurde die Expression der beiden kleinen Internalingene *i-inlC* und *i-inlD* untersucht (Abb. 5.46, Tab. 5.17). Diese beiden Gene liegen an anderer Stelle im *L. ivanovii*-Genom, sind aber auch hoch homolog zu den LIPI-2-Internalinen und besitzen zudem auch beide eine PrfA-Box (Kap. 5.5.2, Tab. 5.7).

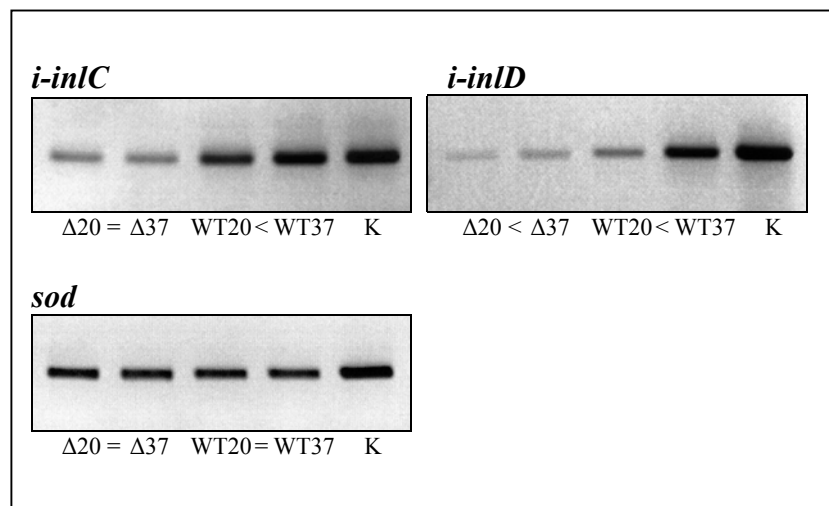


Abb. 5.46: Transkription der kleinen Internaline *i-inlC* und *i-inlD* bei 20°C und 37°C
 Δ: *L. ivanovii* PDC22, *prfA*-Deletionsmutante; WT: *L. ivanovii* ATCC19119
 K: Kontrolle mit chromosomaler DNA von *L. ivanovii* ATCC19119
 20, 37: Wachstumstemperatur der Listerien bei 20°C bzw. 37°C
 = gleich starke Expression; < Transkription bei 20°C schwächer als bei 37°C

Sowohl *i-inlC* als auch *i-inlD* werden in der *prfA*-Deletionsmutante schwächer transkribiert als in *L. ivanovii* Wildtyp. Bei *i-inlC* kann man in der Mutante keine Temperaturabhängigkeit erkennen, bei *i-inlD* findet man eine stärkere Expression nach Wachstum bei 37°C. Auch im Wildtyp werden *i-inlC* und *i-inlD* bei 37°C stärker transkribiert, wobei der Expressionsunterschied bei *i-inlD* viel deutlicher ausfällt als bei *i-inlC*.

Gen	<i>L. ivanovii</i> Δ <i>prfA</i> 20°C – 37°C	<i>L. ivanovii</i> WT 20°C – 37°C	Expression Δ <i>prfA</i> - WT
<i>i-inlC</i>	=	<	<
<i>i-inlD</i>	<	<	<
<i>sod</i>	=	=	=

Tab. 5.17: Expression der kleinen Internaline *i-inlC* und *i-inlD* bei 20°C und 37°C
 = gleich starke Expression
 < Transkription bei 20°C bzw. Δ*prfA* schwächer als bei 37°C bzw. WT

Transkription der zu LIPI-2 benachbarten ORFs bei 20°C und 37°C

Als nächstes wurde die Expression der Open Reading Frames (ORFs) untersucht, die benachbart zur Pathogenitätsinsel LIPI-2 liegen. Diese zählen außer ORF3 nicht mehr zu LIPI-2, wurden aber in der Mutante GD-3 von *L. ivanovii* von *ydeI* bis *norA* spontan deletiert. Deshalb ist es interessant herauszufinden, ob man ein den kleinen Internalinen ähnliches Expressionsmuster nachweisen kann. In nachfolgender Abbildung (Abb. 5.47) ist die Transkription der zu LIPI-2 benachbarten ORFs nach Wachstum bei 20°C und 37°C zu sehen. Es wurden wie schon bei den kleinen Internalinen *L. ivanovii* ATCC19119 und die *prfA*-Mutante *L. ivanovii* $\Delta prfA$ (*L. ivanovii* PDC22) untersucht. Die cDNA wurde wieder 1:10 und die *sod*-Oligonukleotide 1:5 verdünnt.

Betrachtet man das Gen *ysnB*, das LIPI-2 auf der linken Seite flankiert, so erhält man eine relativ konstante Expression. Nur bei der $\Delta prfA$ -Mutante kann man eine etwas schwächere Transkription bei 20°C feststellen. Ansonsten wird *ysnB* gleich stark exprimiert, d.h. sowohl in der Deletionsmutante als auch im Wildtyp liegen gleiche Mengen an mRNA vor. Zudem kann in *L. ivanovii* WT für die beiden untersuchten Wachstumstemperaturen kein Transkriptionsunterschied festgestellt werden.

Auch bei **ORF3** – einem Bestandteil von LIPI-2 – sind keine großen Expressionsunterschiede zu sehen. ORF3 wird insgesamt nur sehr schwach transkribiert und es liegen gleiche Mengen an mRNA bei Wildtyp und Deletionsmutante vor. Nur bei *L. ivanovii* WT kann man eine leicht erhöhte Expression des ORF3-Gens bei 37°C im Vergleich zu 20°C erkennen.

Das *ydeI*-Gen flankiert LIPI-2 auf der rechten Seite und zeigt ebenso kaum Transkriptionsunterschiede zwischen *L. ivanovii* und $\Delta prfA$. Bei der Deletionsmutante findet man eine leicht erhöhte, beim Wildtyp eine leicht verminderte Expression bei 37°C verglichen mit 20°C.

Betrachtet man **ORF5**, so sind keine Transkriptionsunterschiede feststellbar.

Ähnliches gilt auch für **ORF6**, bei dem nur die Expression in der $\Delta prfA$ -Mutante bei 20°C etwas schwächer ausfällt.

Auch bei **ORF7** findet man keine signifikanten Unterschiede in den mRNA-Mengen. Dieses Gen wird zudem ähnlich wie ORF3 nur sehr schwach transkribiert.

Das Gen für die RNA-Helicase *rnaH* wird im Gegensatz zu ORF3 und ORF7 in *L. ivanovii* WT und $\Delta prfA$ stark exprimiert. Doch auch dieses Gen zeigt keine auffälligen Transkriptionsunterschiede.

Ebenso erhält man bei **ORF8** eine starke Expression, die im Wildtyp und der Deletionsmutante bei beiden untersuchten Temperaturen gleich ist.

Für die sich an ORF8 anschließenden Open Reading Frames **ORF9**, **ORF9A** und **ORF9B** kann man nur eine schwache Transkription mittels RT-PCR detektieren. Bei ORF9 und ORF9B finden sich keine Expressionsunterschiede. ORF9A aber wird sowohl in der *prfA*-Mutante als auch in *L. ivanovii* WT bei 37°C stärker transkribiert als bei 20°C.

ORF9C wiederum zeigt eine starke Expression und auch hier ist die Transkription in der Deletionsmutante und im Wildtyp bei 37°C leicht erhöht.

Bei **ORF10** und dem Gen für eine mögliche Antibiotikum-Resistenz *norA* erhält man eine entgegengesetzte Temperaturabhängigkeit. Sowohl in *L. ivanovii* WT als auch der $\Delta prfA$ -

Mutante ist eine erhöhte Expression nach Wachstum bei 20°C zu sehen. ORF10 wird jedoch nur schwach, *norA* wesentlich stärker transkribiert.

ORF11 schließlich besitzt als einziges der neu identifizierten Open Reading Frames eine mögliche PrfA-Box. Doch die Expression unterscheidet sich wie bei allen anderen ORFs nicht bei Wildtyp und *prfA*-Mutante. Man kann nur eine Temperaturabhängigkeit beider *L. ivanovii*-Stämme feststellen. Beide lassen eine verstärkte Transkription bei 37°C erkennen.

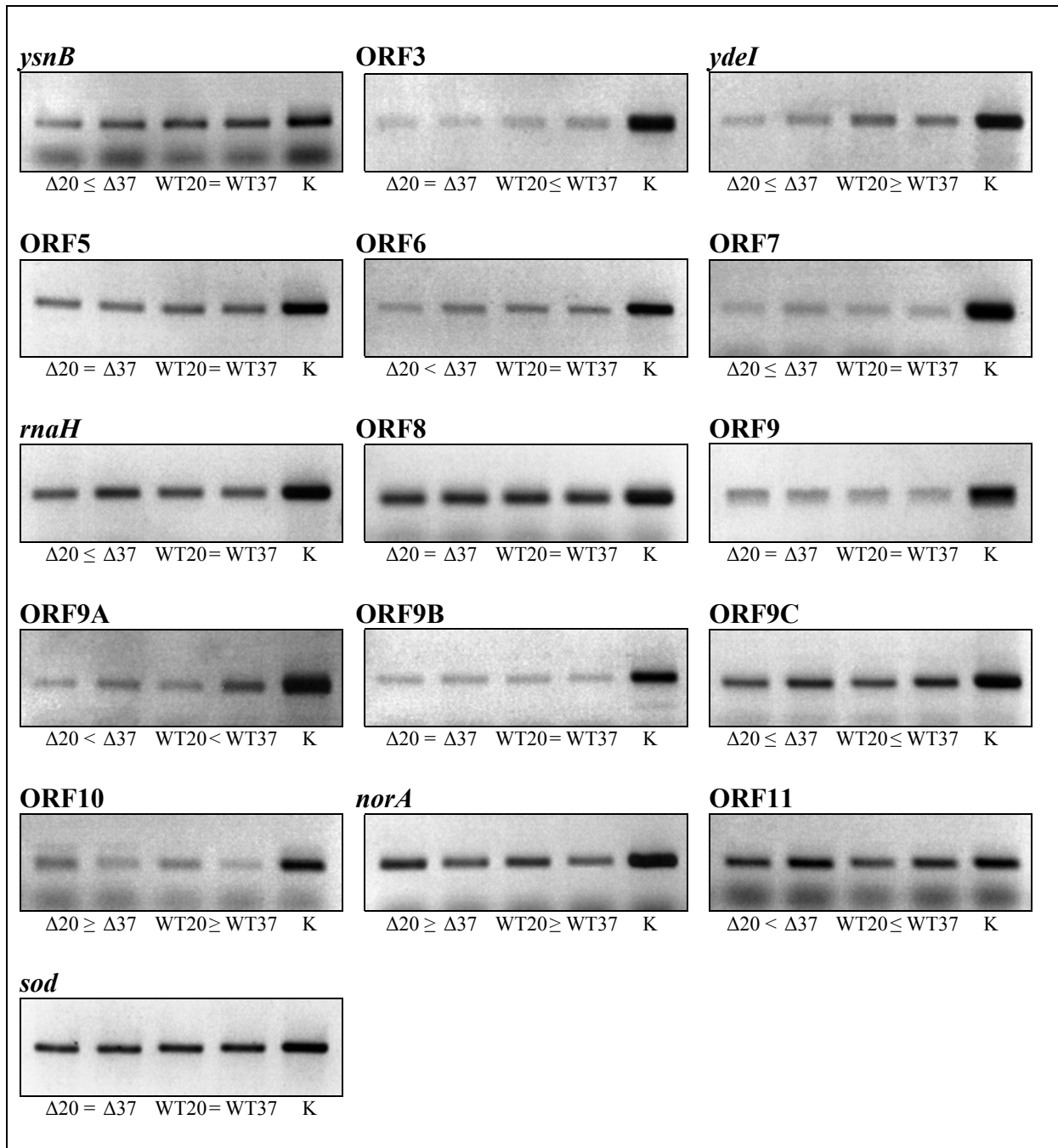


Abb. 5.47: Expression der zu LIPI-2 benachbarten ORFs bei 20°C und 37°C

Δ: *L. ivanovii* PDC22, *prfA*-Deletionsmutante; WT: *L. ivanovii* ATCC19119

K: Kontrolle mit chromosomaler DNA von *L. ivanovii* ATCC19119

20, 37: Wachstumstemperatur der Listerien bei 20°C bzw. 37°C

<, > deutlicher Expressionsunterschied; ≤, ≥ geringe Abweichung in der Stärke der Transkription

= gleiche starke Expression

<, ≤ Transkription bei 20°C schwächer als bei 37°C; >, ≥ Expression bei 20°C stärker als bei 37°C

Zusammenfassend kann man sagen, dass bei den untersuchten Open Reading Frames wesentlich geringere temperaturabhängige Expressionsunterschiede auftreten als bei den zuvor untersuchten Internalingenen (Abb. 5.47, Tab. 5.18). Zudem ist kein Unterschied zwischen der *prfA*-Deletionsmutante und dem Wildtyp feststellbar. Bei beiden findet man gleiche Mengen an mRNA, d.h. die Gene werden in Ab- oder Anwesenheit von PrfA gleich stark transkribiert. Außerdem werden die meisten der ORFs nur schwach exprimiert. So war es z.B. für ORF3 oder ORF7 erst nach mehreren Ansätzen möglich, die Transkription dieser Gene überhaupt nachzuweisen.

Gen	<i>L. ivanovii</i> $\Delta prfA$ 20°C – 37°C	<i>L. ivanovii</i> WT 20°C – 37°C	Expression $\Delta prfA$ - WT
<i>ysnB</i>	≤	=	=
ORF3	=	≤	=
<i>ydeI</i>	≤	≥	=
ORF5	=	=	=
ORF6	<	=	=
ORF7	≤	=	=
<i>rnaH</i>	≤	=	=
ORF8	=	=	=
ORF9	=	=	=
ORF9A	<	<	=
ORF9B	=	=	=
ORF9C	<	≤	=
ORF10	≥	≥	=
<i>norA</i>	≥	≥	=
ORF11	<	≤	=
<i>sod</i>	=	=	=

Tab. 5.18: Transkription der zu LIPI-2 benachbarten ORFs bei 20°C und 37°C
 = gleich starke Expression
 <, ≤ Transkription bei 20°C bzw. $\Delta prfA$ schwächer als bei 37°C bzw. WT
 >, ≥ Expression bei 20°C bzw. $\Delta prfA$ stärker als bei 37°C bzw. WT

Expression der Virulenzclustergene bei 20°C und 37°C

Da bei den Virulenzclustergenen schon bekannt ist, dass diese PrfA-abhängig exprimiert werden (37, 184), wurden diese zusätzlich zu den Internalingenen und Open Reading Frames auch mittels RT-PCR untersucht (Abb. 5.48). So sollte sichergestellt werden, dass die Methode der RT-PCR und die eingesetzten *Listeria*-Stämme geeignet sind zum Nachweis der PrfA-abhängigen Genexpression.

Zudem sollte die Expression der Virulenzclustergene unter verschiedenen Wachstumstemperaturen (20°C bzw. 37°C) untersucht werden, um eine mögliche temperaturabhängige Transkription der Virulenzgene detektieren zu können.

Es wurde wiederum eine cDNA-Verdünnung von 1:10 eingesetzt und die *sod*-Oligonukleotide in einer Menge von 0,05µg verwendet.

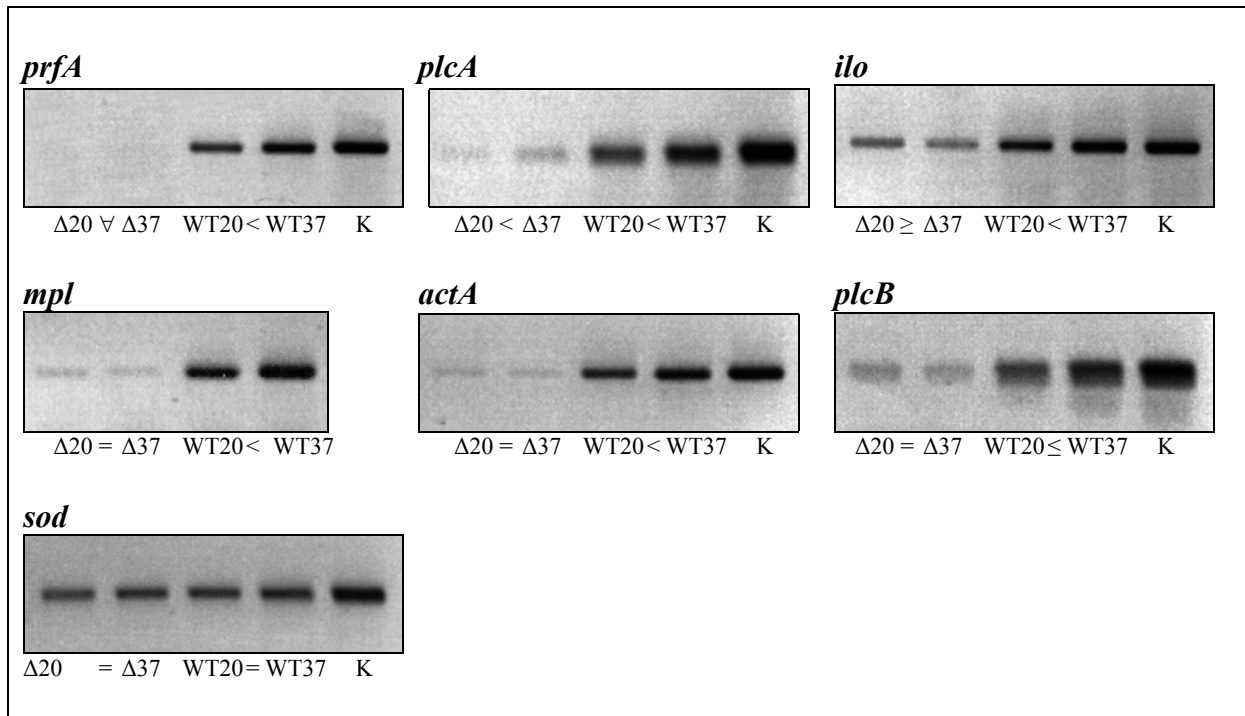


Abb. 5.48: Transkription der Virulenzclustergene bei 20°C und 37°C

Δ: *L. ivanovii* PDC22, *prfA*-Deletionsmutante; WT: *L. ivanovii* ATCC19119

K: Kontrolle mit chromosomaler DNA von *L. ivanovii* ATCC19119

20, 37: Wachstumstemperatur der Listerien bei 20°C bzw. 37°C

<, > deutlicher Expressionsunterschied; ≤, ≥ geringe Abweichung in der Stärke der Transkription

= gleich starke Expression; ∇: keine Expression detektierbar

<, ≤ Transkription bei 20°C schwächer als bei 37°C; >, ≥ Expression bei 20°C stärker als bei 37°C

Betrachtet man die Expression von *prfA*, so kann man feststellen, dass *prfA* in der Deletionsmutante *L. ivanovii* Δ*prfA* (*L. ivanovii* PDC22) nicht transkribiert wird. Dies ist auch zu erwarten, da die für die RT-PCR eingesetzten Oligonukleotide innerhalb der deletierten Region von *prfA* liegen. Im Gegensatz dazu kann man im Wildtyp (*L. ivanovii* ATCC19119) eine starke Expression von *prfA* detektieren, die bei einer Wachstumstemperatur von 20°C geringer als bei der von 37°C ausfällt.

Das Gen *plcA* wird sowohl in *L. ivanovii* Δ*prfA* als auch im Wildtyp exprimiert, bei der Deletionsmutante jedoch deutlich schwächer als beim Wildtyp. Zudem kann man bei beiden eine Temperaturabhängigkeit der Transkription feststellen, denn bei 20°C erhält man bei Mutante und Wildtyp weniger Transkript als bei 37°C.

Im Gegensatz zu *plcA* sieht man bei dem Hämolysingen *ilo* eine entgegengesetzte Temperaturabhängigkeit bei der *prfA*-Mutante. Man kann eine leicht erhöhte Transkription bei 20°C im Vergleich zu 37°C erkennen. Die Expression von *ilo* bei *L. ivanovii* WT verhält sich wie die der schon beschriebenen Gene *prfA* und *plcA*. Man kann bei 37°C eine stärkere Expression als bei 20°C Wachstumstemperatur beobachten. Zudem zeigt sich auch hier eine stärkere Transkription von *ilo* bei *L. ivanovii* WT im Vergleich zu *L. ivanovii* Δ*prfA*.

Das Gen *mpl* wird sowohl in der *prfA*-Mutante als auch im Wildtyp exprimiert, bei *L. ivanovii* Δ*prfA* allerdings deutlich schwächer als beim Wildtyp. Zudem kann bei der Deletionsmutante kein Unterschied in der Expression bei den beiden untersuchten Wachstumstemperaturen festgestellt werden. Im Gegensatz dazu wird *mpl* in *L. ivanovii* WT bei 37°C stärker transkribiert als bei 20°C.

Bei *actA* ist ein mit *mpl* vergleichbares Expressionsmuster zu erkennen. Das Gen *actA* wird in der *prfA*-Mutante schwächer als im Wildtyp transkribiert und zeigt keinen Unterschied in der Expression bei 20°C verglichen mit 37°C. In *L. ivanovii* WT erfolgt eine deutlich stärkere Transkription des *actA*-Gens, das wiederum bei 37°C mehr Transkript als bei 20°C aufweist. Auch die Transkription von *plcB* ähnelt der von *mpl* und *actA*. Man findet eine schwächere Expression des Gens bei der Deletionsmutante verglichen mit dem Wildtyp. Zugleich ist kein Unterschied in der Transkriptstärke bei 20°C und 37°C feststellbar. Im Gegensatz dazu wird *plcB* in *L. ivanovii* WT stärker exprimiert und zeigt mehr Transkript bei 37°C als bei 20°C Wachstumstemperatur.

Das *sod*-Gen diente wieder als Standardgen und weist eine gleich starke Transkription bei der *prfA*-Deletionsmutante und bei *L. ivanovii* WT auf. Zudem kann kein Expressionsunterschied bei unterschiedlichen Wachstumstemperaturen festgestellt werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass alle Gene des PrfA-abhängigen Virulenzgenclusters in *L. ivanovii* $\Delta prfA$ deutlich schwächer bzw. gar nicht (*prfA*) exprimiert werden als in *L. ivanovii* WT (Abb. 5.48, Tab. 5.19). Zudem kann man bei *L. ivanovii* WT bei allen Genen erkennen, dass bei 37°C eine stärkere Transkription als bei 20°C stattfindet. Bei der *prfA*-Mutante ist dies nicht zu beobachten. Nur bei *plcA* findet man eine stärkere Expression bei 37°C, bei allen anderen Genen (*mpl*, *actA*, *plcB*) ist die Transkription bei 20°C und 37°C gleich stark bzw. bei *ilo* bei 20°C sogar stärker als bei 37°C.

Gen	<i>L. ivanovii</i> $\Delta prfA$ 20°C – 37°C	<i>L. ivanovii</i> WT 20°C – 37°C	Expression $\Delta prfA$ - WT
<i>prfA</i>	∇	<	<
<i>plcA</i>	<	<	<
<i>ilo</i>	≥	<	<
<i>mpl</i>	=	<	<
<i>actA</i>	=	<	<
<i>plcB</i>	=	≤	<
<i>sod</i>	=	=	=

Tab. 5.19: Expression der Virulenzclustergene bei 20°C und 37°C

= gleich starke Expression; ∇ keine Expression detektierbar

<, ≤ Transkription bei 20°C bzw. $\Delta prfA$ schwächer als bei 37°C bzw. WT

>, ≥ Expression bei 20°C bzw. $\Delta prfA$ stärker als bei 37°C bzw. WT

Zusätzlich zu den PrfA-abhängigen Genen des Virulenzgenclusters wurde die Expression der Gene *iap* und *smcL* in *L. ivanovii* WT und $\Delta prfA$ untersucht. Auch hier wurden die beiden Wachstumstemperaturen 20°C und 37°C miteinander verglichen und *sod* als Standardgen verwendet (Abb. 5.49, Tab. 5.20).

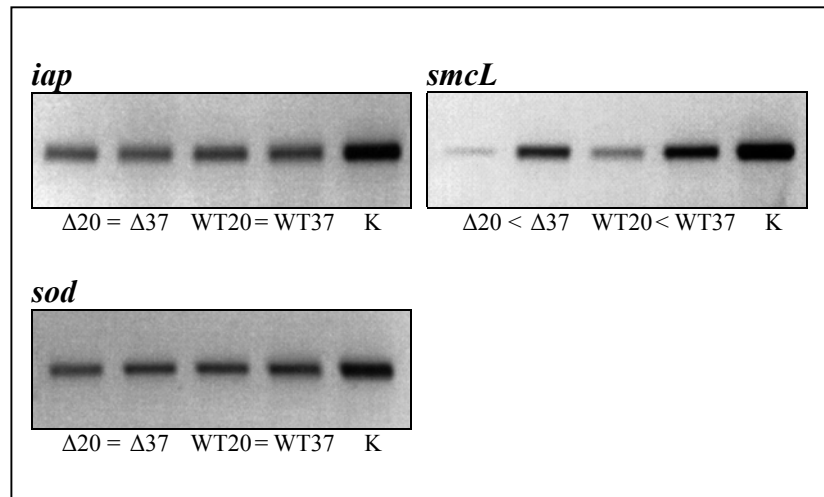


Abb. 5.49: Expression von *iap* und *smcL* bei 20°C und 37°C

Δ : *L. ivanovii* PDC22, *prfA*-Deletionsmutante; WT: *L. ivanovii* ATCC19119

K: Kontrolle mit chromosomaler DNA von *L. ivanovii* ATCC19119

20, 37: Wachstumstemperatur der Listerien bei 20°C bzw. 37°C

= gleich starke Expression; < Transkription bei 20°C schwächer als bei 37°C

Betrachtet man das PrfA-unabhängige Gen *iap*, so kann man ein ähnliches Expressionsmuster wie bei dem Standardgen *sod* erkennen. Auch *iap* wird in der *prfA*-Mutante und im Wildtyp gleich stark transkribiert und weist keinen Expressionsunterschied bei verschiedenen Wachstumstemperaturen auf.

Das für die Sphingomyelinase codierende Gen *smcL* zeigt einen deutlichen Expressionsunterschied bei 20°C bzw. 37°C. Sowohl bei *L. ivanovii* $\Delta prfA$ als auch bei *L. ivanovii* WT wird *smcL* bei 37°C eindeutig stärker exprimiert als bei 20°C. Auffallend ist, dass man keinen Unterschied in Bezug auf Transkriptionsstärke bei Deletionsmutante und Wildtyp feststellen kann. Die Transkriptmengen bei 20°C bzw. 37°C sind bei *L. ivanovii* $\Delta prfA$ und WT jeweils gleich groß.

Gen	<i>L. ivanovii</i> $\Delta prfA$ 20°C – 37°C	<i>L. ivanovii</i> WT 20°C – 37°C	Expression $\Delta prfA$ - WT
<i>iap</i>	=	=	=
<i>smcL</i>	<	<	=
<i>sod</i>	=	=	=

Tab. 5.20: Transkription von *iap* und *smcL* bei 20°C und 37°C

= gleich starke Expression

< Transkription bei 20°C bzw. $\Delta prfA$ schwächer als bei 37°C bzw. WT

5.5.4 RT-PCR: Vergleich der Expression diverser Gene von *L. ivanovii* nach Kultur in Minimal- und Vollmedium

Es konnte schon früher gezeigt werden, dass strikt PrfA-abhängige Gene von *L. monocytogenes* bei einem Überführen der Bakterienkultur von Bakterienvollmedium (BHI) in das Zellkulturmedium "Minimum Essential Medium" (MEM) transkriptionell hochreguliert werden (15, 16, 67, 250). In MEM findet trotz eigentlich gutem Nährstoffangebot kaum Vermehrung von *L. monocytogenes* statt. Die Ursachen hierfür sind unbekannt.

Auch bei *L. ivanovii* kann Wachstum in MEM zu einer Induktion PrfA-abhängiger Gentranskription führen. Zu den PrfA-kontrollierten Genen zählen neben den schon von *L. monocytogenes* bekannten Virulenzclustergenen eine Reihe kleiner, sekretierter Internaline (i-InlC, i-InlD, i-InlE und i-InlF). Unter PrfA-induzierenden Bedingungen kommt es bei den Internalingenen i-*inlF* und i-*inlD* aufgrund ihrer abweichenden PrfA-Bindungsstellen nur zu einer schwachen Expression, i-*inlE* und i-*inlC* werden jedoch stark transkribiert (59, 67, 68, 69).

Deshalb sollte überprüft werden, ob die neu identifizierten LIPI-2-Internalingene, die mit Ausnahme von i-*inlB* alle eine PrfA-Box besitzen, nach einem sog. "MEM-Shift" eine erhöhte Expression zeigen. Hierzu wurden die Bakterien nach Wachstum im Vollmedium BHI in der logarithmischen Wachstumsphase in Zellkulturmedium (MEM) überführt und für 30 Minuten unter 5% CO₂ inkubiert. Diese Bedingungen sollten das intrazelluläre Milieu während einer Infektion simulieren und führen bei PrfA-abhängigen Genen zu einer Induktion der Transkription.

Neben den Internalingenen wurden wie in Kap. 5.5.3 auch die benachbarten Open Reading Frames sowie die Gene des Virulenzgenclusters untersucht.

Es wurden wieder *L. ivanovii* ATCC19119 und die Δ *prfA*-Mutante *L. ivanovii* PDC22 miteinander verglichen.

Expression der LIPI-2-Internalingene mit und ohne "MEM-Shift"

Neben den Genen für die LIPI-2-Internaline (Abb. 5.50) wurden zusätzlich wieder die Internalingene i-*inlC* und i-*inlD* untersucht (Abb. 5.51).

Um reproduzierbare Aussagen über die Expression der untersuchten Gene machen zu können, wurde die RNA in drei voneinander unabhängigen Ansätzen isoliert und in cDNA umgeschrieben.

Für die Untersuchung der Internalingene wurde die cDNA wiederum 1:10 und die *sod*-Oligonukleotide 1:5 verdünnt.

Beim Gen für das große Internalin i-*inlB2* kann man bei *L. ivanovii* Wildtyp eine Induktion der Genexpression nach "MEM-Shift" (+MEM) erkennen und sieht auf dem Agarosegel deutlich mehr mRNA. Bei der Δ *prfA*-Mutante zeigt sich ein entgegengesetztes Bild. Die Transkription ist im Vergleich zum Wildtyp deutlich geringer, allerdings erhält man ohne

"MEM-Shift" (-MEM), d.h. nach Wachstum im Vollmedium BHI eine stärkere Genexpression als nach Überführen der Listerien in das Zellkulturmedium MEM.

Gleiches gilt für *i-inlL*, bei dem in der Deletionsmutante nur eine sehr schwache Transkription nachgewiesen werden kann. Ebenso ist die Expression bei *L. ivanovii* $\Delta prfA$ nach Wachstum im Vollmedium BHI gegenüber MEM leicht erhöht. Beim Wildtyp findet man dagegen eine starke Transkription und kann wieder die induzierende Wirkung des "MEM-Shifts" erkennen. Nach Wachstum des Wildtyps in MEM ist eine erhöhte Genexpression sichtbar.

Die Gene *i-inlK* und *i-inlB* zeigen ähnliche Transkriptionsmuster. Bei beiden findet nur eine geringe Expression in der Deletionsmutante statt, die nach Wachstum in BHI gegenüber MEM leicht erhöht ist. In *L. ivanovii* erhält man eine starke Transkription der Gene sowohl mit als auch ohne "MEM-Shift" und kann keinen Unterschied bzw. keine induzierende Wirkung durch das Zellkulturmedium erkennen.

Mit *i-inlJ* wiederum verhält es sich bei der Expression wie für die schon beschriebenen Gene *i-inlB2* und *i-inlL*. In der $\Delta prfA$ -Mutante findet man eine schwache Transkription dieses Gens, die ohne "MEM-Shift" leicht erhöht ist. Im Gegensatz dazu wird *i-inlJ* in *L. ivanovii* WT stärker exprimiert und zeigt eine größere Menge an mRNA nach Wachstum im Zellkulturmedium MEM.

Beim Gen für das kleine Internalin *i-inlI* konnte in der $\Delta prfA$ -Mutante keine Transkription dieses Gens gezeigt werden. Selbst nach mehrmaligem Wiederholen der RT-PCRs und Einsatz unterschiedlicher cDNA-Mengen in der PCR bzw. RNA-Mengen in der reversen Transkription konnte keine mRNA nachgewiesen werden. Somit sind möglicherweise nur sehr geringe mRNA-Mengen vorhanden, die mit der hier angewendeten Methode nicht mehr detektierbar sind.

Im Gegensatz dazu findet man für *i-inlI* in *L. ivanovii* WT eine starke Expression. Allerdings ist keine induzierende Wirkung durch "MEM-Shift" sichtbar und man erhält stattdessen eine stärkere Transkription nach Wachstum im Vollmedium BHI verglichen mit dem Zellkulturmedium MEM.

Bei den Genen für *i-inlH* und *i-inlG* sieht man ein ähnliches Transkriptionsmuster. Beide werden sowohl in der Deletionsmutante als auch im Wildtyp nur sehr schwach exprimiert. In der $\Delta prfA$ -Mutante findet man keinen Unterschied nach Wachstum mit bzw. ohne "MEM-Shift", in *L. ivanovii* WT ist die Transkription nach Wachstum im Zellkulturmedium MEM leicht verringert.

Auch für *i-inlF* kann man kaum mRNA in der $\Delta prfA$ -Mutante detektieren. In *L. ivanovii* WT jedoch findet eine starke Expression des Gens statt. Zudem ist die induzierende Wirkung des Zellkulturmediums deutlich sichtbar anhand der größeren Menge an mRNA nach Wachstum der Bakterien in MEM.

Beim Gen für das kleine Internalin *i-inlE* ist die Induktion der Genexpression nach "MEM-Shift" noch deutlicher sichtbar. Selbst in der $\Delta prfA$ -Mutante kann man eine starke Transkription des Gens erkennen, die nach Wachstum in MEM noch erhöht wird. Auch im Wildtyp kommt es nach "MEM-Shift" zu vermehrter mRNA-Bildung.

Interessanterweise finden sich wie schon bei der Untersuchung verschiedener Wachstumstemperaturen (Kap. 5.5.3) zwei Banden für das *i-inlE*-Gen. Auch diese Bande

zeigt das gleiche Expressionsmuster auf wie *i-inLE* und ist somit vermutlich kein unspezifisches PCR-Produkt.

Für das Standardgen *sod* sieht man wie auch schon in den vorangegangenen Versuchen keine Unterschiede in der Transkription. Es wird in beiden *L. ivanovii*-Stämmen sowohl im Vollmedium BHI als auch im Zellkulturmedium MEM gleich stark exprimiert.

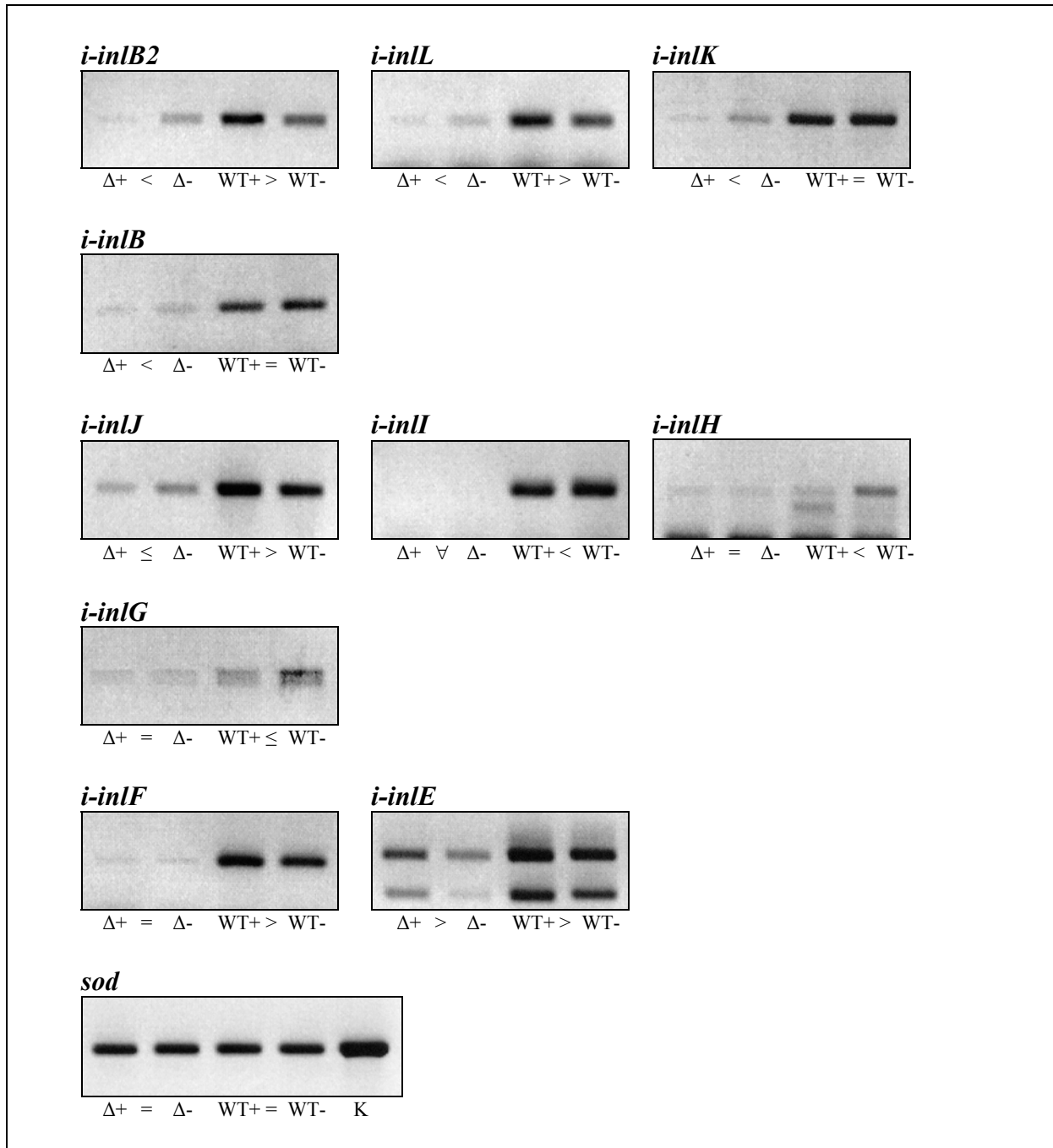


Abb. 5.50: Transkription der LIPI-2-Internaline mit und ohne "MEM-Shift"

Δ: *L. ivanovii* PDC22, *prfA*-Deletionsmutante; WT: *L. ivanovii* ATCC19119

K: Kontrolle mit chromosomaler DNA *L. ivanovii* ATCC19119

+ Expression nach Kultur in Zellkulturmedium MEM, d.h. nach "MEM-Shift"

- Transkription nach Kultur in Vollmedium BHI, d.h. ohne "MEM-Shift"

<, > deutlicher Expressionsunterschied; ≤, ≥ geringe Abweichung in der Stärke der Transkription

= gleich starke Expression; ∇: keine Expression detektierbar

<, ≤ Transkription in MEM schwächer als in BHI; >, ≥ Expression in MEM stärker als in BHI

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass bei allen untersuchten LIPI-2-Internalingenen bei *L. ivanovii* $\Delta prfA$ nur eine schwache Genexpression stattfindet (Tab. 5.21) und es nach "MEM-Shift" dieser Bakterien vielmehr zu einer Repression als Induktion der Transkription im Zellkulturmedium kommt. Einzige Ausnahme ist *i-inlE*, das auch in der Deletionsmutante stark und nach "MEM-Shift" verstärkt transkribiert wird.

In *L. ivanovii* Wildtyp findet eine stärkere Expression statt. Zudem kann man bei einigen Genen (*i-inlB2*, *i-inlL*, *i-inlJ*, *i-inlF* und *i-inlE*) die induzierende Wirkung des Zellkulturmediums auf die Transkription erkennen.

Gen	<i>L. ivanovii</i> $\Delta prfA$ +MEM / -MEM	<i>L. ivanovii</i> WT +MEM / -MEM	Expression $\Delta prfA$ - WT
<i>i-inlB2</i>	<	>	<
<i>i-inlL</i>	<	>	<
<i>i-inlK</i>	<	=	<
<i>i-inlB</i>	<	=	<
<i>i-inlJ</i>	≤	>	<
<i>i-inlI</i>	∇	<	<
<i>i-inlH</i>	=	<	<
<i>i-inlG</i>	=	≤	<
<i>i-inlF</i>	=	>	<
<i>i-inlE</i>	>	>	<
<i>sod</i>	=	=	=

Tab. 5.21: Expression der LIPI-2-Internaline mit und ohne "MEM-Shift"

+MEM: Expression nach Kultur in Zellkulturmedium MEM (mit "MEM-Shift")

-MEM: Transkription nach Kultur in Vollmedium BHI (ohne "MEM-Shift")

= gleich starke Expression; ∇ keine Expression detektierbar

<, ≤ Transkription in MEM bzw. bei $\Delta prfA$ schwächer als in BHI bzw. bei WT

>, ≥ Expression in MEM bzw. bei $\Delta prfA$ stärker als in BHI bzw. bei WT

Zusätzlich zu den LIPI-2-Internalingenen wurde wieder die Expression der beiden kleinen Internalingene *i-inlC* und *i-inlD* untersucht (Abb. 5.51, Tab. 5.22).

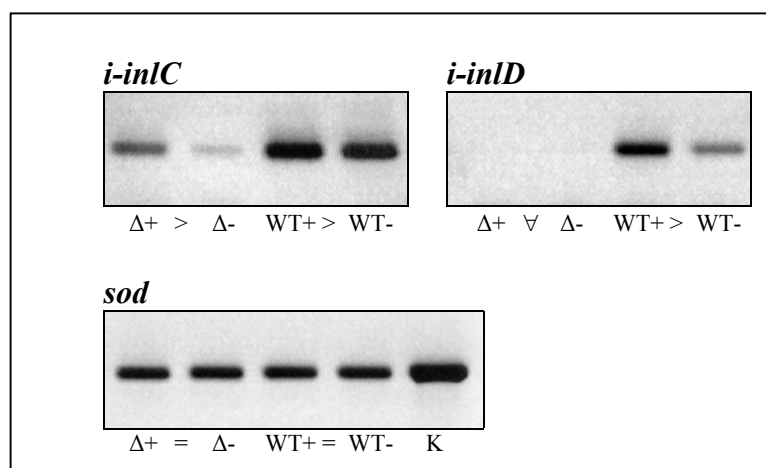


Abb. 5.51: Expression der kleinen Internaline *i-inlC* und *i-inlD* mit und ohne "MEM-Shift"

Δ: *L. ivanovii* PDC22, *prfA*-Deletionsmutante; WT: *L. ivanovii* ATCC19119

K: Kontrolle mit chromosomaler DNA *L. ivanovii* ATCC19119

+ Expression nach Kultur in Zellkulturmedium MEM, d.h. nach "MEM-Shift"

- Transkription nach Kultur in Vollmedium BHI, d.h. ohne "MEM-Shift"

= gleich starke Expression; ∇: keine Expression detektierbar

> Expression in MEM stärker als in BHI

Bei beiden ist eine deutliche Induktion der Genexpression nach Überführen in das Zellkulturmedium MEM zu sehen. Bei *i-inlC* sieht man sogar in der Deletionsmutante eine verstärkte Transkription nach "MEM-Shift". Zudem wird *i-inlC* im Wildtyp sehr stark exprimiert.

Bei *i-inlD* hingegen kann man in der $\Delta prfA$ -Mutante keine mRNA nachweisen. Auch hier wurden mehrere Ansätze mit unterschiedlichen cDNA- und mRNA-Mengen durchgeführt, blieben aber erfolglos. Auch in *L. ivanovii* WT wird *i-inlD* nur schwach exprimiert, zeigt jedoch eine starke Erhöhung nach Überführen der Listerien in das Zellkulturmedium.

Gen	<i>L. ivanovii</i> $\Delta prfA$ +MEM / -MEM	<i>L. ivanovii</i> WT +MEM / -MEM	Expression $\Delta prfA$ - WT
<i>i-inlC</i>	>	>	<
<i>i-inlD</i>	∇	>	<
<i>sod</i>	=	=	=

Tab. 5.22: Transkription der kleinen Internaline *i-inlC* und *i-inlD* mit und ohne "MEM-Shift"

+MEM: Expression nach Kultur in Zellkulturmedium MEM (mit "MEM-Shift")

-MEM: Transkription nach Kultur in Vollmedium BHI (ohne "MEM-Shift")

= gleich starke Expression; ∇ keine Expression detektierbar

< Transkription in MEM bzw. bei $\Delta prfA$ schwächer als in BHI bzw. bei WT

> Expression in MEM bzw. bei $\Delta prfA$ stärker als in BHI bzw. bei WT

Transkription der zu LIPI-2 benachbarten ORFs mit und ohne "MEM-Shift"

Auch die benachbart zu LIPI-2 liegenden Open Reading Frames wurden mit und ohne "MEM-Shift" untersucht (Abb. 5.52, Tab. 5.23). Zum Vergleich wurden wieder die beiden *L. ivanovii*-Stämme *L. ivanovii* WT und *L. ivanovii* $\Delta prfA$ eingesetzt. Die cDNA wurde 1:10 und die *sod*-Oligonukleotide 1:5 verdünnt.

Auch hier fallen die Expressionsunterschiede geringer als bei den zuvor untersuchten Internalingenen aus.

So findet in *ysnB*, das LIPI-2 auf der linken Seite flankiert, eine relativ gleichmäßige Transkription sowohl in der *prfA*-Mutante als auch im Wildtyp statt. Nur in der Deletionsmutante kann eine erhöhte Transkription nach Wachstum in BHI-Medium festgestellt werden.

ORF3 wird wieder nur sehr schwach exprimiert und zeigt kaum einen Unterschied zwischen *L. ivanovii* $\Delta prfA$ und WT. Allerdings findet eine schwache Induktion der Transkription nach "MEM-Shift" beim Wildtyp statt.

Das Gen *ydeI*, das sich an LIPI-2 auf der rechten Seite anschließt, lässt eine deutliche Induktion der Expression nach Shift in Zellkulturmedium erkennen. Sowohl bei *L. ivanovii* WT als auch der Deletionsmutante erhält man wesentlich mehr mRNA nach Kultur der Bakterien in MEM.

Gleiches findet man für **ORF5**, das ebenso wie *ydeI* in der $\Delta prfA$ -Mutante und im Wildtyp stark transkribiert wird und in Zellkulturmedium eine erhöhte mRNA-Synthese aufweist.

Das Gen für **ORF6** wiederum zeigt eine relativ gleichmäßige Expression und man findet nur wie schon für *ysnB* in der *prfA*-Mutante eine leicht erhöhte Transkription nach Wachstum in BHI.

ORF7 allerdings ist nicht nachweisbar. Schon in Kap. 5.5.3 war nur eine schwache Expression sichtbar, doch in den hier gezeigten RT-PCRs war ORF7 nicht detektierbar.

Das Gen für die RNA-Helicase *rnaH* zeigt eine gleichmäßige Expression. In *L. ivanovii* WT und $\Delta prfA$, sowie mit und ohne "MEM-Shift" findet man gleiche mRNA-Mengen auf dem Agarosegel.

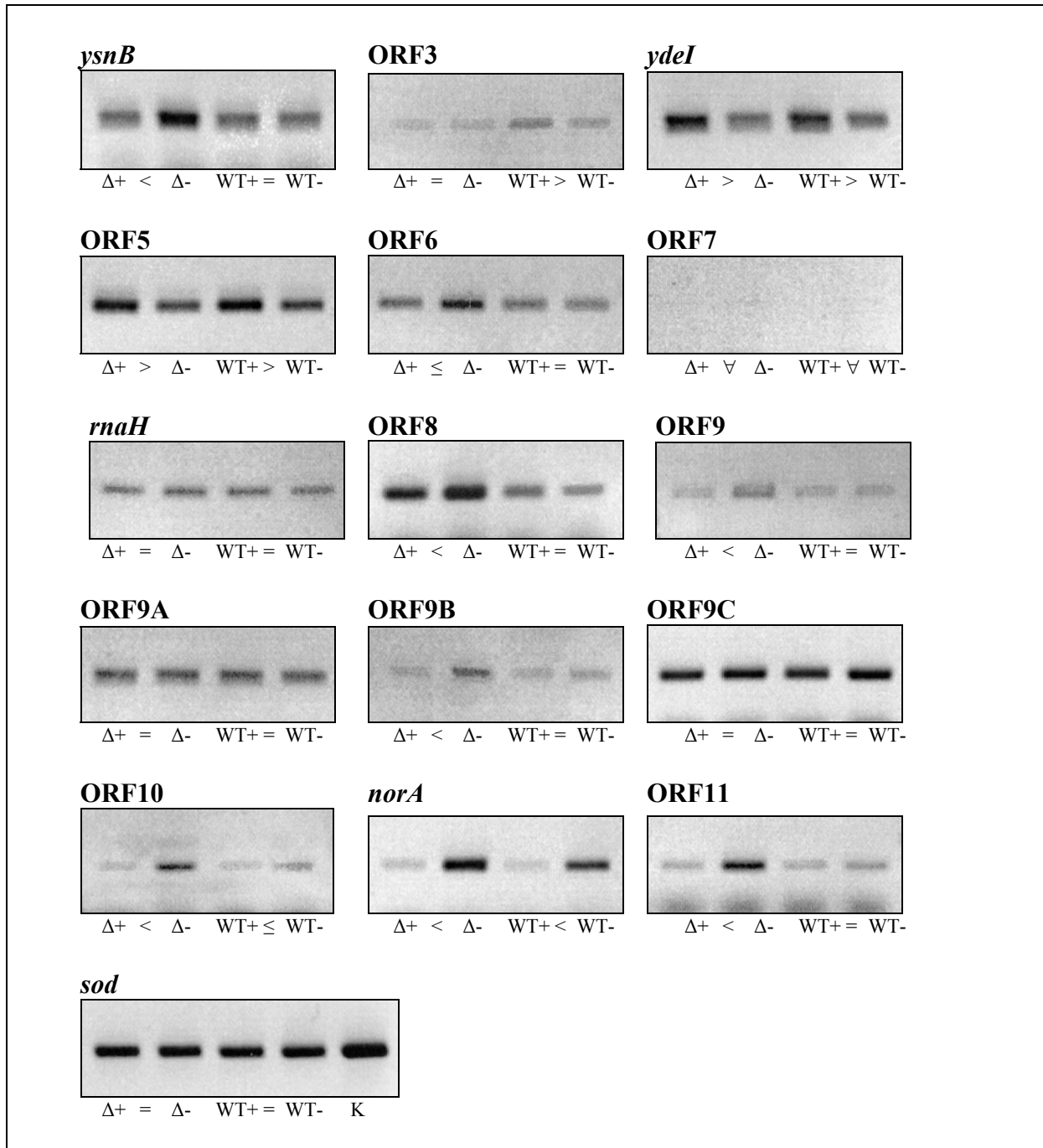


Abb. 5.52: Transkription der zu LIPI-2 benachbarten ORFs mit und ohne "MEM-Shift"

Δ : *L. ivanovii* PDC22, *prfA*-Deletionsmutante; WT: *L. ivanovii* ATCC19119

K: Kontrolle mit chromosomaler DNA *L. ivanovii* ATCC19119

+ Expression nach Kultur in Zellkulturmedium MEM, d.h. nach "MEM-Shift"

- Transkription nach Kultur in Vollmedium BHI, d.h. ohne "MEM-Shift"

<, > deutlicher Expressionsunterschied; \leq , \geq geringe Abweichung in der Stärke der Transkription

= gleich starke Expression; ∇ : keine Expression detektierbar

<, \leq Transkription in MEM schwächer als in BHI; >, \geq Expression in MEM stärker als in BHI

Auffällig ist **ORF8**, das in der Deletionsmutante eine stärkere Transkription als im Wildtyp aufweist. Dies stimmt allerdings nicht mit den Daten aus Kap. 5.5.3 überein, denn dort findet man eine gleich starke Expression dieses Gens in *L. ivanovii* WT und $\Delta prfA$. Somit muss die Transkription von ORF8 nochmals überprüft werden.

Für die drei Open Reading Frames **ORF9**, **ORF9B** und **ORF10** findet man eine schwache Transkription in *L. ivanovii* WT und $\Delta prfA$. Alle drei Gene werden im Wildtyp in BHI und MEM gleich stark transkribiert, zeigen aber in der Deletionsmutante leicht erhöhte Expression in BHI.

ORF9A und **ORF9C** werden wie das Standardgen *sod* in Wildtyp und Mutante gleich stark transkribiert und die Expression dieser Gene durch Shift in das Zellkulturmedium MEM weder induziert noch reprimiert.

norA und **ORF11** schließlich zeigen deutliche Transkriptionsunterschiede. Beide Gene werden in *L. ivanovii* WT und $\Delta prfA$ nach Wachstum in MEM nur schwach exprimiert. Auch in BHI findet man für ORF11 beim Wildtyp nur wenig mRNA. Im Gegensatz dazu ist in der Deletionsmutante für beide Gene deutlich mehr mRNA nach Wachstum in BHI verglichen mit MEM nachweisbar.

Somit findet man (mit Ausnahme von ORF8) zwischen *L. ivanovii* WT und $\Delta prfA$ keine signifikanten Unterschiede in der Expression der untersuchten Gene (Tab. 5.23). Dies stimmt mit den in Kap. 5.5.3 erhaltenen Ergebnissen überein. Für die Open Reading Frames ORF3 und ORF5, sowie für das Gen *ydeI* lässt sich eine Erhöhung der Transkriptionsrate nach Überführen der Bakterien in MEM nachweisen. Für die meisten anderen Gene aber findet keine Induktion durch "MEM-Shift" statt, sondern MEM scheint – vor allem in der Deletionsmutante – eher eine reprimierende Wirkung auf die Genexpression zu haben.

Gen	<i>L. ivanovii</i> $\Delta prfA$ +MEM / -MEM	<i>L. ivanovii</i> WT +MEM / -MEM	Expression $\Delta prfA$ - WT
<i>ysnB</i>	<	=	\geq
ORF3	=	>	=
<i>ydeI</i>	>	>	=
ORF5	>	>	=
ORF6	\leq	=	=
ORF7	∇	∇	.
<i>rnaH</i>	=	=	=
ORF8	<	=	>
ORF9	<	=	=
ORF9A	=	=	=
ORF9B	<	=	=
ORF9C	=	=	=
ORF10	<	\leq	=
<i>norA</i>	<	<	=
ORF11	<	=	=
<i>sod</i>	=	=	=

Tab. 5.23: Expression der zu LIPI-2 benachbarten ORFs mit und ohne "MEM-Shift"
 +MEM: Expression nach Kultur in Zellkulturmedium MEM (mit "MEM-Shift")
 -MEM: Transkription nach Kultur in Vollmedium BHI (ohne "MEM-Shift")
 = gleich starke Expression; ∇ keine Expression detektierbar
 <, \leq Transkription in MEM bzw. bei $\Delta prfA$ schwächer als in BHI bzw. bei WT
 >, \geq Expression in MEM bzw. bei $\Delta prfA$ stärker als in BHI bzw. bei WT

Expression der Virulenzclustergene mit und ohne "MEM-Shift"

Zum Abschluss der RT-PCR-Untersuchungen *in vitro* wurden auch die Virulenzclustergene (Abb. 5.53, Tab. 5.24) sowie die Gene *iap* und *smcL* mit und ohne "MEM-Shift" untersucht (Abb. 5.54, Tab. 5.25).

Als cDNA-Verdünnung und *sod*-Konzentrationen wurden die gleichen Mengen wie in den vorangegangenen Versuchen eingesetzt.

Für das *prfA*-Gen erhält man in der *prfA*-Deletionsmutante kein Transkript, da dieser Bereich deletiert ist und somit nicht exprimiert werden kann. Im Wildtyp aber findet eine starke *prfA*-Transkription statt, die interessanterweise in BHI-Medium stärker als in MEM ausfällt.

Auch *plcA* lässt keine mRNA in *L. ivanovii* $\Delta prfA$ erkennen. In Kap. 5.5.3 konnte mRNA für *plcA* allerdings noch schwach nachgewiesen werden. In *L. ivanovii* WT ist dagegen eine starke Expression zu sehen. Zudem findet eine Induktion der *plcA*-Transkription durch "MEM-Shift" statt.

In *ilo* kann man sowohl in der Deletionsmutante als auch im Wildtyp mRNA detektieren. In *L. ivanovii* $\Delta prfA$ findet eine schwache, in *L. ivanovii* WT eine starke Transkription des *ilo*-Gens statt. Allerdings kann man bei *ilo* keine Induktion der Genexpression durch "MEM-Shift" erkennen.

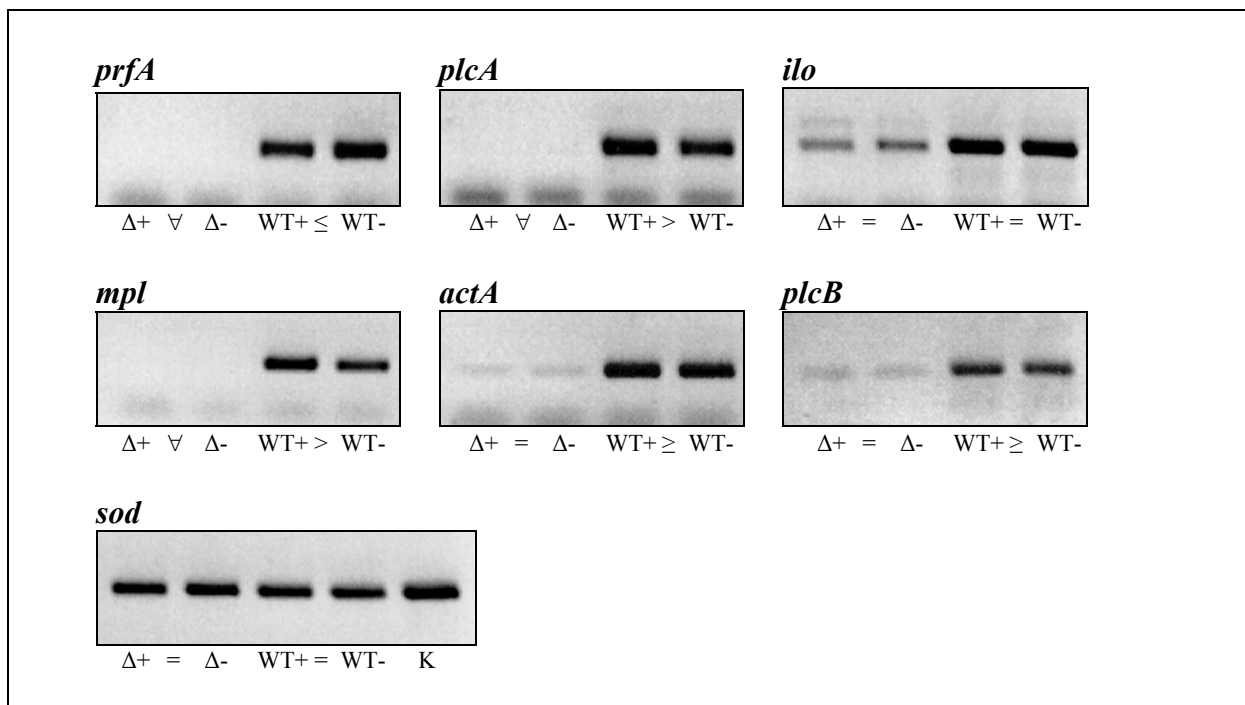


Abb. 5.53: Expression der Virulenzclustergene mit und ohne "MEM-Shift"

Δ : *L. ivanovii* PDC22, *prfA*-Deletionsmutante; WT: *L. ivanovii* ATCC19119

K: Kontrolle mit chromosomaler DNA *L. ivanovii* ATCC19119

+ Expression nach Kultur in Zellkulturmedium MEM, d.h. nach "MEM-Shift"

- Transkription nach Kultur in Vollmedium BHI, d.h. ohne "MEM-Shift"

<, > deutlicher Expressionsunterschied; \leq , \geq geringe Abweichung in der Stärke der Transkription

= gleich starke Expression; ∇ : keine Expression detektierbar

<, \leq Transkription in MEM schwächer als in BHI; >, \geq Expression in MEM stärker als in BHI

Für *mpl* erhält man das gleiche Transkriptionsmuster wie bei *plcA*. In der $\Delta prfA$ -Mutante ist keine mRNA nachweisbar. Auch für dieses Gen konnte in Kap. 5.5.3 eine geringe Expression gezeigt werden. Im Wildtyp aber sieht man eine starke Expression und findet auch hier eine Induktion der *mpl*-Transkription durch Überführen der Bakterien in das Zellkulturmedium MEM.

actA und *plcB* schließlich werden ähnlich exprimiert. Für beide Gene findet man in der Deletionsmutante geringe Mengen an mRNA. In *L. ivanovii* WT kann man eine starke Transkription der beiden Gene nachweisen und es zeigt sich wie schon bei *plcA* und *mpl*, dass diese beiden Gene durch Shift in MEM stärker exprimiert werden.

Bei den Virulenzclustergenen zeigt sich die PrfA-Abhängigkeit am deutlichsten (Tab. 5.24). Alle Gene weisen in *L. ivanovii* WT eine deutlich stärkere Expression auf als in der *prfA*-Mutante. In der Deletionsmutante sind nur sehr geringe mRNA-Mengen zu detektieren und die Transkription der Gene ist teilweise nicht nachweisbar.

Im Gegensatz dazu findet man im Wildtyp eine starke Expression. Zudem sieht man bei *plcA*, *mpl*, *actA* und *plcB* eine deutliche Induktion der Transkription nach Wachstum der Bakterien in Zellkulturmedium. Abweichend sind *ilo* und *prfA*. Für *ilo* kann man in BHI und MEM keine unterschiedliche Expression feststellen, für *prfA* findet man ohne "MEM-Shift" sogar mehr Transkript.

Gen	<i>L. ivanovii</i> $\Delta prfA$ +MEM / -MEM	<i>L. ivanovii</i> WT +MEM / -MEM	Expression $\Delta prfA$ - WT
<i>prfA</i>	∇	≤	<
<i>plcA</i>	∇	>	<
<i>ilo</i>	=	=	<
<i>mpl</i>	∇	>	<
<i>actA</i>	=	≥	<
<i>plcB</i>	=	≥	<
<i>sod</i>	=	=	=

Tab. 5.24: Transkription der Virulenzclustergene mit und ohne "MEM-Shift"

+MEM: Expression nach Kultur in Zellkulturmedium MEM (mit "MEM-Shift")

-MEM: Transkription nach Kultur in Vollmedium BHI (ohne "MEM-Shift")

∇ keine Expression detektierbar

= gleich starke Expression

<, ≤ Transkription in MEM bzw. bei $\Delta prfA$ schwächer als in BHI bzw. bei WT

>, ≥ Expression in MEM bzw. bei $\Delta prfA$ stärker als in BHI bzw. bei WT

Abschließend wurden die Gene *iap* und *smcL* untersucht (Abb. 5.54, Tab. 5.25).

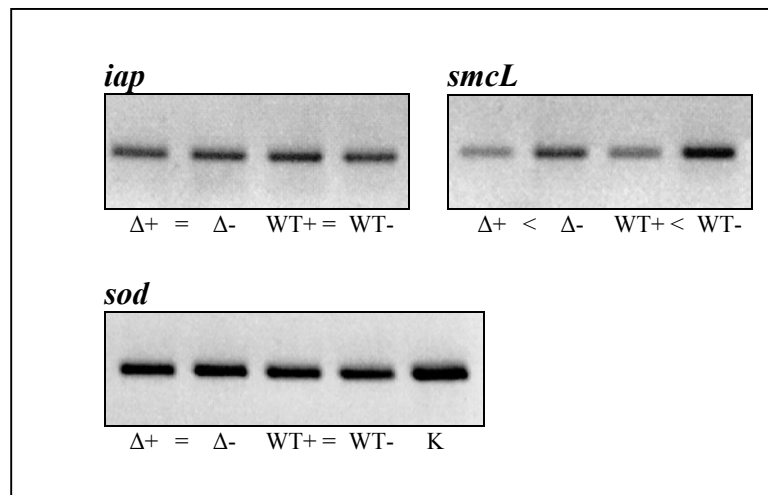


Abb. 5.54: Transkription von *iap* und *smcL* mit und ohne "MEM-Shift"

Δ : *L. ivanovii* PDC22, *prfA*-Deletionsmutante; WT: *L. ivanovii* ATCC19119
 K: Kontrolle mit chromosomaler DNA *L. ivanovii* ATCC19119
 + Expression nach Kultur in Zellkulturmedium MEM, d.h. nach "MEM-Shift"
 - Transkription nach Kultur in Vollmedium BHI, d.h. ohne "MEM-Shift"
 = gleich starke Expression; < Transkription in MEM schwächer als in BHI

Für *iap* findet man wie schon in Kap. 5.5.3 keinen Expressionsunterschied. Man kann in *L. ivanovii* Wildtyp und der Δ *prfA*-Mutante eine gleich starke Transkription erkennen. Auch nach Wachstum der Bakterien in MEM ändert sich die Menge an mRNA nicht und es ist somit keine Induktion der Genexpression durch das Zellkulturmedium feststellbar.

Ebenso wie *iap* wird auch das Gen für die in LIPI-2 liegende Sphingomyelinase *smcL* im Wildtyp und in der Deletionsmutante gleich stark transkribiert. Allerdings sieht man hier bei beiden einen deutlichen Expressionsunterschied, wenn man die mRNA-Mengen mit und ohne "MEM-Shift" vergleicht. Nach Überführen der Bakterien in das Zellkulturmedium MEM ist deutlich weniger mRNA auf dem Agarosegel zu erkennen, d.h. ein "MEM-Shift" scheint die Transkription des *smcL*-Gens zu reprimieren und nicht zu induzieren.

Gen	<i>L. ivanovii</i> Δ <i>prfA</i> +MEM / -MEM	<i>L. ivanovii</i> WT +MEM / -MEM	Expression Δ <i>prfA</i> - WT
<i>iap</i>	=	=	=
<i>smcL</i>	<	<	=
<i>sod</i>	=	=	=

Tab. 5.25: Expression von *iap* und *smcL* mit und ohne "MEM-Shift"

+MEM: Expression nach Kultur in Zellkulturmedium MEM (mit "MEM-Shift")
 -MEM: Transkription nach Kultur in Vollmedium BHI (ohne "MEM-Shift")
 = gleich starke Expression
 < Transkription in MEM bzw. bei Δ *prfA* schwächer als in BHI bzw. bei WT

5.5.5 Vergleich der Transkription verschiedener Gene von *L. ivanovii* nach Infektion der Zelllinien MDBK, J774 und TIB-73

Da Kap. 5.5.3 und Kap. 5.5.4 die Genexpression von *L. ivanovii* nur *in vitro* untersucht wurde, lassen sich nur bedingt Aussagen über die Transkription und deren Regulation machen. Mit den untersuchten Kulturbedingungen (20°C/37°C, Voll-/Zellkulturmedium) sollten zwar einige Eigenschaften einer *L. ivanovii*-Infektion "simuliert" werden (37°C Körpertemperatur im infizierten Wirt im Vergleich zu 20°C in der Natur, Nährstoffmangel in den infizierten Zellen), jedoch lassen diese Bedingungen nur beschränkt Vergleiche mit den natürlichen Wachstums- bzw. Infektionsbedingungen von *L. ivanovii* zu.

Deshalb sollte abschließend die Transkription der LIPI-2-Internalingene, der flankierenden Open Reading Frames und der Virulenzclustergene nach Infektion verschiedener permanenter Zelllinien untersucht werden, um genauere Aussagen über die Expression *in vivo* machen zu können.

Infektion der Zelllinie MDBK mit *L. ivanovii* ATCC19119 und *L. ivanovii* PDC22

Da Wiederkäuer der natürliche Wirt von *L. ivanovii* sind, wurde zunächst die permanente Zelllinie MDBK untersucht, bei der es sich um Epithelzellen aus dem Rind handelt.

Man ließ die MDBK-Zellen in Zellkulturflaschen wachsen, bis sie zu 70% konfluent waren, und setzte dann für die Infektion eine MOI von 50 ein. Die Zeit der Initialinfektion betrug 45 Minuten, die gesamte Infektion dauerte fünf Stunden (Kap. 4.2.4).

Für die Infektion wurden wieder *L. ivanovii* ATCC19119 und *L. ivanovii* PDC22 ($\Delta prfA$) eingesetzt. Interessanterweise fand man nach Ende der Infektion sowohl beim Wildtyp als auch bei der Mutante, für die man ein schlechteres intrazelluläres Überleben aufgrund des Verbleibs im Phagosom erwartet hätte, vergleichbare Zellzahlen an Bakterien in den infizierten MDBK-Zellen (Zellzahl/infizierte Flasche: WT $3,1 \times 10^6$, $\Delta prfA$ $2,4 \times 10^6$).

Die Isolierung der Gesamt-RNA erfolgte anschließend mit dem RNA-FastPrep und einem RNA-Isolierungskit (Kap. 4.2.5).

Betrachtet man die Expression der Virulenzclustergene, so findet man bei den PrfA-abhängig transkribierten Genen in der $\Delta prfA$ -Mutante bis auf *ilo* kein Produkt in der RT-PCR (Abb. 5.55). Selbst bei *ilo*, das in den *in vitro*-Versuchen (Kap. 5.5.3, Kap. 5.5.4) auch in der Deletionsmutante stark exprimiert wurde, kann man nur eine geringe Menge an mRNA detektieren.

Beim Wildtyp hingegen kann man bei allen Genen Transkription erkennen, die bei *plcA* und *ilo* sogar sehr stark ausfällt.

Im Gegensatz dazu sieht man bei den PrfA-unabhängig exprimierten Genen *iap*, *smcL* und *sod* eine gleichmäßige Transkription und es ist auch in der $\Delta prfA$ -Mutante mRNA nachweisbar.

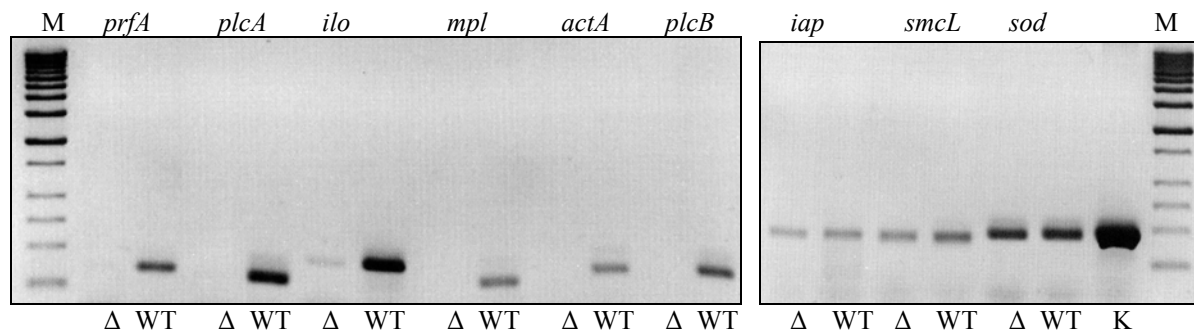


Abb. 5.55: Transkription der Virulenzclustergene nach Infektion der Zelllinie MDBK

M: Marker (Stratagene)

Δ: *L. ivanovii* PDC22, *prfA*-Deletionsmutante; WT: *L. ivanovii* ATCC19119

K: Kontrolle mit chromosomaler DNA *L. ivanovii* ATCC19119

Die nicht nachweisbare Expression der meisten Virulenzclustergene in der Deletionsmutante bedeutet jedoch nicht zwangsläufig, dass diese Gene nach Infektion der MDBK-Zellen gar nicht exprimiert werden. Denn die *in vitro*-Experimente (Kap. 5.5.3, Kap. 5.5.4) haben gezeigt, dass trotz Deletion von *prfA* eine schwache Expression dieser Gene möglich ist. Deshalb ist die fehlende Transkription wahrscheinlich auf die Methode der RT-PCR zurückzuführen. Bei den Infektionsversuchen war es nicht möglich, nur bakterielle RNA zu isolieren. So erhielt man ein Gemisch aus RNA der eukaryotischen MDBK-Zellen und der sie infizierenden Listerien. Eine Analyse der isolierten RNA auf dem Agarosegel zeigte, dass nur sehr wenig bakterielle RNA in den RNA-Präparationen erkennbar war. Aus diesem Grund wurde eine größere Menge für die cDNA-Synthese eingesetzt. Dies reichte aber nicht aus, um in der *prfA*-Mutante eine Expression bei den schwach transkribierten Genen nachweisen zu können. Somit stößt die Methode der RT-PCR in diesem Bereich an ihre Grenzen und es müssten neue RNA-Isolierungsmethoden überprüft werden, um ein besseres Ergebnis in der RT-PCR erzielen zu können.

Auch bei der Untersuchung der Internalingene und der Open Reading Frames konnte keine Expression nachgewiesen werden. Deshalb ist nur die Transkription von *L. ivanovii* Wildtyp dargestellt (Abb. 5.56, Abb. 5.57).

Bei den Internalingenen (Abb. 5.56) kann man bis auf *i-inlH* bei allen Genen mRNA nachweisen. Für *i-inlK*, *i-inlG*, *i-inlF*, *i-inlE*, *i-inlC* und *i-inlD* erhält man sogar eine starke Expression. *i-inlE* wird wie schon in den *in vitro*-Experimenten (Kap. 5.5.3, Kap. 5.5.4) am stärksten transkribiert. Zudem taucht auch hier eine zusätzliche kleinere Bande in der RT-PCR auf.

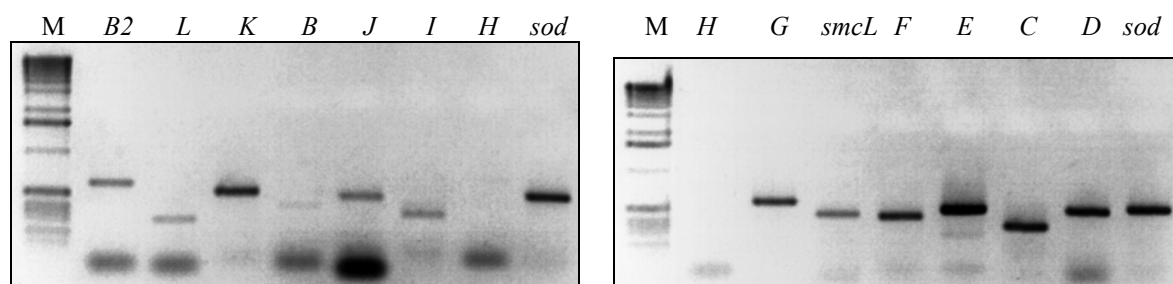


Abb. 5.56: Expression der Internalingene nach Infektion der Zelllinie MDBK

M: Marker (Gibco BRL)

Betrachtet man die zu LIPI-2 benachbarten Open Reading Frames (Abb. 5.57), so kann man in *L. ivanovii* WT insgesamt nur eine schwache Expression der Gene erkennen.

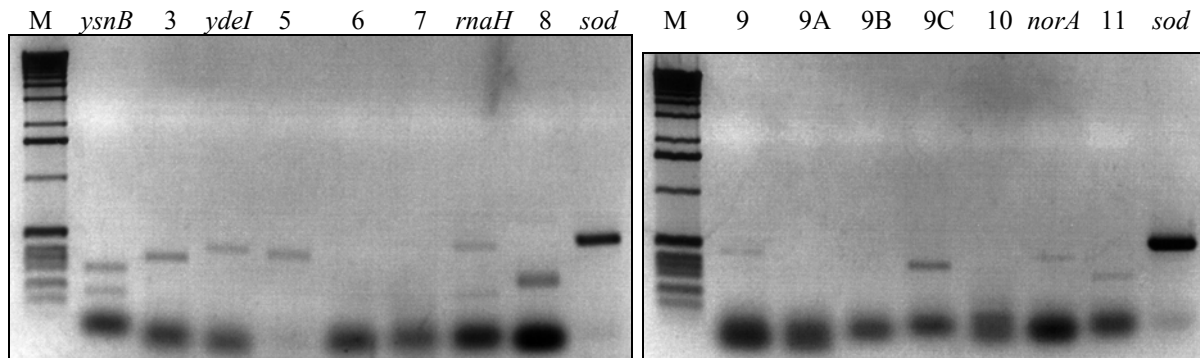


Abb. 5.57: Transkription der zu LIPI-2 benachbarten ORFs nach Infektion der Zelllinie MDBK
M: Marker (Gibco BRL)

Für die Gene *ysnB*, ORF3, *ydeI*, ORF5, *rnaH*, ORF9, ORF9C, *norA* und ORF11 erhält man nur wenig Transkript in der RT-PCR. Nur ORF8, das auch in den *in vitro*-Untersuchungen eine starke Expression zeigte, wird etwas stärker transkribiert.

Im Gegensatz dazu ist die Expression der Gene für ORF6, ORF7, ORF9A, ORF9B und ORF10 nicht nachweisbar.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass von allen untersuchten Genen die Virulenzclustergene bei einer Infektion der Zelllinie MDBK mit *L. ivanovii* WT am stärksten transkribiert werden. Dies ist auch nicht verwunderlich, da für diese Gene schon bekannt ist, dass sie essentiell für eine erfolgreiche Infektion sind.

Aber auch die Internalingene werden zum Teil stark exprimiert und sind alle bis auf *i-inlH* nach Infektion der MDBK-Zellen nachweisbar. Somit ist es möglich, dass auch diese Gene für eine Infektion benötigt werden. Denn für einige der kleinen Internaline (*i-inlE* und *i-inlF*) konnte schon gezeigt werden, dass sie Virulenz-assoziiert sind.

Am geringsten fällt die Transkription der Open Reading Frames aus. Für einige dieser Gene kann keine mRNA mittels RT-PCR nachgewiesen werden. Bei den meisten dieser Gene ist zudem bis jetzt noch nicht geklärt, welche Funktion sie besitzen. Somit scheint es sich hier um Gene zu handeln, die nicht an der Virulenz beteiligt sind und die nicht für eine Infektion benötigt werden.

Infektion der Zelllinie J774 mit *L. ivanovii* ATCC19119

Als zweites wurde die Expression der *L. ivanovii*-Gene nach Infektion der Zelllinie J774 untersucht. Bei dieser permanenten Zelllinie handelt es sich um Makrophagen der Maus.

Die Zellen wurden mit einer MOI von 10 und einer Infektionsdauer von fünf Stunden infiziert (Kap. 4.2.4).

Für die Infektionen wurden *L. ivanovii* WT und $\Delta prfA$ eingesetzt. Nach Bestimmung der Zellzahlen stellte sich heraus, dass der Wildtyp ein etwas besseres Überleben bzw. Vermehrung bei Infektion der Makrophagen zeigte (Zellzahl/infizierte Flasche: WT 8×10^6 , $\Delta prfA$ 4×10^6). Die Abweichungen der Zellzahlen wurden durch Anpassung der RNA-Mengen in der RT-PCR berücksichtigt.

Allerdings konnte ähnlich wie bei der Infektion der MDBK-Zellen nur beim Wildtyp mRNA mittels RT-PCR nachgewiesen werden. Einzige Ausnahme waren die Gene *iap*, *smcL* und *sod*, für die man in *L. ivanovii* WT und $\Delta prfA$ eine gleich starke Transkription sieht. Nachfolgend sind allerdings nur die Ergebnisse von *L. ivanovii* WT gezeigt.

Untersuchungen des Virulenzgenclusters zeigten, dass alle Gene in der Zelllinie J774 exprimiert werden (Abb. 5.58). Auch für *mpl*, das hier nicht gezeigt ist, lässt sich eine schwache Transkription nachweisen. Insgesamt findet man aber für alle Gene einschließlich *sod* eine schwächere Expression als in den MDBK-Zellen. Dies könnte an der niedrigeren Zahl an Bakterien liegen, die in den Infektionsversuchen mit J774 eingesetzt wurde. Allerdings erhält man bei Bestimmung der Lebendzellzahl nach Infektionsende bei MDBK und J774 vergleichbare Werte.

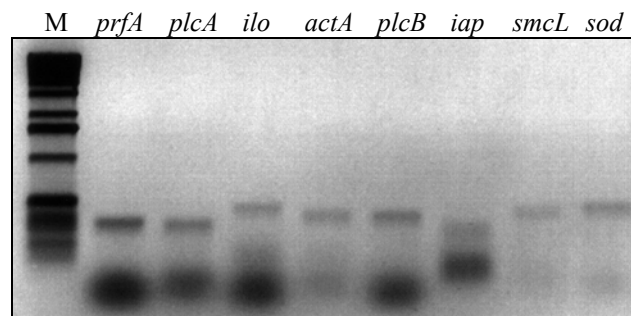


Abb. 5.58: Expression der Virulenzclustergene nach Infektion der Zelllinie J774
M: Marker (Gibco BRL)

Auch für die Internalingene fällt die Transkription schwächer als bei der MDBK-Infektion aus (Abb. 5.59). So lassen sich diesmal nicht alle Gene nachweisen. Für *i-inlB*, *i-inlI* und *i-inlH* kann man keine mRNA detektieren. Diese Gene wurden schon in der MDBK-Infektion schwach (*i-inlB*, *i-inlI*) bzw. gar nicht (*i-inlH*) exprimiert. Zudem erhält man diesmal nicht nur für *i-inlE* eine zusätzliche Bande, sondern kann auch bei *i-inlF* und *sod* eine Doppelbande erkennen.

Die Internalingene, die in den MDBK-Zellen schon stärker exprimiert wurden, zeigen auch bei Infektion von J774 die größten Mengen an mRNA. So findet man vor allem bei *i-inlE* eine starke Transkription des Gens.

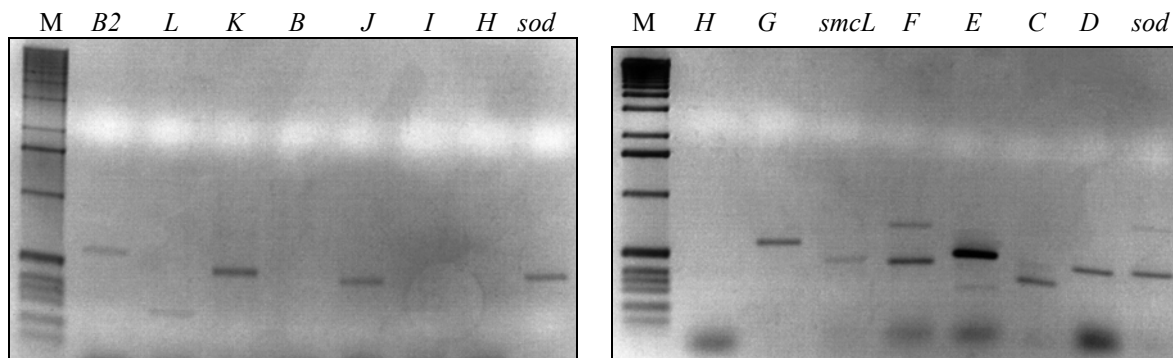


Abb. 5.59: Transkription der Internalingene nach Infektion der Zelllinie J774
M: Marker (Gibco BRL)

Bei den Open Reading Frames schließlich lassen sich nur bei wenigen der untersuchten Gene Transkripte nachweisen (Abb. 5.60). So findet man nur für *ysnB*, ORF6 und ORF9C schwache Banden auf dem Agarosegel. Bei allen anderen Genen ist keine Expression detektierbar.

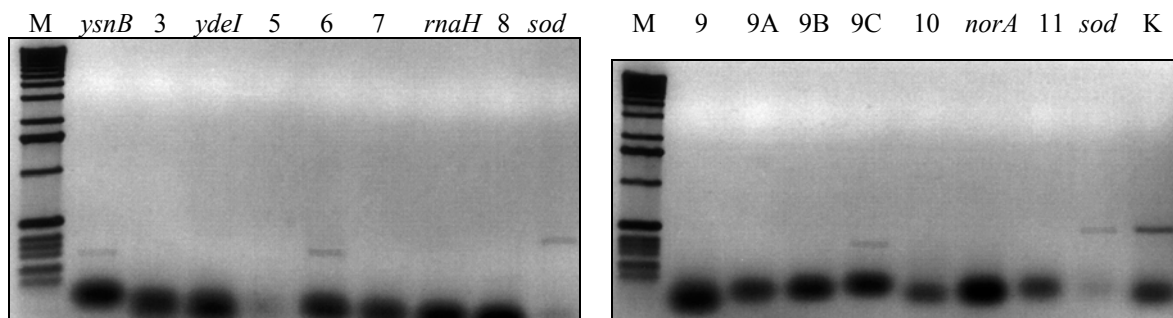


Abb. 5.60: Expression der zu LIPI-2 benachbarten ORFs nach Infektion der Zelllinie J774
M: Marker (Gibco BRL)
K: Kontrolle mit chromosomaler DNA von *L. ivanovii* ATCC19119

Bei allen untersuchten Genen kann man nach Infektion der Zelllinie J774 nur eine schwache Expression erkennen. Selbst die sonst stark transkribierten Virulenzclustergene sind in *L. ivanovii* WT nur schwach nachweisbar. Ähnliches zeigt sich für die Internalingene und Open Reading Frames. Da jedoch auch die *sod*-Expression in diesen Versuchen im Vergleich zu den MDBK-Infektionen sehr gering war, ist der schwächere bzw. fehlende Nachweis vieler Gene vermutlich auf geringere mRNA-Mengen bei der cDNA-Synthese zurückzuführen.

Infektion der Zelllinie TIB-73 mit *L. ivanovii* ATCC19119

Als letzte Zelllinie wurden die Hepatozyten TIB-73 analysiert. Bei dieser permanenten Zelllinie handelt es sich um embryonale Zellen der Maus.

Die Zellen wurden mit einer MOI von 10 und einer Infektionsdauer von fünf Stunden infiziert (Kap. 4.2.4).

Für die Infektionen wurde nur *L. ivanovii* WT eingesetzt, da sich schon bei diesem Probleme beim Nachweis der mRNA zeigten. Zudem fand man intrazellulär deutlich niedrigere Bakterienzahlen (Zellzahl/infizierte Flasche: WT $6,8 \times 10^4$) als bei den beiden zuvor untersuchten Zelllinien MDBK und J774 vor.

Bei TIB-73 erhält man im allgemeinen noch schlechtere Ergebnisse in den RT-PCRs. Selbst bei den Virulenzclustergenen ist nur bei wenigen deren Expression nachweisbar (Abb. 5.61). Nur für *plcA*, *ilo*, *mpl* und *iap* erhält man schwache Banden auf dem Agarosegel. Allerdings finden sich hier häufig mehrere, vermutlich unspezifische Nebenbanden. Diese sind wahrscheinlich durch die große Menge an eukaryotischer RNA im Ansatz für die reverse Transkription entstanden. Es konnte auch bei den anderen Zelllinien wiederholt beobachtet werden, dass bei Einsatz zu großer Mengen von RNA in der reversen Transkription gehäuft unspezifische Nebenbanden in der nachfolgenden PCR mit cDNA auftraten.

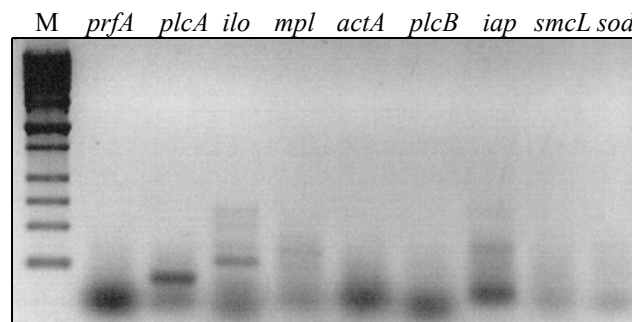


Abb. 5.61: Transkription der Virulenzclustergene nach Infektion der Zelllinie TIB-73
M: Marker (Stratagene)

Die Transkription der Internalingene (Abb. 5.62) konnte interessanterweise deutlich besser nachgewiesen werden als die der Virulenzclustergene, obwohl für die reverse Transkription RNA aus der gleichen Infektion und in gleicher Menge eingesetzt wurde.

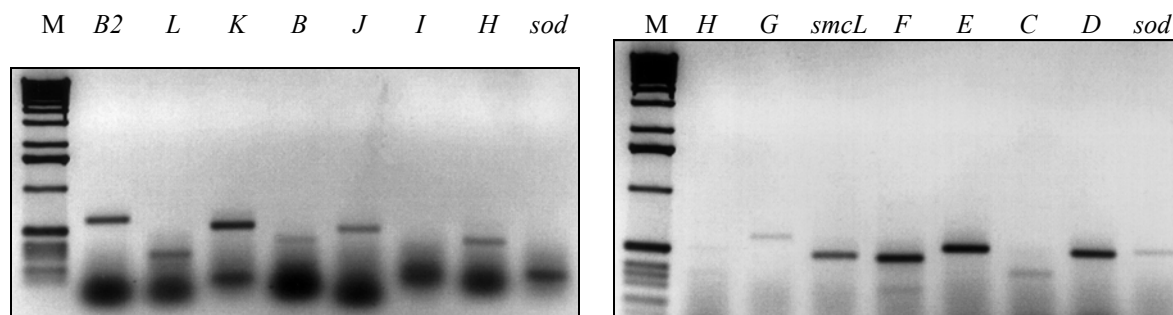


Abb. 5.62: Expression der Internalingene nach Infektion der Zelllinie TIB-73
M: Marker (Gibco BRL)

Es lässt sich für alle Gene mRNA nachweisen. Bei *i-inlI* und *i-inlH* erhält man allerdings nur sehr schwache Banden. *i-inlK*, *i-inlF*, *i-inlE* und *i-inlD* werden wie schon in den anderen Zelllinien am stärksten exprimiert.

Abschließend ist die Expression der zu LIPI-2 benachbarten ORFs dargestellt (Abb. 5.63). Bei diesen findet man ein ähnliches Bild wie schon in den J774-Infektionen. Die Transkription dieser Gene ist – wenn überhaupt – nur sehr schwach nachweisbar. Man kann nur für die Gene ORF5, ORF7, *rnaH* und ORF8 schwache Banden auf dem Agarosegel erkennen.

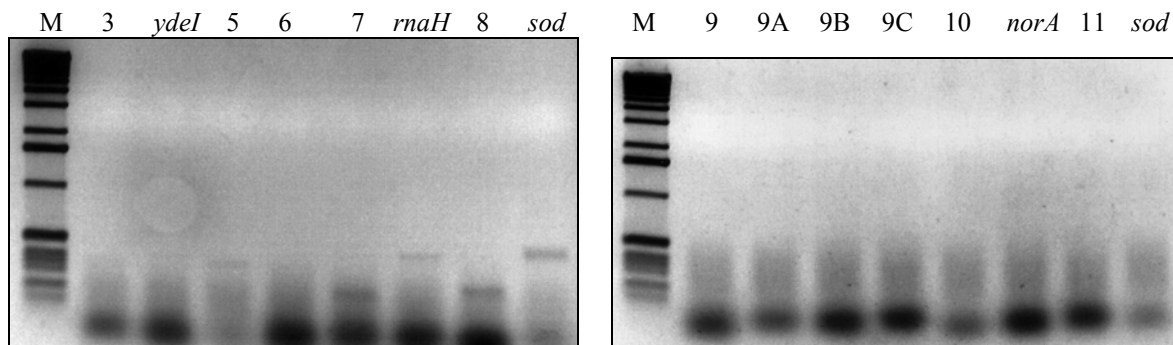


Abb. 5.63: Transkription der zu LIPI-2 benachbarten ORFs nach Infektion der Zelllinie TIB-73
M: Marker (Gibco BRL)

Somit konnte in den infizierten TIB-73-Zellen nur die Expression der Internalingene nachgewiesen werden. Diese werden bis auf Ausnahme von *i-inlI* und *i-inlH* deutlich transkribiert. Für die Virulenzclustergene und die Open Reading Frames erhielt man – aus welchen Gründen auch immer – nur sehr schwache Transkripte und konnte viele der untersuchten Gene nicht nachweisen.

Vergleicht man die Transkription in den einzelnen Zelllinien miteinander, so kann man sowohl bei MDBK als auch J774 die Expression aller Virulenzclustergene nachweisen (Tab. 5.26). Bei TIB-73 allerdings fehlen die Transkripte von *prfA*, *actA* und *plcB* und auch die Gene *mpl* und *iap* werden nur sehr schwach exprimiert.

Zelllinie	<i>prfA</i>	<i>plcA</i>	<i>ilo</i>	<i>mpl</i>	<i>actA</i>	<i>plcB</i>	<i>iap</i>	<i>smcL</i>	<i>sod</i>
MDBK	++	+++	+++	+	+	+	+	+	++
J774	++	+	+	+	+	+	+	+	+
TIB-73	-	+	+	(+)	-	-	(+)	-	-

Tab. 5.26: Vergleich der Expression der Virulenzclustergene nach Infektion verschiedener Zelllinien
- keine mRNA nachweisbar
+ Transkription des untersuchten Gens ist schwach (+) bis sehr stark +++

Bei den Internalingenen findet in allen drei Zelllinien eine starke Expression statt (Tab. 5.27). Zudem zeigt sich, dass die Gene *i-inlK*, *i-inlF*, *i-inlE* und *i-inlC* in allen Zelltypen am stärksten transkribiert werden. Gene, für die man nur wenig mRNA findet, werden meist auch in allen drei Zelllinien nur schwach exprimiert (*i-inlL*) oder sind teilweise nicht nachweisbar (*i-inlB*, *i-inlI*, *i-inlH*).

Zelllinie	B2	L	K	B	J	I	H	G	smcL	F	E	C	D	sod
MDBK	+	+	++	(+)	+	+	-	++	+	++	+++	++	++	++
J774	(+)	(+)	++	-	+	-	-	++	(+)	++	+++	++	++	++
TIB-73	++	+	+++	(+)	+	-	+	(+)	+	++	++	(+)	++	(+)

Tab. 5.27: Vergleich der Transkription der Internalingene nach Infektion verschiedener Zelllinien

- keine mRNA nachweisbar

+ Transkription des untersuchten Gens ist schwach (+) bis sehr stark +++

Die Open Reading Frames sind insgesamt am schlechtesten nachweisbar (Tab. 5.28). In der MDBK-Zelllinie erhält man noch für die meisten Gene Transkripte. Doch in J774 und TIB-73 werden die untersuchten ORFs nur sehr schwach exprimiert oder sind gar nicht detektierbar.

Zelllinie	ysnB	3	ydeI	5	6	7	rnaH	8	9	9A	9B	9C	10	norA	11	sod
MDBK	+	+	+	+	-	-	+	++	+	-	-	(+)	-	(+)	(+)	+++
J774	(+)	-	-	-	(+)	-	-	-	-	-	-	(+)	-	-	-	(+)
TIB-73	-	-	-	(+)	-	(+)	(+)	(+)	-	-	-	-	-	-	-	(+)

Tab. 5.28: Vergleich der Expression der zu LIPI-2 benachbarten ORFs nach Infektion verschiedener Zelllinien

- keine mRNA nachweisbar

+ Transkription des untersuchten Gens ist schwach (+) bis sehr stark +++

Zusammenfassend ist zu bemerken, dass die Methode der RT-PCR nur bedingt geeignet ist, um die Genexpression von *L. ivanovii* nach Infektion der hier untersuchten Zelllinien nachzuweisen.

Die besten Ergebnisse wurden in der Zelllinie MDBK erzielt. Hier konnten für alle drei untersuchten Bereiche Transkripte nachgewiesen werden.

Bei der Zelllinie J774 war insgesamt eine schwächere Expression zu sehen, doch auch hier findet sich die gleiche Tendenz der Transkriptionsstärke wie in den MDBK-Zellen. Gene, die nach MDBK-Infektion am stärksten exprimiert wurden, werden größtenteils auch nach J774-Infektion am stärksten transkribiert.

Die dritte Zelllinie TIB-73 zeigt für die Virulenzclustergene und die Open Reading Frames die schlechteste Transkription, die Expression der Internalingene konnte hier jedoch gut gezeigt werden.

Da die hier gezeigten Ergebnisse mit der Methode der RT-PCR in wiederholten Versuchsansätzen nur teilweise reproduzierbar waren, bleibt die Frage weiterhin ungeklärt, welche Rolle die untersuchten Gene in den einzelnen Zelllinien spielen könnten und es ist abzuwarten, welche Resultate sich aus anderen Versuchsansätzen ergeben.

5.6 Untersuchung der Deletionshäufigkeit von LIPI-1 und LIPI-2

In Zusammenarbeit mit G. Domínguez-Bernal (60) konnte die Deletionsmutante *L. ivanovii* GD-3 genauer charakterisiert werden. Neben dieser traten wie anfangs schon erwähnt mehrere Mutanten gleichen Typs auf. Somit handelt es sich in diesem Bereich um eine chromosomale Region, die genetisch instabil ist.

Genetische Instabilität ist ein Merkmal von Pathogenitätsinseln (110). Ein Teil der deletierten Region in *L. ivanovii* GD-3 besteht auch hier aus einer Pathogenitätsinsel (LIPI-2).

Deshalb sollte in *L. ivanovii* die Deletionsfrequenz dieses Bereiches unter verschiedenen Kulturbedingungen untersucht werden. Zusätzlich sollte überprüft werden, ob die Virulenzgencluster von *L. ivanovii* und *L. monocytogenes* (LIPI-1) eine ähnliche Instabilität bzw. Deletionshäufigkeit wie LIPI-2 aufweisen.

5.6.1 Entwicklung eines positiven Selektionsverfahrens

Da die Deletionsereignisse von Pathogenitätsinseln unter Umständen jedoch sehr selten sind, musste ein positives Selektionsverfahren entwickelt werden, um sie dennoch experimentell erfassen zu können (Abb. 5.64):

Im ersten Schritt wurde das Chloramphenicol-Resistenzgen des *S. aureus*-Plasmids pC194 unter Kontrolle des regulatorischen Bereichs von *tetA* aus Tn10 (8) gestellt. Dieses Konstrukt wurde mit kurzen flankierenden Sequenzen aus dem *purH*-Gen von *Listeria* versehen, in einen Shuttle-Vektor mit temperatursensitivem Replikon eingefügt und über homologe Rekombination (Kap. 4.1.18) in den *purH*-Locus von *Listeria* inseriert. Dieses Verfahren ist vielfach erprobt. Zudem konnte gezeigt werden, dass eine Insertion an diesem Genort keine Auswirkungen auf die Vermehrung von *Listeria* hat, weder *in vitro* noch intrazellulär (73, 136).

In einem weiteren Schritt mit analoger Verfahrensweise wurde dann ein Konstrukt aus einem nicht-induzierbaren Tn10-Repressor (113) mit geeigneten Expressionssignalen und dem Kanamycin-Resistenzgen (*aph3*) aus Tn1545 (46) in den gewünschten Genombereich (Virulenzgencluster bzw. LIPI-2) inseriert.

Danach sollte dann das Cm-Resistenzgen (Cm^R) unter negativer Kontrolle des *tet*-Repressors stehen und die Zellen wären also Chloramphenicol-sensitiv.

Nur wenn Deletion des Chromosomenbereichs erfolgt, der *tetR*/Km^R enthält, könnte das in *purH* inserierte Cm^R-Gen exprimiert werden, d.h. diese Bakterien könnten auf Cm-haltigen Medien selektioniert werden.

Mögliche *tet*-Repressor-Mutationen, die ebenfalls zu einem Cm^R-Phänotyp ohne Deletion führen würden, sollten durch die Kopplung mit dem Km^R-Gen ausgeschlossen werden.

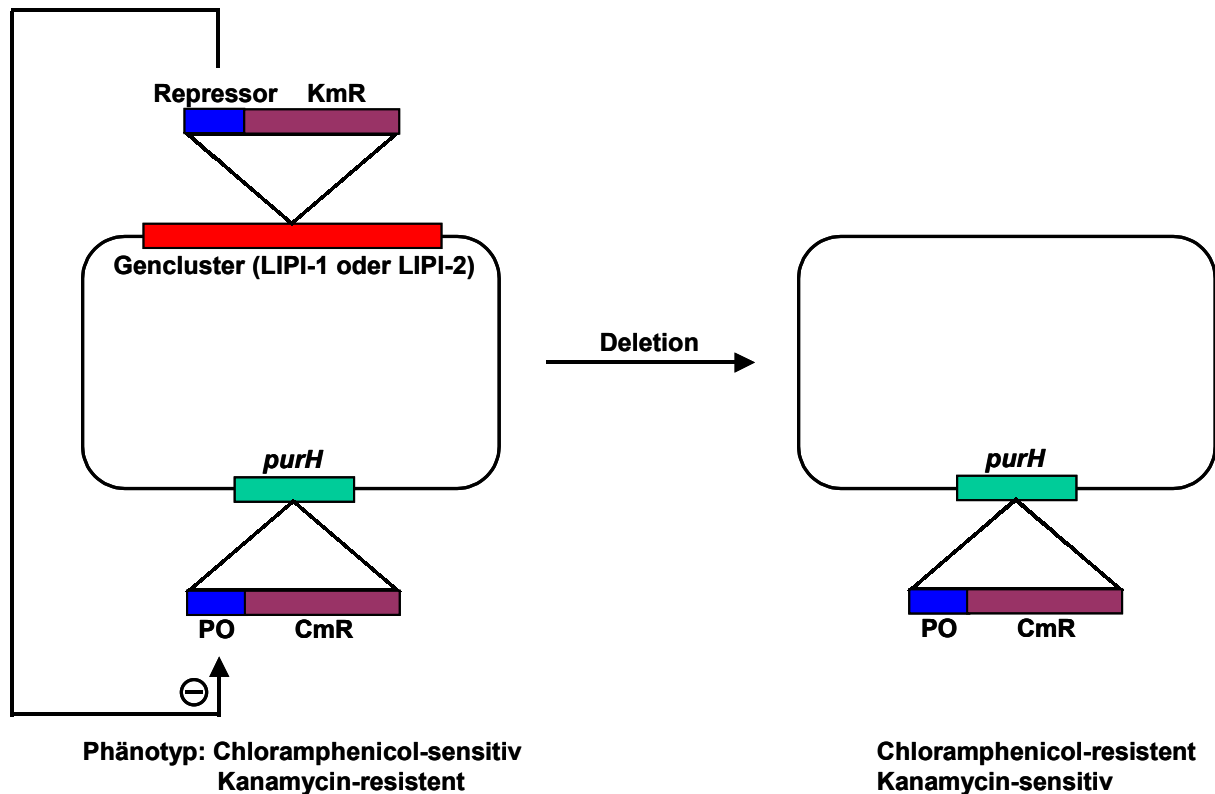


Abb. 5.64: Positives Selektionssystem zum Nachweis der Deletion von LIPI-1 bzw. LIPI-2

LIPI-1: Virulenzgencluster von *L. monocytogenes* bzw. *L. ivanovii*

LIPI-2: *Listeria ivanovii* Pathogenitätsinsel 2

KmR: Kanamycin-Resistenzgen (*aph3* aus Tn1545)

CmR: Chloramphenicol-Resistenzgen (aus pC194 von *S. aureus*)

Repressor: Tn10-Repressor (*tetR*); PO: regulatorischer Bereich von *tetA* aus Tn10

5.6.2 Herstellung der Insertionsplasmide

Für *L. monocytogenes* wurden zwei Plasmide (pWHLmpurH/xyltet-cat und pWHhly/TetR/ Ω Km) hergestellt, um eine mögliche Deletion des Virulenzgenclusters untersuchen zu können (Abb. 5.65, Tab. 5.29). Als Ausgangsplasmid wurden die Mutagenesevektoren pWH1509K und pWH1509E (freundlicherweise von W. Hillen zur Verfügung gestellt, [115]) verwendet. Diese besitzen neben ori pBR322 einen temperatursensitiven Origin aus pE194 und verschiedene Antibiotikum-Resistenzgene und ermöglichen somit eine Integration der gewünschten Gene ins Listerielle Genom.

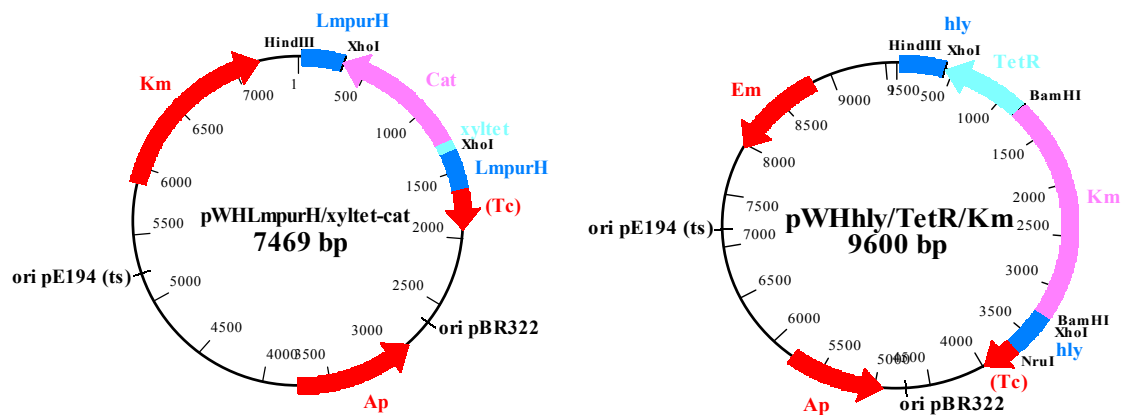


Abb. 5.65: Für *L. monocytogenes* konstruierte Insertionsplasmide

Für *L. ivanovii* wurden drei Plasmide (pWHLipurH/xyltet-cat, pWHilo/tetR/ Ω Km, pWHsmcL/tetR/ Ω Km) konstruiert, um die Deletionsfrequenz des Virulenzgenclusters (LIPI-1) sowie der neu identifizierten Pathogenitätsinsel (LIPI-2) analysieren zu können (Abb. 5.66, Tab. 5.30). Auch hier dient die pWH-Vektoren als Ausgangsplasmide.

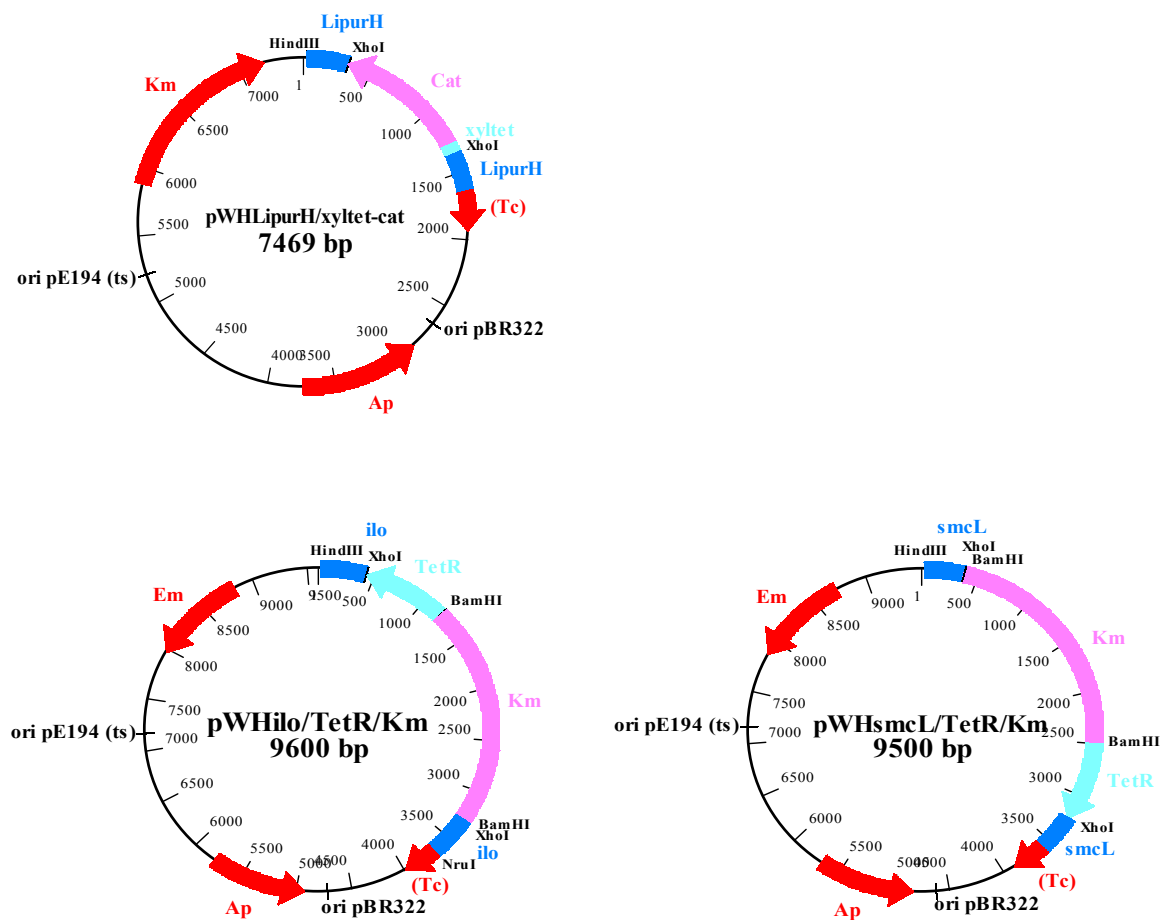


Abb. 5.66: Für *L. ivanovii* konstruierte Insertionsplasmide

Plasmid/Konstrukt	Größe	AB-Resistenzen	Sonstige Gene	Herkunft
pWH1509E	6885 bp	Em ^R , Tc ^R , Amp ^R	ori pBR322, ori pE194 (ts)	W. Hillen (115)
pWH1509K	6811 bp	Km ^R , Tc ^R , Amp ^R	ori pBR322, ori pE194 (ts)	W. Hillen (115)
pWHLmpurH/xyltet-cat	7469 bp	Cm ^R , Km ^R , Amp ^R	<i>LmpurH</i> , Promotor/Operator <i>xyl/tet</i> (vor <i>cat</i> -Gen)	pWH1509K, S. Altrock
pWHLipurH/xyltet-cat	7444 bp	Cm ^R , Km ^R , Amp ^R	<i>LipurH</i> , Promotor/Operator <i>xyl/tet</i> (vor <i>cat</i> -Gen)	pWH1509K, S. Altrock
pWHhly/TetR/ΩKm	9600 bp	Km ^R , Em ^R , Amp ^R	<i>hly</i> , <i>tetR</i>	pWH1509E, S. Altrock
pWHilo/TetR/ΩKm	9600 bp	Km ^R , Em ^R , Amp ^R	<i>ilo</i> , <i>tetR</i>	pWH1509E, S. Altrock
pWHsmcL/TetR/ΩKm	9500 bp	Km ^R , Em ^R , Amp ^R	<i>smcL</i> , <i>tetR</i>	pWH1509E, S. Altrock

Tab. 5.29: Übersicht über die pWH-Konstrukte

Amp^R: Ampicillin-Resistenz Cm^R: Chloramphenicol-Resistenz Em^R: Erythromycin-Resistenz
 Km^R: Kanamycin-Resistenz Tc^R: Tetracyclin-Resistenz

Bei der Integration der oben gezeigten Plasmide gab es jedoch Probleme und es erfolgte erst nach zahlreichen Versuchsansätzen die korrekte Integration des ersten Insertionsplasmids (pWHpurH/xyltet-cat) in das listerielle Genom. Allerdings zeigten sich die so hergestellten Listerien stark resistent gegenüber dem Antibiotikum Chloramphenicol.

Diese Resistenz konnte auch durch Einbringen des zweiten Plasmids mit dem *tetR*-Repressor nicht verringert werden.

Somit ist fraglich, ob das ausgewählte System, das in *B. subtilis* gut funktioniert, in *Listeria* eventuell versagt oder die fehlende Repression durch die schlecht funktionierende Integration der Insertionsplasmide und eine eventuell dadurch verursachte Mutation in den regulatorischen Bereichen zustande gekommen ist. Nach Sequenzierung der Insertionsplasmide konnte zudem für pWHhly/TetR/ΩKm gezeigt werden, dass sich im *tetR*-Gen ein Basenaustausch befindet, der zu einem vorzeitigen Stopcodon und dadurch verkürztem TetR-Protein führt. Die überprüften Sequenzen der anderen beiden Plasmide pWHilo/TetR/ΩKm und pWHhly/TetR/ΩKm, sowie der pWHpurH-Plasmide stimmten jedoch mit den Ausgangssequenzen überein, zeigten allerdings trotz korrekter Sequenz ebenso keine Repression.

Deshalb wurden begonnen, neue Insertionsplasmide mit pG⁺host4 (E. Maguin [176, 177]) als Ausgangsplasmid herzustellen. Diese wurden für die Konstruktion von Deletionsmutanten erfolgreich in *Listeria* eingesetzt (114). Hier sollte zum einen nochmals das oben beschriebene Repressorsystem inseriert werden, zum anderen sollte ein neues Repressorsystem (Xylose-induzierbarer Repressor XylR aus *B. subtilis* [135]) getestet werden.

Bisher konnten jedoch nur die Konstrukte für die Insertion in das *purH*-Gen fertiggestellt werden (Abb. 5.67, Tab. 5.30).

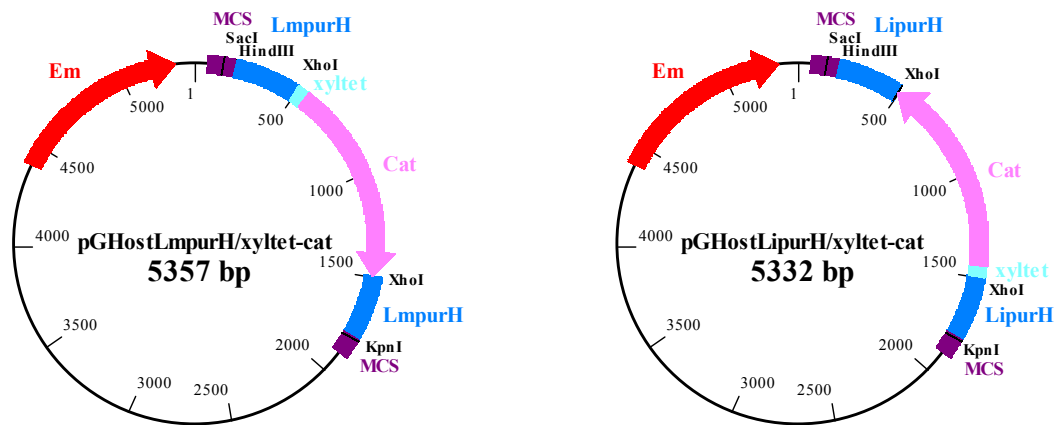


Abb. 5.67: Bisher fertiggestellte Insertionsplasmide mit dem Ausgangsplasmid pG⁺host4

Plasmid/Konstrukt	Größe	AB-Resistenzen	Sonstige Gene	Herkunft
pG ⁺ host4	3785 bp	Em ^R		E. Maguin (176, 177)
pGHostLmpurH/xyltet-cat	5357 bp	Cm ^R , Em ^R	<i>LmpurH</i> , Promotor/Operator <i>xyl/tet</i> (vor <i>cat</i> -Gen)	pG ⁺ host4, S. Altrock
pGHostLipurH/xyltet-cat	5332 bp	Cm ^R , Em ^R	<i>LipurH</i> , Promotor/Operator <i>xyl/tet</i> (vor <i>cat</i> -Gen)	pG ⁺ host4, S. Altrock
pGHosthly/TetR/ΩKm	7400 bp	Km ^R , Em ^R	<i>hly</i> , <i>tetR</i>	pG ⁺ host4, S. Altrock, S. Link
pGHostilo/TetR/ΩKm	7400 bp	Km ^R , Em ^R	<i>ilo</i> , <i>tetR</i>	pG ⁺ host4, S. Altrock, S. Link
pGHostsmcL/TetR/ΩKm	7300 bp	Km ^R , Em ^R	<i>smcL</i> , <i>tetR</i>	pG ⁺ host4, S. Altrock, S. Link

Tab. 5.30: Überblick über die pGHost-Konstrukte

Cm^R: Chloramphenicol-Resistenz Em^R: Erythromycin-Resistenz Km^R: Kanamycin-Resistenz

Stefanie Link wird nun im Rahmen ihrer Diplomarbeit die restlichen Plasmide fertig stellen und auf Funktionalität überprüfen.

Somit bleibt abzuwarten, ob das neu konzipierte positive Selektionssystem mit dem ausgewählten *tetR*-Repressor in *Listeria* funktioniert und hiermit die Deletionsfrequenz von LIPI-1 und LIPI-2 bestimmt werden kann.

6 Diskussion

Pathogenitätsinseln (PAIs) sind bei gram-negativen Bakterien weit verbreitet, wohingegen sie bisher für gram-positive Pathogene selten beschrieben wurden (21, 24, 170, 201). Sie zeichnen sich durch eine Reihe von charakteristischen Eigenschaften aus: PAIs tragen Virulenzgene und sind nur in pathogenen Stämmen einer Art vorhanden. Oft variiert der G+C-Gehalt im Vergleich zum restlichen Genom, was auf einen externen Ursprung hinweist. Zudem finden sich an den Enden dieser meist großen Regionen häufig Direct Repeats, tRNA-Gene und/oder Insertionselemente. Weitere Mobilitätsgene wie Integrasen und Transposasen oder auch Origins of Replication sind ebenfalls oft vorhanden. Ein weiteres wichtiges Merkmal ist eine häufige Instabilität dieser genetischen Regionen und es kann zu Verlust der Pathogenitätsinsel durch Deletion kommen (110, 111).

Das PrfA-abhängige Virulenzgencluster von *Listeria* spp. wird mittlerweile auch als Pathogenitätsinsel (LIPI-1) bezeichnet, da es eine kompakte Region aus mehreren Virulenzgenen darstellt, die in den apathogenen Arten nicht vorhanden ist. Allerdings weicht der G+C-Gehalt von LIPI-1 nicht vom restlichen Genom ab und es sind keine Mobilitätsgene zu finden. An den Enden finden sich allerdings Bereiche mit Homologie zu Tn1545-Integrationssequenzen (32). Dabei scheint es sich um einen stabilen Chromosomenabschnitt zu handeln, sofern er durch horizontalen Gentransfer von anderen Bakterien erworben wurde, muss dies lange zurückliegen (146, 148, 261).

Im Gegensatz dazu wurde in *L. ivanovii* eine chromosomale Region entdeckt, die spontan deletiert werden kann. Wie anfangs erwähnt, zeigt die *L. ivanovii* Mutante GD-3 ein Deletionsereignis, das nicht nur einmalig auftrat, sondern reproduzierbar in mehreren Mutanten zu finden war. Weiterhin war schon bei Beginn dieser Arbeit deutlich, dass die instabile Region einige Eigenschaften einer Pathogenitätsinsel besitzt. So liegen in ihr Gene (*smcL*, *i-inlF*, *i-inlE*), für die eine Beteiligung an der Virulenz bereits gezeigt wurde und die nur in *L. ivanovii* zu finden sind, sie fehlen in *L. monocytogenes* und allen apathogenen *Listeria*-Arten. (60, 69, 96).

Diese interessante Region - möglicherweise eine über horizontalen Gentransfer erworbene Pathogenitätsinsel - wurde in Zusammenarbeit mit den Kooperationspartnern an der "Universidad Complutense de Madrid", insbesondere mit G. Domínguez-Bernal (60), genauer analysiert, wobei sich dies auf die komplette deletierbare Region sowie benachbarte Chromosomenbereiche erstreckte.

6.1 Charakterisierung der *L. ivanovii* Mutante GD-3

Im Rahmen dieser Arbeit lag der Schwerpunkt der Analyse auf dem rechten, d.h. upstream von *smcL* liegenden Bereich der Deletion (Kap. 5.1). Mittels Genome Walking, nachfolgenden PCR- und Sequenzierungsreaktionen konnte ein 7,5 kb großer Genomabschnitt identifiziert und charakterisiert werden, der rechts von *smcL* liegt und in der Mutante GD-3 größtenteils deletiert ist. In dieser Region finden sich 13 neue Open Reading Frames (Kap. 5.1.3, Abb. 5.6), die nur teilweise Homologien zu bekannten Genen in den Datenbanken aufweisen. Zu erwähnen sind die Gene *ydeI*, *rnaH* und *norA*, für die sowohl in *B. subtilis* als auch in anderen *Listeria*-Arten (*L. monocytogenes* und *L. innocua*) Homologien gefunden wurden.

Das Gen *ydeI* codiert für ein Protein unbekannter Funktion, das auch in *B. subtilis* vorkommt. Als weiteres neues Gen findet man *rnaH*, das für eine ATP-abhängige RNA-Helicase codiert. Wie schon erwähnt, sind RNA-Helicasen am Abbau von mRNA durch das sog. "Degradosom", einem mRNA-Protein-Komplex aus verschiedenen Enzymen, beteiligt. Somit haben sie eine wichtige Rolle beim Umsatz von mRNA und sollten essentiell für *L. ivanovii* sein. Eine Deletion des genannten *rnaH* Gens hat jedoch keinen messbaren Einfluss auf die Vitalität. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass es vermutlich noch weitere RNA-Helicasen im Genom von *L. ivanovii* gibt. Bei *B. subtilis* z.B. findet man fünf paraloge Gene. Die Funktion der in dieser Arbeit identifizierten RNA-Helicase auf dem instabilen Genomabschnitt könnte dann möglicherweise durch weitere RNA-Helicasen ersetzt werden und somit entbehrlich sein. Sequenzanalysen des *L. monocytogenes* EGDe-Genoms zeigten, dass sich zumindest in dieser Art tatsächlich mehrere Paraloge finden. Ähnliches kann also auch für *L. ivanovii* angenommen werden.

Als drittes Gen wurde *norA* identifiziert, das für ein membranständiges Protein mit großer Homologie zu Effluxpumpen codiert, die eine Rolle bei Antibiotikaresistenzen haben. Die Funktion des *norA* Gens wurde in dieser Arbeit nicht näher untersucht.

Auch für die restlichen Open Reading Frames finden sich zum Teil Homologien in den Datenbanken. Allerdings ist hier der Grad der Identität geringer als bei den drei vorstehend beschriebenen Proteinen (Kap. 5.1.3, Tab. 5.4). In *L. monocytogenes* und *L. innocua* konnten für fast alle in *L. ivanovii* identifizierten Open Reading Frames Homologe gefunden werden (Kap. 5.1.4, Tab. 5.5). Bei den meisten Proteinen liegt zudem ein hoher Grad an Identität vor (74 – 92 %). Ausnahmen sind die Open Reading Frames ORF3, ORF9A, ORF9B und ORF9C, bei denen ein niedrigerer Identitätsgrad besteht (27 – 47 %).

ORF9A ist ähnlich zu einem Glucose-Aufnahmeprotein, ORF9B homolog zu einer Oxidoreductase und ORF9C schließlich zeigt Ähnlichkeiten zu einem Transkriptionsregulator aus der MerR-Familie.

Zu erwähnen ist noch ORF11, ein Open Reading Frame das Ähnlichkeit zu den Regulatoren der FNR-CRP-Familie aufweist. Auch der pleiotrope Transkriptionsregulator PrfA pathogener Listerien gehört dieser Familie von Transkriptionsregulatoren an (156, 167, 184). Interessanterweise findet sich im Promotorbereich von ORF11 auch eine mögliche PrfA-Box, was typisch für *prfA* selbst und die PrfA-regulierten Gene ist. ORF11 ist auch in der

Genomsequenz von *L. monocytogenes* EGDe und *L. innocua* CLIP11262 zu finden, ist dort allerdings größer (219 AS) als bei *L. ivanovii* (115 AS). Auf Nukleinsäureebene reicht der homologe Bereich jedoch über das Stopcodon von *L. ivanovii*-ORF11 hinaus, d.h. über die gesamte Nukleinsäuresequenz des 219 AS-Proteins von *L. monocytogenes* und *L. innocua* findet sich hohe Homologie zu der *L. ivanovii*-Sequenz. Vermutlich ist also durch Mutation ein Stopcodon in die *L. ivanovii*-ORF11-Sequenz eingeführt worden. Welchen Einfluss diese Veränderung in ORF11 im Vergleich zu *L. monocytogenes* und *L. innocua* allerdings haben könnte, ist nicht geklärt, denn die Funktion von ORF11 ist auch bei *L. monocytogenes* und *L. innocua* noch unbekannt.

Da für die meisten in *L. ivanovii* neu identifizierten ORFs homologe Proteine in *L. monocytogenes* und *L. innocua* vorliegen, wurde der Aufbau dieser Region in den beiden Arten anhand der vorliegenden Gesamt-Genomsequenz im Detail analysiert. Dabei stellte sich heraus, dass hier nicht alle Gene wie bei *L. ivanovii* in einem zusammenhängenden Genomabschnitt liegen, sondern teilweise verstreut im Chromosom zu finden sind.

In *L. monocytogenes* ist der Genomabschnitt ähnlich wie in *L. ivanovii* aufgebaut (Kap. 5.1.4, Abb. 5.9). Abweichungen finden sich wie schon erwähnt bei ORF3 und ORF11, die in der Größe von den entsprechenden *L. ivanovii*-ORFs abweichen. Zudem findet man in *L. ivanovii* zwischen ORF9 und ORF10 die drei zusätzlichen Open Reading Frames ORF9A, ORF9B und ORF9C, die bei *L. monocytogenes* nicht an dieser Stelle zu finden sind. Hier existieren nur die ORFs ORF9 und ORF10. Allerdings wurden zu diesen drei zusätzlichen ORFs Homologe an anderer Stelle im *L. monocytogenes*-Genom gefunden. Diese zeichnen sich durch einen niedrigen Identitätsgrad (41 – 47 %) aus und werden zum Teil von im Rahmen dieser Arbeit interessanten Genen flankiert. So findet man benachbart zu dem ORF9A-Homolog mehrere putative Peptidoglykan-Bindungsproteine mit LPXTG-Motiv, von denen eines Homologie zu den Internalinproteinen von *L. monocytogenes* aufweist. Außerdem liegen mehrere Proteine, die ähnlich zu Transposasen bzw. deren C- oder N-Terminus sind, in dieser Region. Das mögliche Homolog zu ORF9B liegt in *L. monocytogenes* unmittelbar benachbart zu den zwei schon bekannten großen Internalinen InlA und InlB. Das ORF9C-Homolog schließlich wird von einer putativen Oxidoreductase und einem GTP-Bindungsprotein flankiert.

Die zu ORF9A/B benachbarten Gene für Repeat-reiche Proteine (einschließlich Internalin A und B), die auch auf DNA-Ebene repetitiv sind, sowie die ebenfalls benachbarten Transposasen lassen vermuten, dass diese Regionen bevorzugte Orte von Rekombinationsereignissen sein könnten. Dies könnte erklären, warum diese ORFs in *L. ivanovii* und *L. monocytogenes* an unterschiedlichen Stellen im Chromosom vorliegen.

In *L. innocua* trifft man im Gegensatz zu *L. monocytogenes* auf größere Abweichungen (Kap. 5.1.4, Abb. 5.9). Ebenso wie in *L. monocytogenes* findet man in *L. innocua* für ORF3 und ORF11 Homologe von anderer Größe. Zudem fehlt zwischen *rnaH* und ORF9 das Open Reading Frame ORF8. Stattdessen existiert hier ein Bereich, der zwar in der Länge ORF8 entspricht, jedoch keine größeren durchgehenden Leseraster enthält. Vermutlich ist also hier durch Mutationen zu einer Anhäufung von Stopcodons gekommen. Auch die drei ORFs

ORF9A, ORF9B und ORF9C fehlen bei *L. innocua* in dem untersuchten Genomabschnitt und finden sich an anderen Stellen im Genom wieder. Ebenso wie in *L. monocytogenes* ist das ORF9A-Homolog benachbart zu einem Peptidoglykan-Bindungsprotein, Gene für Transposasen sind allerdings nicht vorhanden. Auch bei den ORF9B- und ORF9C-Homologen findet man die gleichen flankierenden Gene wie in *L. monocytogenes*.

Zwischen ORF6 und ORF7 liegen weitere vier zusätzliche Open Reading Frames, die nur in *L. innocua* zu finden sind. Über deren Funktion ist noch nichts bekannt und es wurden auch keine Homologien zu anderen Proteinen gefunden.

Für die beiden Arten *L. seeligeri* und *L. welshimeri* sind noch keine vollständigen Genomsequenzen verfügbar, daher wurde hier der fragliche Bereich zunächst mittels PCR kartiert. Dabei zeigte sich, dass die meisten der neu identifizierten Open Reading Frames rechts von LIPI-2 auch in *L. seeligeri* und *L. welshimeri* vorhanden sind und zudem in gleicher Anordnung wie bei den anderen untersuchten Arten vorliegen (Kap. 5.4.2, Abb. 5.35). Ausnahme bilden, wie schon in *L. monocytogenes* und *L. innocua*, die drei Open Reading Frames ORF9A, ORF9B und ORF9C, die auch bei *L. seeligeri* und *L. welshimeri* nicht in diesem Genomabschnitt nachweisbar waren. Diese sind also offenbar erst spät im Verlauf der Evolution aufgrund von Rekombinationsereignissen an ihre heutige Lage auf den jeweiligen Chromosomen gelangt.

Dieser Vergleich des in *L. ivanovii* dem *i-inl/smcl*-Locus (LIPI-2) benachbarten Genomabschnitts zeigt also eine nur geringe Variabilität zwischen den drei in diesem Bereich vollständig sequenzierten Arten *L. ivanovii*, *L. monocytogenes* und *L. innocua* und den PCR-kartierten Arten *L. seeligeri* und *L. welshimeri*. Mit wenigen Ausnahmen konnte bisher den hier aufgefundenen ORFs keine Funktion zugeordnet werden, somit kann auch keine Aussage über eine mögliche Beteiligung an der Pathogenität getroffen werden. Das Vorkommen auch in den apathogenen Arten spricht jedoch eher gegen eine solche Annahme.

***Listeria ivanovii* Pathogenitätsinsel 2 (LIPI-2)**

In Zusammenarbeit mit G. Domínguez-Bernal konnten der gesamte in der *L. ivanovii* Mutante GD-3 deletierte Bereich sowie ein großer angrenzender Chromosomenabschnitt charakterisiert werden. Die Sequenzanalyse des Bereichs links von *ydeI* und ein Vergleich mit den veröffentlichten Genomsequenzen von *L. monocytogenes* / *L. innocua* erbrachte folgendes Ergebnis: Sowohl in *L. monocytogenes* als auch in *L. innocua* liegt links von *ydeI* ein zu *ysnB* von *B. subtilis* homologes ORF. Dieses wird in allen drei verglichenen *Listeria*-Arten rechts von einem Arginin-tRNA-Gen flankiert, gefolgt von einem ORF mit geringer Homologie zu ORF3 von *L. ivanovii*, deshalb auch hier als ORF3 bezeichnet. Bei *L. innocua* findet sich links von ORF3 noch ein ORF mit Ähnlichkeit zu den großen Internalinen von *L. monocytogenes* (Kap. 5.1.4, Abb. 5.9). Beim *L. ivanovii* Typstamm ATCC19119 konnte G. Domínguez-Bernal links von den bereits bekannten Genen *smcL*, *i-inlF* und *i-inlE* sechs weitere Gene für kleine Internaline (*i-inlL*, *i-inlK*, *i-inlJ*, *i-inlI*, *i-inlH* und *i-inlG*) sowie

erstmals in *L. ivanovii* zwei Gene für große Internaline (*i-inlB2*, *i-inlB*) identifizieren (Kap. 5.2, Abb. 5.10, [60]). All diese Gene sind spezifisch für *L. ivanovii* und können in anderen *Listeria*-Arten nicht nachgewiesen werden. Weiterhin konnte für einige dieser Gene schon gezeigt werden, dass sie Virulenz-assoziiert sind (60, 69, 95).

Deshalb definierte G. Domínguez-Bernal den ca. 22 kb großen Internalin/SmcL-Locus als neue Pathogenitätsinsel LIPI-2 (*Listeria ivanovii* Pathogenitätsinsel 2). Diese erstreckt sich über das linke Ende der Deletion in der Mutante GD-3 hinaus und wird, wie erwähnt, von einem tRNA-Gen begrenzt (Kap. 5.3, Abb. 5.22), was ein weiteres häufiges Merkmal von Pathogenitätsinseln ist. Zudem weicht LIPI-2 in seinem G+C-Gehalt deutlich von dem anderer chromosomaler Bereich ab.

Der Bereich von LIPI-2 und den angrenzenden ORFs ist, wie mehrfach erwähnt, teilweise spontan deletierbar und die hier befindlichen Internalingene sind sowohl in sich als auch untereinander repetitiv, so dass zu vermuten war, dass er zu Rekombinationen neigt. Zur Klärung der Frage, wie konserviert diese Region innerhalb der Art *L. ivanovii* ist, wurde in Zusammenarbeit mit Petra Herrmann das Vorhandensein und die Lage der LIPI-2-Gene und der angrenzenden Open Reading Frames in verschiedenen Stämmen mittels PCR-Kartierung untersucht (Kap. 5.1.4, [114]). Dabei kam Petra Herrmann zu dem Ergebnis, dass alle Gene des Typstamm *L. ivanovii* ATCC19119, wenn auch bisweilen mit Sequenzabweichungen, in allen untersuchten Stämmen vorhanden sind, meist auch in gleicher Anordnung. Nur in wenigen Fällen konnte deren Lage nicht vollständig geklärt werden.

Auffällig in dieser Internalin-reichen Region ist das kleine Internalin *i-InlG*. Es zeichnet sich durch die charakteristischen Merkmale der kleinen Internaline aus (Signalpeptid und Leucin-reiche Repeat-Region), ist aber wesentlich größer und besitzt zudem einen zweiten Bereich aus Leucin-reichen Repeats (Kap. 5.2.2, Abb. 5.12). Betrachtet man den Aufbau dieses Proteins, so könnte das zugehörige Gen *i-inlG* das Fusionsprodukt aus zwei kleinen einzelnen Internalingenen sein, wobei die Sequenz für das Signalpeptid des zweiten Gens verloren gegangen ist. In dieser Arbeit wurde das *i-inlG*-Gen von drei weiteren *L. ivanovii*-Stämmen unterschiedlicher Herkunft (Spanien, Neuseeland) bzw. Subspezies (*L. ivanovii* subsp. *ivanovii* bzw. subsp. *londoniensis*) untersucht. Es stellte sich heraus, dass *i-inlG* in allen untersuchten Isolaten nachweisbar ist und sowohl auf Nukleinsäure- als auch Aminosäureebene nahezu identisch aufgebaut ist. Somit liegt zumindest in den untersuchten *Listeria*-Stämmen der gleiche zusammengesetzte Aufbau von *i-inlG* vor. Falls *i-inlG* aus zwei einzelnen kleinen Internalingenen entstanden sein sollte, so muss dieses Ereignis schon länger zurückliegen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass LIPI-2 trotz der vielen hoch homologen Internalingene eine innerhalb der Art hoch konservierte Pathogenitätsinsel ist. Dies spricht für eine essentielle Funktion der zahlreichen Internaline.

Analyse der Deletionsbruchpunkte in der *L. ivanovii* Mutante GD-3 und des *ysnB/ydeI*-Bereichs in anderen *Listeria*-Arten

Interessanterweise stimmen die Bruchpunkte der in der Mutante GD-3 (und in den anderen Mutanten gleichen Phänotyps) aufgetretenen Deletion nicht mit den Grenzen von LIPI-2 überein. Auf der rechten Seite befindet sich der Bruchpunkt innerhalb des *norA*-Gens (Kap. 5.1.5, Abb. 5.10), auf der linken Seite in der intergenischen Region zwischen *i-inlJ* und *i-inlI* (Kap. 5.2.4, Abb. 5.20). Auf beiden Seiten findet man ein nahezu identisches, nicht-perfektes und AT-reiches Palindrom mit zentralem "CTA" unmittelbar am Bruchpunkt. Diese Struktur könnte also die Zielsequenz für eine, allerdings bisher nicht identifizierte Rekombinase darstellen, die mit niedriger Frequenz eine spezifischen Deletion bewirkt.

Die gesamte Deletion der Mutante GD-3 besitzt eine Größe von 17,5 kb und weist eine interessante Zweiteilung auf (Kap. 5.2.4, Abb. 5.21). Im rechten, in dieser Arbeit analysierten Abschnitt der Deletion findet man verschiedene Gene bzw. Open Reading Frames, die in ähnlicher bzw. leicht veränderter Anordnung auch in vier weiteren *Listeria*-Arten vorliegen. Höchstwahrscheinlich sind diese nicht Virulenz-assoziiert sind (Kap. 5.1.4). Auch weitere, für Pathogenitätsinseln typische Merkmale (110) wie abweichender G+C-Gehalt, das Vorkommen von tRNA-Genen oder Mobilitäts-elementen findet man in diesem Bereich nicht. Vermutlich wurden also durch die Insertion von LIPI-2 (siehe unten) zwei Rekombinase-Zielsequenzen in entsprechende räumliche Nachbarschaft gebracht, jedoch ist auch eine spätere Evolution dieser Zielsequenzen nicht auszuschließen.

Wie erwähnt, findet sich in *L. monocytogenes* zwischen *ysnB* und *ydeI* als codierende Region nur ORF3, dahingegen trägt *L. innocua* links von ORF3 ein zusätzliches Open Reading Frame mit Homologie zu den großen Internalinen von *L. monocytogenes*.

In dieser Arbeit wurde untersucht, wie dieser Bereich in den beiden *Listeria*-Arten *L. seeligeri* und *L. welshimeri* aufgebaut ist, für die noch keine vollständigen Genomsequenzen verfügbar sind. Dazu wurde der fragliche Bereich mittels PCR kartiert, wobei in beiden Arten zunächst nur die Anwesenheit der Gene *ysnB* und *ydeI* nachgewiesen werden konnte. Ein Amplifikat für einen, wie bei *L. monocytogenes* und *L. innocua*, dazwischen liegenden, kurzen Genomabschnitt konnte jedoch nicht erhalten werden. Somit scheint sich zwischen diesen beiden Genen eine größere chromosomale Region zu befinden, die aufgrund ihrer Größe nicht amplifizierbar war. Alternativ könnten sich diese beiden Gene in *L. seeligeri* und/oder in *L. welshimeri* auch überhaupt an weit voneinander entfernten Genorten befinden. Deshalb wurde in einem zweiten Ansatz begonnen, die angrenzenden Bereiche mittels Genome Walking zu charakterisieren. In *L. seeligeri* wurde, ähnlich wie bei *L. innocua*, ein Peptidoglykan-Bindungsprotein mit Homologie zu großen Internalinen benachbart zu *ysnB* gefunden. Bei *L. welshimeri* findet man rechts von *ysnB* ein Protein mit Homologie zu den Transkriptionsregulatoren aus der TetR/AcrR-Familie, an das sich ein weiteres Protein mit Ähnlichkeit zum SugE-Protein, einem Transmembran-Chaperone von *E. coli*, anschließt (Kap. 5.4.3, Abb. 5.39). Bisher konnte auch mit dieser Methode nicht geklärt werden, ob *ysnB* und *ydeI* in Nachbarschaft zueinander liegen.

Wie vorstehend schon für *L. monocytogenes* und *L. innocua* dargestellt, weist diese Genomregion in allen untersuchten *Listeria*-Arten eine hohe Variabilität auf. Auffällig ist jedoch, dass die zwei unterschiedlichen genetischen Gruppen angehörenden Arten *L. innocua* und *L. seeligeri* in diesem Bereich Gene mit Verwandtschaft zu denen der großen Internaline von *L. monocytogenes* und *L. ivanovii* tragen, die ihrerseits jeweils einer dieser beiden genetischen Gruppen angehören. Es kann daher spekuliert werden, dass ein gemeinsamer Vorfahre an dieser Stelle bereits ein solches Gen trug, das bei der Evolution von *L. ivanovii* als Zielsequenz für die Insertion der Ursprungsgene von LIPI-2 diente. In *L. monocytogenes* und möglicherweise in *L. seeligeri* müsste dieses Gen dann später deletiert bzw. transloziert worden sein.

Dass in *L. ivanovii* mit LIPI-2 ein weiteres großes, Virulenz-assoziiertes und PrfA-reguliertes Gencluster zusätzlich zu LIPI-1 (und dem *i-inlCD*-Locus) aufgefunden wurde, wirft interessante Fragen nach der Herkunft und Evolution des PrfA-Regulons bei Listerien auf. Die Tatsache, dass Cluster von gemeinsam durch PrfA regulierten Genen an unterschiedlichen Stellen des Chromosoms gefunden wurden, spricht zunächst gegen die verbreitete Annahme, dass all diese Bereiche durch horizontalen Gentransfer von anderen Bakterien erworben wurden. Zudem trägt LIPI-1, wenn überhaupt, nur rudimentäre Spuren eines solchen Ereignisses, anders jedoch LIPI-2 (und *i-inlCD*). Sofern nicht alle genannten Gengruppen ihren Ursprung in *Listeria* haben, ist folgende Entwicklung denkbar: Zunächst wurde ein Vorläufer von LIPI-1 (es sei an die unterschiedliche Struktur dieses Bereichs in *L. seeligeri* erinnert) aufgenommen, dessen Eigenschaften sich im Verlauf der Evolution an das "Wirtschromosom" angepasst haben. Später wurde dann LIPI-2 (und *i-inlCD*) erworben, das noch deutliche Merkmale eines ursprünglich mobilen Elements externen Ursprungs aufweist (Nähe zu einem tRNA-Gen, abweichender G+C-Gehalt und spontane Deletierbarkeit). Durch Adaption an die fakultativ intrazelluläre Lebensweise kamen dann diese Gene unter den Einfluss von PrfA. Dafür spricht, dass die Regulation der Gene in LIPI-2 offensichtlich noch komplexer als die von LIPI-1 ist und deutlich von weiteren Faktoren als allein PrfA reguliert wird, siehe dazu das nachfolgende Kapitel (Kap. 6.2).

6.2 Analyse der Genexpression in *L. ivanovii* mittels RT-PCR

Ein weiteres Hauptziel dieser Arbeit war es, die neu identifizierten Gene bzw. Open Reading Frames auf Transkriptionsebene zu untersuchen, um Aufschlüsse über deren Regulation zu erhalten. Für alle Internalingene bis auf *i-inlB* wurden in ihrem Promotorbereich PrfA-Boxen gefunden (Kap. 5.2.2, Tab. 5.7), so dass anzunehmen war, dass ihre Expression durch den Transkriptionsregulator PrfA beeinflusst wird. Bei den zu LIPI-2 benachbarten Open Reading Frames konnte hingegen nur für ORF11 eine putative PrfA-Box identifiziert werden (Kap. 5.1.3, Tab. 5.4). Um Aussagen über die PrfA-Abhängigkeit der untersuchten Gene machen zu können, wurden in allen Versuchsansätzen *L. ivanovii* ATCC19119 (Typstamm) und die PrfA-Mutante PDC22 ($\Delta prfA$), bei der das *prfA*-Gen deletiert ist (157), parallel untersucht.

Mittels verschiedener Kulturbedingungen (20°C/37°C, Voll-/Zellkulturmedium) wurden einige Eigenschaften einer *L. ivanovii*-Infektion "simuliert" (37°C Körpertemperatur im infizierten Wirt im Vergleich zu 20°C in der Umwelt, Nährstoffbedingungen in den infizierten Zellen). Hier war schon früher für *L. monocytogenes* gezeigt worden, dass solche Bedingungen in einer Induktion der Gene des PrfA-abhängigen Virulenzgenclusters LIPI-1 resultieren (15, 16, 250). Wie ebenfalls früher schon für *L. monocytogenes* gezeigt (31), lassen diese Bedingungen jedoch nur beschränkt Vergleiche mit den natürlichen Wachstums- bzw. Infektionsbedingungen zu. Deshalb wurden zusätzlich Infektionsversuche mit verschiedenen permanenten Zelllinien (MDBK, TIB-73 und J774) durchgeführt und auch hier die Genexpression bestimmt.

Als Methode zur Bestimmung der Transkriptionsstärke wurde die sog. RT-PCR (Reverse-Transkription/Polymerase-Kettenreaktion) eingesetzt, mit der auf die synthetisierten mRNA-Mengen und damit auf die Transkriptionsstärke der untersuchten Gene rückgeschlossen werden kann.

Nach den Sequenzanalysen von G. Domínguez-Bernal finden sich in LIPI-2 potentielle Terminatoren nicht nach jedem Internalingen, sodass deren Transkription möglicherweise nicht nur monocistronisch, sondern eventuell auch polycistronisch erfolgt (Kap. 5.2.1). Deshalb wurde mit der Methode der RT-PCR zusätzlich geklärt, in welcher Form die mRNA der LIPI-2-Gene vorliegt.

Nachweis polycistronischer Transkripte der Internalingene

Aufgrund der Lage der Terminatoren sind drei polycistronische Transkripte der Internalingene möglich: *i-inlB2/L/K*, *i-inlJ/I/H/G* und *i-inlF/E*.

Für das mögliche polycistronische Transkript *i-inlB2/L/K* konnten für *i-inlB2/L* und *i-inlL/K* bicistronische Transkripte nachgewiesen werden, eine tricistronische mRNA konnte nicht detektiert werden. Ähnliches sieht man für *i-inlJ/I/H/G*, wo man für *i-inlJ/I* und *i-inlI/H* Transkripte nachweisen konnte, jedoch nicht für *i-inlH/G* und den gesamten Bereich. Für *i-inlF/E* schließlich erhielt man eine bicistronische mRNA (Kap. 5.5.2).

So ist die Frage nach der Art der Transkripte nicht vollständig geklärt. Für *i-inlF/E* liegt nicht nur monocistronische, sondern auch bicistronische mRNA vor. Bei den beiden anderen fraglichen Bereichen konnten auch nur bicistronische Transkripte nachgewiesen werden. Dies bedeutet jedoch nicht zwangsläufig, dass kein polycistronisches Transkript vorliegt, sondern kann auch daran liegen, dass eine polycistronische mRNA aufgrund ihrer Länge von über 1,5 kb und möglicherweise geringe Menge durch Reverse Transkription eventuell nicht mehr nachgewiesen werden konnte.

Vergleich der Genexpression in *L. ivanovii* nach Wachstum bei 20°C und 37°C

Es konnte beim Kooperationspartner in Madrid gezeigt werden, dass bei einem Wachstum von *L. ivanovii* bei 37°C im Vergleich zu 20°C die Expression bestimmter Gene induziert wird, d.h. eine stärkere Transkription dieser Gene zu beobachten ist. Deshalb wurde die Expression der LIPI-2-Gene, der sie flankierenden ORFs sowie der Virulenzclustergene nach Wachstum bei 20°C und 37°C untersucht (Kap. 5.5.3). 20°C sollte hier die Temperatur in der Umwelt, 37°C die Temperatur im infizierten Säugerwirt darstellen.

Betrachtet man die Expression der LIPI-2-Internalingene (Kap. 5.5.3, Abb. 5.45, Tab. 5.16) im wildtypischen *L. ivanovii* ATCC19119, so werden alle Gene mit Ausnahme von *i-inlE* bei 37°C stärker exprimiert. Bei 20°C erfolgt zum Teil nur eine schwache Transkription (*i-inlL*, *i-inlB*, *i-inlH*), woraus man schließen könnte, dass die zugehörigen Proteine in der Umwelt nicht benötigt werden. Man kann bei allen Internalingenen (außer *i-inlE*) deutlich mehr mRNA nach Wachstum bei 37°C erkennen. Somit scheinen die Internaline bei einer Temperatur, die der Körpertemperatur eines Säugerwirts entspricht, mehr benötigt zu werden und sind daher vermutlich wichtig für eine Infektion. Auffallend ist jedoch *i-inlE*, das insgesamt am stärksten von allen Internalingenen exprimiert wird, allerdings eine entgegengesetzte Temperaturabhängigkeit zeigt. Dies war erstaunlich, denn für *i-inlE* konnte schon gezeigt werden, dass es essentiell für eine Infektion ist und seine Deletion zu Avirulenz von *L. ivanovii* führt (69). Somit hätte man vor allem bei *i-inlE* einen Anstieg unter "Infektionsbedingungen" erwartet. Eine mögliche Erklärung wäre, dass *i-inlE* nicht nur essentiell für eine erfolgreiche Infektion ist, sondern auch für das Überleben in der natürlichen Umgebung wichtig sein könnte. Hierfür spricht die starke Expression bei beiden Wachstumstemperaturen. Durch welche Regulationsmechanismen es zu der beobachteten Repression der *i-inlE*-Transkription bei 37°C kommt, musste ungeklärt bleiben. Interessant ist, dass sich ein gleiches Bild in der $\Delta prfA$ -Mutante ergibt. Auch hier wird *i-inlE* bei 20°C stärker exprimiert als bei 37°C. Somit scheint die reprimierende Wirkung auf die Transkription bei 37°C bzw. eine Induktion bei 20°C auf einem PrfA-unabhängigen Mechanismus zu beruhen. Das für *i-inlE* in allen RT-PCRs gefundene kleine PCR-Produkt stellt vermutlich das Resultat eines Artefaktes bei der cDNA-Synthese dar, da es mit chromosomaler DNA als Template nicht auftrat.

Vergleicht man die Expression der Internalingene im wildtypischen *L. ivanovii* mit der in *L. ivanovii* $\Delta prfA$, so findet man für alle Gene im Wildtyp eine stärkere Transkription verglichen mit der *prfA*-Mutante. Dies war auch zu erwarten, da alle Internalingene (bis auf *i-inlB*) eine PrfA-Box (Kap. 5.2.2, Tab. 5.7) besitzen. Für die Internalingene *i-inlB2*, *i-inlL* und *i-inlK* findet man allerdings nur geringe Unterschiede in den mRNA-Mengen. Die zugehörigen PrfA-Boxen weisen Abweichungen zur Konsensussequenz auf (2 bzw. 3 mismatches). Betrachtet man hingegen *i-inlI*, das nur einen Basenaustausch in seiner PrfA-Box aufweist, so findet in der Mutante verglichen mit dem Wildtyp nur eine sehr schwache Genexpression statt. Anders als für die Virulenzclustergene (LIPI-1) von *L. monocytogenes* gezeigt (15, 16, 31) und auch für LIPI-1 von *L. ivanovii* (siehe unten), korreliert beim Vergleich zweier unterschiedlicher Wachstumstemperaturen die PrfA-Abhängigkeit der Transkription der LIPI-2 Internalingene negativ mit der Zahl der Abweichungen von der Konsensus-Sequenz (siehe aber nachstehend "MEM-Shift").

Auffällig ist auch hier wieder *i-inlE*, das trotz perfekter PrfA-Box auch in der $\Delta prfA$ -Mutante stark exprimiert wird, was ebenfalls darauf hindeutet, dass weitere PrfA-unabhängige Regulationsmechanismen eine Rolle spielen. Überraschenderweise wird die Expression von *i-inlB*, das keine PrfA-Box besitzt, offensichtlich – wobei eine indirekte Wirkung anzunehmen ist – von PrfA beeinflusst, denn im Wildtyp erhält man bei 37°C deutlich mehr mRNA als bei der *prfA*-Mutante.

Interessant ist zudem, dass sich die Expressionsmuster derjenigen Internalingene ähneln, die möglicherweise polycistronisch transkribiert werden (Kap. 5.5.2). So zeigen *i-inlB2*, *i-inlL* und *i-inlK*, sowie *i-inlJ*, *i-inlI*, *i-inlH* und *i-inlG* jeweils ein gleiches Bild bei der Transkription. Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass diese Gene möglicherweise polycistronisch transkribiert werden und eine gemeinsame Regulation besitzen.

Zusätzlich zu den LIPI-2-Internalingenen wurden die beiden an anderer Stelle im *L. ivanovii*-Genom liegenden Gene *i-inlC* und *i-inlD* untersucht (Kap. 5.5.3, Abb. 5.46, Tab. 5.17). Auch hier findet man beim Wildtyp eine stärkere Expression beider Gene als in der *prfA*-Mutante, was wieder auf eine PrfA-regulierte Transkription hindeutet. Zudem werden beide Gene im Wildtyp bei 37°C stärker exprimiert als bei 20°C und könnten somit wie die oben erwähnten Internalingene eine Rolle im Infektionsgeschehen spielen.

Betrachtet man die Expression der an LIPI-2 grenzenden ORFs (Kap. 5.5.3, Abb. 5.47, Tab. 5.18), so zeigt sich erwartungsgemäß, dass bei den meisten Genen kein signifikanter Unterschied in den mRNA-Mengen zwischen *L. ivanovii* $\Delta prfA$ und *L. ivanovii* Wildtyp zu sehen ist. Zudem sind nur geringe Expressionsunterschiede bei den beiden untersuchten Wachstumstemperaturen zu detektieren. Interessanterweise wird auch ORF11, ein Homolog zu den Transkriptionsregulatoren aus der FNR-CRP-Familie (incl. *prfA*), in Mutante und Wildtyp gleich stark exprimiert. ORF11 besitzt als einziges der neu identifizierten Open Reading Frames eine mögliche PrfA-Box mit zwei Abweichungen von der Konsensussequenz (Kap. 5.1.3, Tab. 5.4).

Bei den Virulenzclustergenen (LIPI-1) schließlich kann eine deutliche PrfA-Abhängigkeit der Expression bei beiden Wachstumstemperaturen beobachtet werden (Kap. 5.5.3, Abb. 5.48, Tab. 5.19). In der $\Delta prfA$ -Mutante ist eine deutlich schwächere Transkription der Virulenzgene zu sehen als im Wildtyp. Weiterhin wird eine erhöhte Expressionsrate nach Wachstum bei 37°C beobachtet. Dieses Expressionsmuster entspricht dem früher schon für LIPI-1 von *L. monocytogenes* beschriebenen.

Eine Untersuchung der beiden Gene *iap* und *smcL*, die keine PrfA-Box besitzen, zeigte, dass diese beiden Gene in *L. ivanovii* $\Delta prfA$ und *L. ivanovii* WT gleich stark exprimiert werden (Kap. 5.5.3, Abb. 5.49, Tab. 5.20). Für *iap* erhält man in beiden *Listeria*-Stämmen für beide untersuchten Temperaturen eine gleich starke Transkription. Für *iap* bzw. das zugehörige Protein p60 konnte gezeigt werden, dass es an der Invasion beteiligt ist (150). Außerdem besitzt es eine Mureinhydrolaseaktivität, die in einem späten Schritt der Zellteilung benötigt wird und somit essentiell für normales Wachstum der Bakterien ist (271). Somit ist plausibel, dass *iap* konstant unter verschiedenen Bedingungen exprimiert wird.

Das für die Sphingomyelinase codierende Gen *smcL* jedoch zeigt einen deutlichen Expressionsunterschied zwischen 20°C bzw. 37°C. Sowohl bei *L. ivanovii* $\Delta prfA$ als auch bei *L. ivanovii* WT wird *smcL* bei 37°C deutlich stärker exprimiert als bei 20°C. Dies ist ein Hinweis darauf, dass *smcL* auch *in vivo* verstärkt bei erhöhter Temperatur, d.h. nach Infektion eines geeigneten Wirts, transkribiert wird.

Vergleich der Genexpression in *L. ivanovii* mit und ohne "MEM-Shift"

Es konnte schon früher gezeigt werden, dass PrfA-abhängige Gene von *L. monocytogenes* und *L. ivanovii* bei einem Überführen der Bakterienkultur von Bakterienvollmedium (BHI) in das Zellkulturmedium "Minimum Essential Medium" (MEM) transkriptionell hochreguliert werden (15, 16, 67, 250). Zu den PrfA-kontrollierten Genen von *L. ivanovii* zählen neben den schon von *L. monocytogenes* bekannten Virulenzclustergenen eine Reihe kleiner, sekretierter Internaline (*i-InlC*, *i-InlD*, *i-InlE* und *i-InlF*, [59, 67, 68, 69]).

Deshalb wurde überprüft, ob die neu identifizierten LIPI-2-Internalingene, die mit Ausnahme von *i-inlB* alle eine PrfA-Box besitzen, nach einem sog. "MEM-Shift" eine erhöhte Expression zeigen. Dabei wird davon ausgegangen, dass der "MEM-Shift" das Milieu im Zytoplasma einer eukaryotischen Wirtszelle während einer Infektion simuliert und so zu einer Induktion der Transkription PrfA-abhängiger Gene führt.

Betrachtet man vergleichend die Expression der LIPI-2-Internalingene, so kann man feststellen, dass die meisten Gene wie schon bei Untersuchung unterschiedlicher Wachstumstemperaturen in der *prfA*-Mutante nur schwach transkribiert werden (Kap. 5.5.4, Abb. 5.50, Tab. 5.21), auch die Gene für *i-inlB2*, *L* und *K*, die beim Vergleich zweier Wachstumstemperaturen zwar temperaturabhängig, aber in Wildtyp und Mutante kaum unterschiedlich transkribiert wurden. Eine Ausnahme ist wieder *i-inlE*, das auch in der Mutante eine deutliche Expression zeigt. Auch hier wird das Gen *i-inlB*, das keine PrfA-Box besitzt, in der Mutante deutlich schwächer transkribiert.

Im wildtypischen *L. ivanovii* kann man nur bei *i-inlB2*, *i-inlL*, *i-inlJ*, *i-inlF* und *i-inlE* eine induzierende Wirkung des "MEM-Shifts" erkennen, d.h. diese Gene werden ähnlich wie die bekannten PrfA-abhängigen Gene reguliert. Bei den beiden Internalinen *i-inlK* und *i-inlB* ist kein Expressionsunterschied zu erkennen.

Unerwarteterweise wurde sowohl in *L. ivanovii* WT wie auch bei der *prfA*-Mutante für *i-inlI*, *i-inlH* und *i-inlG* eine verminderte Transkription nach Überführen in das Zellkulturmedium beobachtet. Dass dieses Medium auch eine reprimierende Wirkung auf die Expression PrfA-regulierter Gene haben kann, wurde bisher noch nicht beschrieben.

Untersuchung der beiden kleinen Internaline *i-inlC* und *i-inlD* zeigte wiederum eine deutliche PrfA-Abhängigkeit (Kap. 5.5.4, Abb. 5.51, Tab. 5.22). Beide Gene werden in der *prfA*-Mutante nur schwach exprimiert und es kommt nach "MEM-Shift" zu einer erhöhten Transkription der beiden Gene im wildtypischen *L. ivanovii*.

Bei Überprüfung der Expression der zu LIPI-2 benachbarten Open Reading Frames fand man ebenso wie bei der Untersuchung unterschiedlicher Wachstumstemperaturen keine signifikanten Transkriptionsunterschiede zwischen Voll- und Zellkulturmedium (Kap. 5.5.4, Abb. 5.52, Tab. 5.23). Bis auf ORF8 werden alle Open Reading Frames in *L. ivanovii* WT und $\Delta prfA$ gleich stark exprimiert. Dies bedeutet, wie schon aus den vorhergehenden Ergebnissen abgeleitet, dass diese Gene vermutlich keine Rolle im Infektionsverlauf spielen. ORF8 zeigt als einziges Gen in der *prfA*-Mutante sogar eine erhöhte Expression. Worauf dies jedoch zurückzuführen sein könnte, ist völlig unklar und es ist auch keine mögliche Funktion dieses Gens bzw. des zugehörigen Proteins bekannt, da bisher keine Homologien in den Datenbanken gefunden werden konnten. Für die Open Reading Frames ORF3 und ORF5, sowie für das Gen *ydeI* lässt sich eine Erhöhung der Transkriptionsrate nach Überführen der Bakterien in MEM nachweisen. Da diese Gene aber anscheinend nicht PrfA-abhängig exprimiert werden (sie besitzen keine PrfA-Box und werden in der *prfA*-Mutante genauso stark wie im Wildtyp exprimiert), muss es noch andere Regulationsmechanismen geben, die ebenso wie PrfA durch ein Überführen in das Zellkulturmedium aktiviert werden und so die Expression dieser Gene positiv beeinflussen.

Bei den restlichen Genen ist in der Deletionsmutante $\Delta prfA$ eher das Gegenteil zu beobachten. Hier führt ein "MEM-Shift" zu einer Reduktion der Transkription. Welche Mechanismen allerdings beteiligt sind, ist bisher unklar.

Für die Expression der Virulenzclustergene in LIPI-1 schließlich konnte wiederum gezeigt werden, dass diese Gene PrfA-abhängig transkribiert werden (Kap. 5.5.4, Abb. 5.53, Tab. 5.24). Weiterhin kann man für *plcA*, *mpl*, *actA* und *plcB* eine deutliche Induktion der Transkription nach Wachstum der Bakterien in Zellkulturmedium im Vergleich zum Wachstum in BHI feststellen. Abweichend sind *ilo* und *prfA*. Für *ilo* kann man in BHI und MEM keine unterschiedliche Expression feststellen. Dies kann zum einen daran liegen, dass *ilo* auch von einem PrfA-unabhängigen Promotor aus transkribiert wird. Zum anderen ist die Expression im Wildtyp sehr stark, so dass es möglich sein kann, dass geringe Expressionsunterschiede mit den hier eingesetzten RT-PCR-Bedingungen nicht nachweisbar waren. Für *prfA* findet man ohne "MEM-Shift" sogar etwas mehr Transkript, was eine Erklärung dafür wäre, warum etliche PrfA-abhängigen Gene nach Überführen in das Zellkulturmedium eher einen Rückgang in der Genexpression zeigen. Möglicherweise beinhaltet das eingesetzte Zellkulturmedium Inhaltsstoffe, die die Expression von *prfA* und

damit auch von PrfA-abhängigen Genen reprimieren. Auf der anderen Seite kommt es aber auch zu einer erhöhten Transkription bestimmter PrfA-abhängiger Gene in diesem Medium. Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass auch andere Parameter als die Menge an *prfA*-Transkript die Expression von Genen mit vorgeschalteter PrfA-Box beeinflussen (siehe dazu auch 147, 218).

Betrachtet man abschließend die PrfA-unabhängig exprimierten Gene *iap* und *smcL*, so findet man auch hier keinen Expressionsunterschied zwischen *L. ivanovii* $\Delta prfA$ und *L. ivanovii* WT (Kap. 5.5.4, Abb. 5.54, Tab. 5.25). Weiterhin wird *iap* mit und ohne "MEM-Shift" gleich stark exprimiert. Für das *smcL*-Gen findet man wie schon in den vorangegangenen Versuchen deutliche Expressionsunterschiede. Allerdings wird *smcL* nicht im Zellkulturmedium stärker transkribiert, sondern zeigt in dem Bakterienvollmedium eine verstärkte Expression.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sowohl PrfA als auch Temperaturerhöhung von 20°C auf 37°C sowie ein "MEM-Shift" ganz unterschiedliche Wirkungen auf die Transkription vor allem der Gene in LIPI-2 haben. Dies war für LIPI-1 von *L. monocytogenes* so bisher nicht beobachtet worden und wurde in dieser Arbeit auch nicht für LIPI-1 von *L. ivanovii* gesehen. Offensichtlich sind also die Regulationsmechanismen auf LIPI-2, die durch unterschiedliche Temperaturen und Medienbedingungen in Gang gesetzt werden, zumindest teilweise verschieden und es sind weitere, bislang unbekannte, Faktoren zusätzlich zu PrfA beteiligt.

Vergleich der Genexpression in *L. ivanovii* nach Infektion verschiedener Zelllinien

Da die bisher gemachten Aussagen nur nach Variation verschiedener Wachstumsbedingungen erhalten wurden, lassen die Ergebnisse nur begrenzte Schlüsse über die Transkription und Regulation der untersuchten Gene im Infektionsverlauf zu. Deshalb wurden zusätzlich mehrere permanente Zelllinien mit *L. ivanovii* ATCC19119 und der *prfA*-Deletionsmutante infiziert, um weitere Daten über die Genexpression und mögliche Regulation sammeln zu können (Kap. 5.5.5).

Da Wiederkäuer der natürliche Wirt von *L. ivanovii* sind, wurde zunächst die permanente Zelllinie MDBK untersucht, bei der es sich um Epithelzellen aus dem Rind handelt.

Interessanterweise erhielt man sowohl für Wildtyp als auch Deletionsmutante vergleichbare Zahlen an Bakterien in den infizierten Zellen. Für die *prfA*-Mutante hätte man ein deutlich schlechteres Überleben erwartet, da sie aufgrund der fehlenden *prfA*-Expression *in vitro* die Virulenzclustergene nicht bzw. nur sehr schwach (*ilo*) exprimiert. Eine Transkription der Virulenzclustergene in MDBK-Zellen konnte für die Mutante $\Delta prfA$, bis auf *ilo*, auch nicht nachgewiesen werden. Erklärt werden kann das gute Überleben der *prfA*-Mutante zum einen damit, dass nachgewiesenermaßen die vom PrfA-unabhängig exprimierten *smcL*-Gen codierte Sphingomyelinase ein Entkommen von *L. ivanovii* aus dem Phagosom infizierter Wirtszellen ermöglicht (95, 96). In Übereinstimmung damit konnte für die *in vitro* PrfA-unabhängig exprimierten Gene *smcL* (und *iap*) auch *in vivo* eine konstante Transkription in Mutante und

Wildtyp detektiert werden. Weiterhin erhielt man für das Superoxid-Dismutase (SOD) kodierende Gen *sod* eine sehr starke Expression in MDBK-Zellen. Bisher wurde angenommen, dass SOD nur eine untergeordnete Rolle beim Überleben im Phagosom spielt (22). Die hier beobachtete starke Expression deutet jedoch darauf hin, dass SOD bei fehlender Transkription der Virulenzclustergene möglicherweise zum Überleben im Phagosom wesentlich beiträgt.

Für die Internalingene konnten nur in dem wildtypischen *L. ivanovii* ATCC19119 Transkripte nachgewiesen werden (Kap. 5.5.5, Abb. 5.56), nicht jedoch in der *prfA*-Deletionsmutante. Dies zeigt, dass die Expression dieser Gene in infizierten Wirtszellen stärker PrfA-abhängig ist als unter den vorstehend beschriebenen in vitro-Bedingungen. Bis auf *i-inlH*, das schon in vitro sehr schwach transkribiert wurde, konnte für alle Internalingene mRNA detektiert werden. Für die Internaline *i-inlK*, *i-inlG*, *i-inlF*, *i-inlE*, *i-inlC* und *i-inlD* erhält man eine starke Expression, wobei *i-inlE* wieder am stärksten transkribiert wird. Dies legt nahe, dass vor allem *i-inlG* und *K* (sowie *i-inlC/D*), ähnlich wie für *i-inlF/E* gezeigt (69), eine Rolle im Infektionsverlauf haben.

Für die Open Reading Frames rechts von LIPI-2 war, im Unterschied zur in vitro-Situation, nur für *L. ivanovii* WT mRNA nachweisbar. Dass bei der *prfA*-Mutante überhaupt kein Transkript nachgewiesen werden konnte, mag an der notwendigerweise insgesamt geringen Bakterienzahl liegen, wodurch auch bei geringen Expressionsunterschieden die untere Nachweisgrenze der Methode unterschritten wurde. Verglichen mit den Virulenzcluster- und Internalingenen, wurde auch beim Wildtyp eine allgemein schwache Expression beobachtet, für ORF6, ORF7, ORF9A, ORF9B und ORF10 konnte keine mRNA nachgewiesen werden (Kap. 5.5.5, Abb. 5.57). Dies zeigt, dass die Transkription dieser Gene während einer Infektion nicht induziert wird und diese, wie schon vorstehend diskutiert, vermutlich nicht an der Virulenz von *L. ivanovii* beteiligt sind.

Als zweites wurde die Expression der genannten Gene nach Infektion der Makrophagen-ähnlichen Zelllinie J774 untersucht. Nach Infektionsende stellte sich heraus, dass der Wildtyp ein deutlich besseres Überleben in diesen Zellen zeigte als die *prfA*-Mutante. Auch hier konnte nur mRNA in mit dem Wildtyp infizierten Zellen detektiert werden. Einzige Ausnahme waren die PrfA-unabhängig transkribierten Gene *iap*, *smcL* und *sod*, die ebenso wie in der Zelllinie MDBK in Wildtyp und *prfA*-Mutante gleich stark exprimiert wurden. Interessanterweise wird hier das *sod*-Gen schwächer transkribiert als in der zuvor getesteten Zelllinie MDBK.

Für die Virulenzclustergene konnte eine relativ gleichmäßige Transkription aller Gene nachgewiesen werden, die insgesamt jedoch schwächer ausfiel als in der Zelllinie MDBK (Kap. 5.5.5, Abb. 5.58).

Auch für die Internalingene war die Transkription schwächer als bei einer MDBK-Infektion und nicht für alle Gene nachweisbar (Kap. 5.5.5, Abb. 5.59), so für *i-inlB*, *i-inlI* und *i-inlH*. Auch in der Zelllinien J774 war die Transkription des *i-inlE*-Gens am stärksten.

Bei den Open Reading Frames schließlich lassen sich nur bei wenigen der untersuchten Gene Transkripte nachweisen (Kap. 5.5.5, Abb. 5.60), man erhielt nur für *ysnB*, ORF6 und ORF9C geringe Mengen an mRNA.

Insgesamt wurden alle Gene nach Infektion der J774-Zelllinie trotz vergleichbarer intrazellulärer Bakterienzahlen deutlich schwächer exprimiert als in der Zelllinie MDBK. Ob dies damit zusammenhängt, dass es sich bei der Zelllinie MDBK um Zellen eines natürlichen Wirtes (Rind) von *L. ivanovii* handelt, bei J774 jedoch um Mauszellen (einem Säuger, der nicht typischerweise von *L. ivanovii* infiziert wird), kann nur spekuliert werden. Dazu müsste angenommen werden, dass das intrazelluläre Milieu natürlicher und atypischer Wirte einen unterschiedlichen Einfluss auf die Genexpression bei *L. ivanovii* hat. Alternativ oder zusätzlich könnte auch die stärkere bakterizide Aktivität von Makrophagen einen reprimierenden Einfluss auf die Expression der hier untersuchten Gene haben, ohne dass sich dies stark auf das Überleben der Bakterien auswirkt.

Als dritte Zelllinie wurden die Hepatozyten TIB-73 infiziert (embryonale Maus). Nach den vorangegangenen Erfahrungen wurde hier nur die Genexpression des Wildtyps *L. ivanovii* ATCC19119 untersucht. Trotz vergleichbarer Infektionsdosis wurde nach Infektionsende eine deutlich geringere Zahl an intrazellulären Bakterien als bei den zuvor untersuchten Zelllinien wiedergewonnen. Dies könnte daran liegen, dass *L. ivanovii* eventuell nicht so effizient in diese Zelllinie eindringen kann wie in MDBK-Zellen ("natürlicher Wirt") oder J774-Zellen (professionelle Phagozyten).

Für die Transkriptionsuntersuchungen wurden jedoch vergleichbare Bakterienzahlen wie bei den anderen Zelltypen eingesetzt. Dabei konnte eine Expression von *prfA* und *actA* nicht nachgewiesen werden, für die restlichen Gene des Virulenzgenclusters LIPI-1 erhielt man nur sehr geringe Mengen an mRNA (Kap. 5.5.5, Abb. 5.61)

Die Transkription der Internalingene hingegen konnte deutlich besser gezeigt werden (Kap. 5.5.5, Abb. 5.62) und ist im Vergleich zur *sod*-Expression relativ stark. Ähnlich wie in den zuvor untersuchten Zelllinien wurden auch hier *i-inlK*, *i-inlF*, *i-inlE* und *i-inlD* am stärksten transkribiert.

Die Expression der zu LIPI-2 benachbarten Open Reading Frames schließlich war ähnlich wie in der Zelllinie J774. Die Transkription dieser Gene war – wenn überhaupt – nur sehr schwach nachweisbar (Kap. 5.5.5, Abb. 5.63).

Somit ist abschließend zu sagen, dass die Methode der RT-PCR durchaus geeignet ist, die Expression verschiedener Gene (Virulenzclustergene, Internalingene, ORFs unbekannter Funktion) unter verschiedenen Versuchsbedingungen zu untersuchen. Für Infektionsversuche war die Methode der RT-PCR jedoch nur eingeschränkt anwendbar, da aufgrund der großen Menge an eukaryotischer mRNA im Ansatz die Expression listerieller Gene erst ab einer gewissen Transkriptionsstärke nachgewiesen werden konnte.

Der Vergleich der Transkription unter verschiedenen *in vitro*-Versuchsbedingungen und nach Infektion verschiedener Zelllinien ergab einen unterschiedlichen Einfluss des zentralen Transkriptionsfaktors PrfA vor allem auf die Virulenz-assoziierten Gene in LIPI-2 von *L. ivanovii*. Für diese Gene kann offenbar die Situation bei einer Infektion nur bedingt durch Bedingungen wie 37°C oder Wachstum in Zellkulturmedium simuliert werden und auch *in vitro* war eine sehr komplexe Regulation deutlich.

6.3 Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit konnte in Zusammenarbeit mit G. Domínguez-Bernal (60) die spontane Deletionsmutante *L. ivanovii* GD-3 molekular charakterisiert werden. Dabei wurde ein bis dahin unbekannter Chromosomenbereich identifiziert, der zahlreiche Virulenz-assoziierte Gene enthält und Merkmale einer Pathogenitätsinsel trägt, weshalb er den Namen LIPI-2 erhielt. Die Eigenschaften von LIPI-2 werfen ein neues Licht auf die mögliche Evolution von Virulenz innerhalb der Gattung *Listeria*. Weitere Erkenntnisse sind von den in Gang befindlichen Genomsequenzierungsprojekten für *L. ivanovii* und *L. welshimeri* zu erwarten.

Für die meisten Gene in LIPI-2 konnte noch keine Funktion aufgezeigt werden, hier sollten zukünftig Deletionsmutanten in einzelnen Genen hergestellt und deren Einfluss analysiert werden.

Die komplexe und teilweise unverstandene Transkriptionsregulation von LIPI-2 macht ebenfalls weitere Untersuchungen notwendig.

Da es sich bei der Deletion der *L. ivanovii* Mutante GD-3 um ein spontanes, aber reproduzierbares Ereignis handelt, sollte in dieser Arbeit die Deletionsfrequenz von LIPI-2 unter verschiedenen Kulturbedingungen untersucht werden. Da Deletionsereignisse von Pathogenitätsinseln unter Umständen jedoch sehr selten sind, wurde damit begonnen, ein positives Selektionsverfahren zu entwickeln, um sie dennoch leicht und quantitativ experimentell erfassen zu können (Kap. 5.6, Abb. 5.64). Die Arbeiten hierzu sind jedoch noch nicht abgeschlossen und werden von Stefanie Link im Rahmen ihrer Diplomarbeit fortgeführt. Somit bleibt noch zu klären, mit welcher Frequenz und vor allem unter welchen Umwelteinflüssen *L. ivanovii* diesen interessanten Genomabschnitt verliert.

7 Literatur

1. **Alouf, J. E., and C. Geoffroy.** 1991. The family of the antigenically-related, cholesterol-binding ("sulfhydryl-activated") cytolytic toxins. Sourcebook of bacterial toxins. Alouf, J. E., and J. H. Freer (eds.), Academic Press Ltd., 1991, pp. 147-186.
2. **Altrock, S.** 1997. Virulenzgenexpression *in vivo* und *in vitro* bei *Listeria ivanovii*. Diplomarbeit. Würzburg.
3. **Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, and D. J. Lipman.** 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**:3389-3402.
4. **Alvarez-Domínguez, C., J.-A. Vázquez-Boland, E. Carrasco-Marín, P. López-Mato, and F. Leyva-Cobián.** 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.
5. **Alvarez-Domínguez, C., R. Roberts, and P. D. Stahl.** 1997. Internalized *Listeria monocytogenes* modulates intracellular trafficking and delays maturation of the phagosome. *J. Cell Sci.* **110**:731-743.
6. **Andrews, N. W., and D. A. Portnoy.** 1994. Cytolysins from intracellular pathogens. *Trends in Microbiol.* **2**:261-263.
7. **Beauregard, K. E., K. D. Lee, R. J. Collier, and J. A. Swanson.** 1997. pH-dependent perforation of macrophage phagosomes by listeriolysin O from *Listeria monocytogenes*. *J. Exp. Med.* **186**:1159-1163.
8. **Beck C. F., R. Mutzel, J. Barbe, and W. Muller.** 1982. A multifunctional gene (tetR) controls Tn10-encoded tetracycline resistance. *J. Bacteriol.* **150**:633-642.
9. **Beckerle, M. C.** 1998. Spatial control of actin filament assembly: lessons from *Listeria*. *Cell.* **95**:741-748.
10. **Bergmann, B., D. Raffelsbauer, M. Kuhn, M. Götz, S. Hom, and W. Goebel.** 2002. InlA- but not InlB-mediated internalization of *Listeria monocytogenes* by non-phagocytic mammalian cells need the support of other internalins. *Mol. Microbiol.* **43** (in Druck)
11. **Biswas, I., A. Gruss, S. D. Ehrlich, and E. Maguin.** 1993. High-efficiency gene inactivation and replacement system for gram-positive bacteria. *J. Bacteriol.* **175**:3628-3635.
12. **Böckmann, R., C. Dickneite, B. Middendorf, W. Goebel, and Z. Sokolovic.** 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.
13. **Böckmann, R., C. Dickneite, W. Goebel, and J. Bohne.** 2000. PrfA mediates specific binding to RNA polymerase of *Listeria monocytogenes* to PrfA-dependent virulence gene promoters resulting in a transcriptionally active complex. *Mol. Microbiol.* **36**:487-497.
14. **Boerlin, P., J. Rocourt, F. Grimont, P. A. D. Grimont, C. Jacquet, and J.-C. Piffaretti.** 1992. *Listeria ivanovii* subsp. *londoniensis* subsp. nov. *Int. Journal of Syst. Bact.* **42**(1):69-73.
15. **Bohne, J., Z. Sokolovic, and W. Goebel.** 1994. Transcriptional regulation of *prfA* and PrfA-regulated virulence genes in *Listeria monocytogenes*. *Mol. Microbiol.* **11**:1141-1150.
16. **Bohne, J., H. Kestler, C. Uebele, Z. Sokolovic, and W. Goebel.** 1996. Differential regulation of the virulence genes of *Listeria monocytogenes* by the transcriptional activator PrfA. *Mol. Microbiol.* **20**:1189-1198.
17. **Braun, L., S. Dramsi, P. Dehoux, H. Bierne, G. Liendahl, and P. Cossart.** 1997. InlB: an invasion protein of *Listeria monocytogenes* with a novel type of surface association. *Mol. Microbiol.* **25**:285-294.
18. **Braun, L., H. Ohayon, and P. Cossart.** 1998. The InlB protein of *Listeria monocytogenes* is sufficient to promote entry into mammalian cells. *Mol. Microbiol.* **27**:1077-1087.
19. **Braun, L., F. Nato, B. Payrastra, J.-C. Mazié, and P. Cossart.** 1999. The 213-amino-acid leucine-rich repeat region of the *Listeria monocytogenes* InlB protein is sufficient for entry into mammalian cells, stimulation of PI 3-kinase and membrane ruffling. *Mol. Microbiol.* **34**:10-23.
20. **Braun, L., B. Ghebrehiwet, and P. Cossart.** 2000. gC1q-R/p32, a C1q-binding protein, is a receptor for the InlB invasion protein of *Listeria monocytogenes*. *EMBO J.* **19**:1458-1466.
21. **Braun, V., and C. v. Eichel-Streiber.** 1999. Virulence-associated mobile elements in Bacilli and Clostridia. p. 233-264. *In* J. Kaper and J. Hacker (ed.), Pathogenicity islands and other mobile genetic elements. American Society for Microbiology, Washington D. C.
22. **Brehm, K., A. Haas, W. Goebel, and J. Kreft.** 1992. A gene encoding a superoxide dismutase of the facultative intracellular bacterium *Listeria monocytogenes*. *Gene.* **118**:121-125.
23. **Brehm, K.** 1995. Molekulargenetische, biochemische und zellbiologische Untersuchungen zu Sauerstoffstress-Abwehr, Signaltransduktion und intrazellulärer Bewegungsweise bei *Listeria monocytogenes*. Dissertation. Würzburg.
24. **Brown, J. S., S. M. Gilliland, and D. W. Holden.** 2001. A *Streptococcus pneumoniae* pathogenicity island encoding an ABC transporter involved in iron uptake and virulence. *Mol. Microbiol.* **40**:572-585.

25. **Brundage, R. A., G. A. Smith, A. Camilli, J. A. Theriot, and D. A. Portnoy.** 1993. Expression and phosphorylation of the *Listeria monocytogenes* ActA protein in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **90**:11890-11894.
26. **Bubert, A., S. Köhler, and W. Goebel.** 1992. The homologous and heterologous regions within the *iap* gene allow genus- and species-specific identification of *Listeria spp.* by polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**:2625-2632.
27. **Bubert, A., M. Kuhn, W. Goebel, and S. Köhler.** 1992. Structural and functional properties of the p60 proteins from different *Listeria* species. *J. Bacteriol.* **174**:8166-8171.
28. **Bubert, A., P. Schubert, S. Köhler, R. Frank, and W. Goebel.** 1994. Synthetic peptides derived from the *Listeria monocytogenes* p60 protein as antigens for the generation of polyclonal antibodies specific for secreted cell-free *L. monocytogenes* p60 proteins. *Appl. Env. Microbiol.* **60**:3120-3127.
29. **Bubert, A., H. Kestler, M. Götz, R. Böckmann, and W. Goebel.** 1997. The *Listeria monocytogenes iap* gene as an indicator gene for the study of PrfA-dependent regulation. *Mol. Gen. Genet.* **256**:54-62.
30. **Bubert, A., J. Riebe, N. Schnitzler, A. Schönberg, W. Goebel, and P. Schubert.** 1997. Isolation of catalase-negative *Listeria monocytogenes* strains from listeriosis patients and their rapid identification by anti-p60 antibodies and/or PCR. *J. Clin. Microbiol.* **35**:179-183.
31. **Bubert, A., Z. Sokolovic, S.-K. Chun, L. Papatheodorou, A. Simm, and W. Goebel.** 1999. Differential expression of *Listeria monocytogenes* virulence genes in mammalian host cells. *Mol. Gen. Genet.* **261**:323-336.
32. **Cai, S., and M. Wiedmann.** 2001. Characterization of the *prfA* virulence gene cluster insertion site in non-hemolytic *Listeria spp.*: probing the evolution of the *Listeria* virulence gene island. *Curr. Microbiol.* **43**:271-277.
33. **Camilli, A., H. Goldfine, and D. A. Portnoy.** 1991. *Listeria monocytogenes* mutants lacking phosphatidylinositol-specific phospholipase C are avirulent. *J. Exp. Med.* **173**:751-754.
34. **Camilli, A., L. G. Tilney, and D. A. Portnoy.** 1993. Dual roles of *plcA* in *Listeria monocytogenes* pathogenesis. *Mol. Microbiol.* **8**:143-157.
35. **Carlier, M. F., V. Laurent, J. Santolini, R. Melki, D. Didry, G.-X. Xia, Y. Hong, N.-H. Chua, and D. Pantaloni.** 1997. Actin depolymerizing factor (ADF/cofilin) enhances the rate of filament turnover: implication in actin-based motility. *J. Cell Biol.* **136**:1307-1322.
36. **Chakraborty, T., and W. Goebel.** 1988. Recent developments in the study of virulence of *Listeria monocytogenes*. *Curr. Topics Microbiol. Immunol.* **138**:41-58.
37. **Chakraborty, T., M. Leimeister-Wächter, E. Domann, M. Hartl, W. Goebel, T. Nichterlein, and S. Notermans.** 1992. Coordinate regulation of virulence genes in *Listeria monocytogenes* requires the product of the *prfA* gene. *J. Bacteriol.* **174**:568-574.
38. **Chakraborty, T., F. Ebel, E. Domann, K. Niebuhr, B. Gerstel, S. Pistor, C. J. Temme-Grove, B. M. Jokusch, M. Reinhard, U. Walter, and J. Wehland.** 1995. A novel focal adhesion factor directly linking intracellularly motile *Listeria monocytogenes* and *Listeria ivanovii* to the actin-based cytoskeleton of mammalian cells. *EMBO J.* **14**:1314-1321.
39. **Cicchetti, G., P. Maurer, P. Wagener, and C. Kocks.** 1999. Actin and phosphoinositide binding by the ActA protein of the bacterial pathogen *Listeria monocytogenes*. *J. Biol. Chem.* **274**:33616-33626.
40. **Collins, M. D., S. Wallbanks, D. J. Lane, J. Shah, R. Nietupski, J. Smida, M. Dorsch, and E. Stackebrandt.** 1991. Phylogenetic analysis of the genus *Listeria* is based on reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **41**:240-246.
41. **Cossart, P., and J. Mengaud.** 1989. *Listeria monocytogenes*: a model system for the molecular study of intracellular parasitism. *Mol. Biol. Med.* **6**:463-474.
42. **Cossart, P., M. F. Vincente, J. Mengaud, F. Baquero, J. C. Perez-Diaz, and P. Berche.** 1989. Listeriolysin O is essential for virulence of *Listeria monocytogenes*: direct evidence obtained by gene complementation. *Infect. Immun.* **57**:3629-3636.
43. **Cossart, P.** 1995. Actin-based bacterial motility. *Curr. Opin. Cell Biol.* **7**:94-101.
44. **Cossart, P.** 2000. Actin-based motility of pathogens: the Arp2/3 complex is a central player. *Cell Microbiol.* **2**:195-205.
45. **Cossart, P., and R. Jonquière.** 2000. Sortase, a universal target for therapeutic agents against Gram-positive bacteria? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**:5013-5015.
46. **Courvalin P., and C. Carlier.** 1987. Tn1545: a conjugative shuttle transposon. *Mol. Gen. Genet.* **206**:269-264.
47. **Cummins, A. J., A. K. Fiedling, and J. McLauchlin.** 1994. *Listeria ivanovii* infection in a patient with AIDS. *J. Infect.* **28**:89-91.
48. **Dabiri, G. A., J. M. Sanger, D. A. Portnoy, and F. S. Southwick.** 1990. *Listeria monocytogenes* moves rapidly through the host-cell cytoplasm by inducing directional actin assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **87**:6068-6072.

49. Dalton, C. B., C. C. Austin, J. Sobel, P. S. Hayes, W. F. Bibb, L. M. Graves, B. Swaminathan, M. E. Proctor, and P. M. Griffin. 1997. An outbreak of gastroenteritis and fever due to *Listeria monocytogenes* in milk. *N. Engl. J. Med.* **336**:100-105.
50. David, V., E. Gouin, M. V. Troys, A. Grogan, A. W. Segal, C. Ampe, and P. Cossart. 1998. Identification of cofilin, coronin, Rac and CapZ in actin tails using a *Listeria* affinity approach. *J. Cell Sci.* **111**:2877-2884.
51. Demuth, A., T. Chakraborty, G. Krohne, and W. Goebel. 1994. Mammalian cells transfected with the listeriolysin gene exhibit enhanced proliferation and focus formation. *Infect. Immun.* **62**:5102-5111.
52. Dickneite, C., R. Böckmann, A. Spory, W. Goebel, and Z. Sokolovic. 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.
53. Dietrich, G., U. E. Schaible, K.-D. Diehl, H.-J. Mollenkopf, S. Wiek, J. Hess, K. Hagens, S. H. E. Kaufmann, and B. Knapp. 2000. Isolation of RNA from Mycobacteria grown under *in vitro* and *in vivo* conditions. *FEMS Microbiol. Lett.* **186**:177-180.
54. Domann, E., and T. Chakraborty. 1989. Nucleotide sequence of the listeriolysin gene from a *Listeria monocytogenes* serotype 1/2a strain. *Nucleic Acids Res.* **17**:6406.
55. Domann, E., M. Leimeister-Wächter, W. Goebel, and T. Chakraborty. 1991. Molecular cloning, sequencing, and identification of a metalloprotease gene from *Listeria monocytogenes* that is species specific and physically linked to the listeriolysin gene. *Infect. Immun.* **59**:65-72.
56. Domann, E., J. Wehland, M. Rohde, S. Pistor, M. Hartl, W. Goebel, M. Leimeister-Wächter, M. Wuenscher, and T. Chakraborty. 1992. A novel bacterial virulence gene in *Listeria monocytogenes* required for host cell microfilament interaction with homology to the proline-rich region of vinculin. *EMBO J.* **11**:1981-1990.
57. Domann, E. 1992. Molekulargenetische Untersuchungen der Virulenzfaktoren Phospholipase (*plcA*), Listeriolysin (*lisA*), Protease (*mpl*) und Aktin-Bindung (*actA*) und deren koordinierte Regulation durch den positiven Regulationsfaktor PrfA von *Listeria monocytogenes*. Dissertation. Würzburg.
58. Domann, E., J. Wehland, K. Niebuhr, C. Haffner, M. Leimeister-Wächter, and T. Chakraborty. 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.
59. Domann, E., S. Zechel, A. Lingnau, T. Hain, A. Darji, T. Nichterlein, J. Wehland, and T. Chakraborty. 1997. Identification and characterization of a novel PrfA-regulated gene in *Listeria monocytogenes* whose product, IrpA, is highly homologous to internalin proteins, which contain leucine-rich repeats. *Infect. Immun.* **65**:101-109.
60. Domínguez-Bernal, G. 2001. Caracterización de LIPI-2, una nueva isla de patogenicidad de *Listeria*. Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Veterinaria. Departamento de Patología Animal I.
61. Dramsi, S., C. Kocks, C. Forestier, and P. Cossart. 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.
62. Dramsi, S., I. Biswas, E. Maguin, L. Braun, P. Mastroeni, and P. Cossart. 1995. Entry of *Listeria monocytogenes* into hepatocytes requires expression of InIB, a surface protein of the internalin multigene family. *Mol. Microbiol.* **16**:351-261.
63. Dramsi, S., P. Dehoux, M. Lebrun, P. L. Goossens, and P. Cossart. 1997. Identification of four new members of the internalin multigene family of *Listeria monocytogenes* EGD. *Infect. Immun.* **65**:1615-1625.
64. Dramsi, S., S. Lévi, A. Thriller, and P. Cossart. 1998. Entry of *Listeria monocytogenes* into neurons occurs by cell-to-cell spread: an *in vitro* study. *Infect. Immun.* **66**:4461-4468.
65. Drevets, D. A., R. T. Sawyer, T. A. Potter, and P. A. Campbell. 1995. *Listeria monocytogenes* infects human endothelial cells by two distinct mechanisms. *Infect. Immun.* **63**:4268-4276.
66. Elsner, H.-A., I. Sobottka, A. Bubert, H. Albrecht, R. Laufs, and D. Mack. 1996. Catalase-negative *Listeria monocytogenes* causing lethal sepsis and meningitis in an adult hematologic patient. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **15**:965-967.
67. Engelbrecht, F., S.-K. Chun, C. Ochs, J. Hess, F. Lottspeich, W. Goebel, and Z. Sokolovic. 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.
68. Engelbrecht, F., C. Dickneite, R. Lampidis, M. Götz, U. DasGupta, and W. Goebel. 1998. Sequence comparison of the chromosomal regions encompassing the internalin C genes (*inlC*) of *Listeria monocytogenes* and *L. ivanovii*. *Mol. Gen. Genet.* **257**:186-197.
69. Engelbrecht, F., G. Domínguez-Bernal, J. Hess, C. Dickneite, L. Greiffenberg, R. Lampidis, D. Raffelsbauer, J. J. Daniels, J. Kreft, S. H. E. Kaufmann, J.-A. Vázquez-Boland, and W. Goebel. 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.

70. **Farber, J. M., and P. I. Peterkin.** 1991. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiol. Rev.* **55**:476-511.
71. **Fischetti, V. A., V. Pancholi, and O. Schneewind.** 1990. Conservation of a hexapeptide sequence in the anchor region of surface protein from gram-positive cocci. *Mol. Microbiol.* **4**:1603-1605.
72. **Flamm, R. K., D. J. Hinrichs, and M. F. Thomashow.** 1984. Introduction of pAM beta 1 into *Listeria monocytogenes* by conjugation and homology between native *L. monocytogenes* plasmids. *Infect Immun.* **44**(1):157-161.
73. **Förster, S.** 1996. Die Oberflächenexpression des ActA-Proteins von *Listeria monocytogenes*. Diplomarbeit, Würzburg.
74. **Freitag, N. E., P. Youngman, and D. A. Portnoy.** 1992. Transcriptional activation of the *Listeria monocytogenes* hemolysin gene in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **174**:1293-1298.
75. **Freitag, N. E., L. Rong, and D. A. Portnoy.** 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.
76. **Freitag, N. E., and D. Portnoy.** 1994. Dual promoters of the *Listeria monocytogenes prfA* transcriptional activator appear essential *in vitro* but are redundant *in vivo*. *Mol. Microbiol.* **12**:845-853.
77. **Freshney, R. I.** 1987. Culture of animal cells. Alan. R. Lis. Inc. New York.
78. **Gaillard, J.-L., P. Berche, and P. Sansonetti.** 1986. Transposon mutagenesis as a tool to study the role of haemolysin in the virulence of *Listeria monocytogenes*. *Infect. Immun.* **52**:50-55.
79. **Gaillard, J.-L., P. Berche, J. Mounier, S. Richard, and P. Sansonetti.** 1987. In vitro model of penetration and intracellular growth of *Listeria monocytogenes* in the human enterocyte-like cell line Caco-2. *Infect. Immun.* **55**:2822-2829.
80. **Gaillard, J.-L., P. Berche, C. Frehel, E. Gouin, and P. Cossart.** 1991. Entry of *L. monocytogenes* into cells is mediated by internalin, a repeat protein reminiscent of surface antigens from gram-positive cocci. *Cell.* **65**:1127-1141.
81. **Gaillard, J.-L., and B. B. Finlay.** 1996. Effect of cell polarization and differentiation on entry of *Listeria monocytogenes* into the enterocyte-like Caco-2 cell line. *Infect. Immun.* **64**:1299-1308.
82. **Gaillard, J.-L., F. Jaubert, and P. Berche.** 1996. The *inlAB* locus mediates the entry of *Listeria monocytogenes* into hepatocytes in vivo. *J. Exp. Med.* **183**:359-369.
83. **Gedde, M. M., D. E. Higgins, L. G. Tilney, and D. A. Portnoy.** 2000. Role of listeriolysin O in cell-to-cell spread of *Listeria monocytogenes*. *Infect. Immun.* **68**:999-1003.
84. **Geissendörfer, M., and W. Hillen.** 1990. Regulated expression of heterologous genes in *Bacillus subtilis* using Tn10 encoded *tet* regulatory elements. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **33**:657-663.
85. **Gellin, B. G., and C. V. Broome.** 1989. Listeriosis. *JAMA.* **261**:1313-1320.
86. **Geoffroy, C., J. L. Gaillard, J. E. Alouf, and P. Berche.** 1987. Purification, characterization and toxicity of the sulphydryl-activated haemolysin listeriolysin O from *Listeria monocytogenes*. *Infect. Immun.* **55**:1641-1646.
87. **Geoffroy, C., J.-L. Gaillard, J. E. Alouf, and P. Berche.** 1989. Production of thiol-dependent haemolysins by *Listeria monocytogenes* and related species. *J. Gen. Microbiol.* **135**:481-487.
88. **Geoffroy, C., J. Raveneau, J.-L. Beretti, A. Lecroisey, J.-A. Vázquez-Boland, J. E. Alouf, and P. Berche.** 1991. Purification and characterization of an extracellular 29-kilodalton phospholipase C from *Listeria monocytogenes*. *Infect. Immun.* **59**:2382-2388.
89. **Gerstel, B., L. Gröbe, S. Pistor, T. Chakraborty, and J. Wehland.** 1996. The ActA polypeptides of *Listeria ivanovii* and *Listeria monocytogenes* harbor related binding sites for host microfilament proteins. *Infect. Immun.* **64**:1929-1936.
90. **Gilot, P., P. André, and J. Content.** 1998. *Listeria monocytogenes* possesses adhesins for fibronectin. *Infect. Immun.* **67**:6698-6701.
91. **Glaser, P., L. Frangeul, C. Buchrieser, C. Rusniok, A. Amend, F. Baquero, P. Berche, H. Bloeker, P. Brandt, T. Chakraborty, A. Charbit, f. Chetouani, E. Couvé, A. de Daruvar, P. Dehoux, E. Domann, G. Domínguez-Bernal, E. Duchaud, L. Durant, O. Dussurget, K.-D. Entian, H. Fsihi, F. Garcia-Del Portillo, P. Garrido, L. Gautier, W. Goebel, N. Gómez-López, T. Hain, J. Hauf, D. Jackson, L.-M. Jones, U. Kaerst, J. Kreft, M. Kuhn, F. Kunst, G. Kurapat, E. Madueno, A. Maitournam, J. Mata Vicente, E. Ng, H. Nedjari, G. Nordsiek, S. Novella, B. de Pablos, J.-C. Pérez-Díaz, R. Purcell, B. Rimmel, M. Rose, T. Schlueter, N. Simoes, A. Tierrez, J.-A. Vázquez-Boland, H. Voss, J. Wehland, and P. Cossart.** 2001. Comparative genomics of *Listeria* species. *Science* **294**:849-852.
92. **Goebel, W., and J. Kreft.** 1997. Cytolysins and the intracellular life of bacteria. *Trends Microbiol.* **5**:86-88.
93. **Goldfine, H., and C. Knob.** 1992. Purification and characterization of *Listeria monocytogenes* phosphatidylinositol-specific phospholipase C. *Infect. Immun.* **60**:3059-4067.
94. **Goldfine, H., N. C. Johnston, and C. Knob.** 1993. Nonspecific phospholipase C of *Listeria monocytogenes*: activity on phospholipids in Triton X-100-mixed micelles and in biological membranes. *J. Bacteriol.* **175**:4298-4306.

95. **González-Zorn, B., G. Domínguez-Bernal, M. Suárez, M. T. Ripio, Y. Vega, S. Novella, and J.-A. Vázquez-Boland.** 1999. The *smcL* gene of *Listeria ivanovii* encodes a sphingomyelinase C that mediates bacterial escape from the phagocytic vacuole. *Mol. Microbiol.* **33**:510-523.
96. **González-Zorn, B., G. Domínguez-Bernal, M. Suárez, M.-T. Ripio, Y. Vega, S. Novella, A. Rodriguez, I. Chico, A. Tierrez, and J.-A. Vázquez-Boland.** 2000. SmcL, a novel membrane-damaging virulence factor in *Listeria*. *Int. J. Med. Microbiol. Infect. Dis.* **290**:369-374.
97. **Gouin, E., J. Mengaud, and P. Cossart.** 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.
98. **Gouin, E., P. Dehoux, J. Mengaud, C. Kocks, and P. Cossart.** 1995. *iactA* of *Listeria ivanovii*, although distantly related to *Listeria monocytogenes* ActA, restores actin tail formation in an *L. monocytogenes actA* mutant. *Infect. Immun.* **63**:2729-2737.
99. **Gray, M. L., and A. H. Killinger.** 1966. *Listeria monocytogenes* and listeric infections. *Bacteriol. Rev.* **30**:309-382.
100. **Gregory, S. H., and E. J. Wing.** 1990. Accessory function of Kupffer cells in the antigen-specific blastogenic response of an L3T4⁺ T-lymphocyte clone to *Listeria monocytogenes*. *Infect. Immun.* **58**:2313-2319.
101. **Gregory, S. H., A. J. Sagnimeni, and E. J. Wing.** 1996. Expression of the *inlAB* operon by *Listeria monocytogenes* is not required for entry in hepatic cells in vivo. *Infect. Immun.* **64**:3983-3986.
102. **Greiffenberg, L., Z. Sokolovic, H.-J. Schnittler, A. Spory, R. Böckmann, W. Goebel, and M. Kuhn.** 1997. *Listeria monocytogenes*-infected human umbilical vein endothelial cells: internalin-dependent invasion, intracellular growth, movement, and host cell responses. *FEMS Microbiol. Lett.* **157**:163-170.
103. **Greiffenberg, L., W. Goebel, S. Kim, I. Weiglein, A. Bubert, F. Engelbrecht, M. Stins, and M. Kuhn.** 1998. Interaction of *Listeria monocytogenes* with human brain microvascular endothelial cells: InlB-dependent invasion, long-term intracellular growth and spread from macrophages to endothelial cells. *Infect. Immun.* **66**:5260-5267.
104. **Greiffenberg, L., W. Goebel, K. S. Kim, J. Daniels, and M. Kuhn.** 2000. Interaction of *Listeria monocytogenes* with human brain microvascular endothelial cells: an electron microscopic study. *Infect. Immun.* **68**:3275-3279.
105. **Grimberg, J., S. Maguire, and L. Belluscio.** 1989. A simple method for the preparation of plasmid and chromosomal *E. coli* DNA. *Nucleic Acids Res.* **17**:8893
106. **Guzman, C. A., E. Domann, M. Rhode, D. Bruder, A. Darji, S. Weiss, J. Wehland, T. Chakraborty, and K. N. Timmis.** 1996. Apoptosis of mouse dendritic cells is triggered by listeriolysin, the major virulence determinant of *Listeria monocytogenes*. *Mol. Microbiol.* **20**:119-126.
107. **Haas, A., M. Dumbisky, and J. Kreft.** 1992. Listeriolysin genes: complete sequence of *ilo* from *Listeria ivanovii* and of *Iso* from *Listeria seeligeri*. *Bioch. Bioph. Acts.* **1130**:81-84.
108. **Haas, A., and W. Goebel.** 1992. Cloning of a superoxide dismutase gene from *Listeria ivanovii* by functional complementation in *Escherichia coli* and characterization of the gene product. *Mol. Gen. Genet.* **231**:313-322.
109. **Haas, A., and K. Brehm.** 1993. Superoxide dismutases and catalases – biochemistry, molecular biology and some biomedical aspects. *Genet. Eng. Biotechnol.* **13**:243-269.
110. **Hacker, J., G. Blum-Oehler, I. Mühldorfer, and H. Tschäpe.** 1997. Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution. *Mol. Microbiol.* **23**:1089-1097.
111. **Hacker, J., and E. Carniel.** 2001 Ecological fitness, genomic islands and bacterial pathogenicity. *EMBO reports* **21**:376-381.
112. **Hagiwara, K., and C. C. Harris.** 1996. "Long distance sequencer" method; a novel strategy for large DNA sequencing projects. *Nucleic Acids Research.* **24**:2460-2461.
113. **Hecht, B., G. Muller, and W. Hillen.** 1993. Noninducible Tet repressor mutations map from the operator binding motif to the C terminus. *J. Bacteriol.* **175**:1206-1210.
114. **Herrmann, P.** 2001. Vergleichende Analyse des LIPI-2-Genclusters bei verschiedenen *Listeria ivanovii*-Stämmen mittels PCR-Kartierung und Konstruktion und Charakterisierung von Protein-Tyrosin-Phosphatase-Deletionsmutanten von *Listeria monocytogenes*. Diplomarbeit. Würzburg.
115. **Hillen, W., and C. Berens.** 1994. Mechanisms underlying expression of Tn10 encoded tetracycline resistance. *Annu. Rev. Microbiol.* **48**:345-369.
116. **Hof, H.** 1984. Virulence of different strains of *Listeria monocytogenes* serovar 1/2a. *Med. Microbiol. Immunol.* **173**:207-218.
117. **Hof, H., T. Nichterlein, A. Bruckmair, S. Köhler, W. Goebel, and J. Wecke.** 1991. Virulence of rough strains of *Listeria monocytogenes*. Abstr. D-125. p. 114 / Abstr. 91st Gen. Meet. Am. Soc. Microbiol., Washington D. C.
118. **Hof, H., T. Nichterlein, and M. Kretschmar.** 1997. Management of Listeriosis. *Clin. Microbiol. Reviews* **10**:345-357.

119. **Holm, L., C. Sander, H. Rüterjans, M. Schnarr, R. Fogh, R. Boelens, and R. Kaptein.** 1994. LexA repressor and iron uptake regulator from *Escherichia coli*: new members of the CAP-like DNA binding domain superfamily. *Prot. Eng.* **7**:1449-1453.
120. **Ireton, K., B. Payraastre, H. Chap, W. Ogawa, H. Sakaue, M. Kasuga, and P. Cossart.** 1996. A role for phosphoinositide 3-kinase in bacterial invasion. *Science.* **274**:780-782.
121. **Ireton, K., B. Payraastre, and P. Cossart.** 1999. The *Listeria monocytogenes* protein InlB is an agonist of mammalian phosphoinositide 3-kinase. *J. Biol. Chem.* **274**:17025-17032.
122. **Ivanov, I.** 1962. Untersuchungen über die Listeriose der Schafe in Bulgarien. *Monatsheft Veterinärmed.* **17**:729-736.
123. **Jensen, V. B., J. T. Harty, and B. D. Jones.** 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.
124. **Jones, D.** 1990. Foodborne illness - foodborne listeriosis. *The Lancet.* **336**:1171-1174.
125. **Jones, D.** 1992. Current classification of the genus *Listeria*. *Absta. 11th Int. Symp. Probl. Listeriosis Abstr.* **2**:7-8.
126. **Jones, D., and H. P. R. Seeliger.** 1992. The Genus *Listeria* (Chapter 71) in *The Prokaryotes, Second Edition, A Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications.* Balows, A., H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder, and K.-H. Schleifer (eds.). Springer-Verlag. p. 1595-1616.
127. **Jonquière, R., H. Bierne, F. Fiedler, P. Gounon, and P. Cossart.** 1999. Interaction between the protein InlB of *Listeria monocytogenes* and lipoteichoic acid: a novel mechanism of protein association at the surface of Gram-positive bacteria. *Mol. Microbiol.* **34**:902-914.
128. **Julio, S. M., C. P. Conner, D. M. Heithoff, and M. J. Mahan.** 1998. Directed formation of chromosomal deletions in *Salmonella typhimurium*: targeting of specific genes induced during infection. *Mol. Gen. Genet.* **258**:178-181.
129. **Junttila, J. R., S. I. Niemala, and J. Hirn.** 1988. Minimum growth temperature of *Listeria monocytogenes* and non-haemolytic *Listeria*. *J. Appl. Bacteriol.* **65**:321-327.
130. **Kang, F., R. O. Laine, M. R. Bubb, F. S. Southwick, and D. L. Purich.** 1997. Profilin interacts with the Gly-Pro-Pro-Pro-Pro sequences of vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP): implications for actin-based *Listeria* motility. *Biochemistry* **36**:8384-8392.
131. **Karunasagar, I., G. Krohne, and W. Goebel.** 1993. *Listeria ivanovii* is capable of cell-to-cell spread involving actin polymerization. *Infect. Immun.* **61**:162-169.
132. **Karunasagar, I., B. Senghaas, G. Krohne, and W. Goebel.** 1994. Ultrastructural study of *Listeria monocytogenes* entry into cultured human colonic epithelial cells. *Infect. Immun.* **62**:3554-3558.
133. **Karunasagar, I., R. Lampidis, W. Goebel, and J. Kreft.** 1997. Complementation of *Listeria seeligeri* with the *plcA-prfA* genes from *L. monocytogenes* activates transcription of seeligerolysin and leads to bacterial escape from the phagosome of infected mammalian cells. *FEMS Microbiol. Lett.* **146**:303-310.
134. **Kathariou, S., P. Metz, H. Hof, and W. Goebel.** 1987. Tn916-induced mutations in the hemolysin determinant affecting virulence of *Listeria monocytogenes*. *J. Bacteriol.* **169**:1291-1297.
135. **Kim, L., A. Mogk, and W. Schumann.** 1996. A xylose-inducible *Bacillus subtilis* integration vector and its application. *Gene* **181**:71-76.
136. **Klarsfeld, A. D., P. L. Goossens, and P. Cossart.** 1994. Five *Listeria monocytogenes* genes preferentially expressed in infected mammalian cells: *plcA*, *purH*, *purD*, *pyrE* and an arginine ABC transporter gene, *arpJ*. *Mol. Microbiol.* **13**:585-597.
137. **Kocks, C., E. Gouin, M. Tabouret, P. Berche, H. Ohayon, and P. Cossart.** 1992. *L. monocytogenes*-induced actin assembly requires the *actA* gene product, a surface protein. *Cell.* **68**:521-531.
138. **Kocks, C., R. Hellio, P. Gounon, H. Ohayon, and P. Cossart.** 1993. Polarized distribution of *Listeria monocytogenes* surface protein ActA at the site of directional actin assembly. *J. Cell Sci.* **105**:699-710.
139. **Kocks, C., J. B. Marchand, E. Gouin, H. d'Hauteville, P. J. Sansonetti, M.-F. Carlier, and P. Cossart.** 1995. The unrelated surface proteins ActA of *Listeria monocytogenes* and IcsA of *Shigella flexneri* are sufficient to confer actin-based motility on *Listeria innocua* and *Escherichia coli* respectively. *Mol. Microbiol.* **18**:413-423.
140. **Köhler, S., M. Leimeister-Wächter, T. Chakraborty, F. Lottspeich, and W. Goebel.** 1990. The gene coding for protein p60 of *Listeria monocytogenes* and its use as a specific probe for *Listeria monocytogenes*. *Infect. Immun.* **58**:1943-1950.
141. **Köhler, S., A. Bubert, M. Vogel, and W. Goebel.** 1991. Expression of the *iap* gene coding for protein p60 of *Listeria monocytogenes* is controlled on the posttranscriptional level. *J. Bacteriol.* **173**:4668-4674.
142. **Kreft, J., D. Funke, A. Haas, F. Lottspeich, and W. Goebel.** 1989. Production, purification and characterization of hemolysins from *Listeria ivanovii* and *Listeria monocytogenes* Sv4b. *FEMS Microbiol. Lett.* **57**:197-202.

143. **Kreft, J., R. Schlesinger, M. Weber, and W. Goebel.** 1990. Characterization of Hemolysin-Mutants of *Listeria ivanovii*. In *Bacterial Protein Toxins*, Zbl. Bakt. Suppl. 19. Rappouli et al. (Eds.). Gustav Fischer, Stuttgart, New York.
144. **Kreft, J.** 1992. *Listeria monocytogenes* - ein Modell für fakultativ intrazelluläre Bakterien. *BioEng.* **1**:65-70.
145. **Kreft, J., M. Dumbsky, and S. Theiss.** 1995. The actin-polymerization protein from *Listeria ivanovii* is a large repeat protein which shows only limited amino acid sequence homology to ActA from *Listeria monocytogenes*. *FEMS Microbiol. Lett.* **126**:113-122.
146. **Kreft, J., J.-A. Vázquez-Boland, E. Ng, and W. Goebel.** 1999. Virulence gene clusters and putative pathogenicity islands in *Listeria*. p. 219-232. In J. Kaper and J. Hacker (ed.), *Pathogenicity islands and other mobile genetic elements*. American Society for Microbiology, Washington D. C.
147. **Kreft, J., and J. A. Vázquez-Boland.** 2001. Regulation of virulence genes in *Listeria*. *Int. J. Med. Microbiol.* **291**:145-157.
148. **Kreft, J., J.-A. Vázquez-Boland, S. Altrock, G. Domínguez-Bernal, and W. Goebel.** 2002. Pathogenicity islands and other virulence elements in *Listeria*. *Curr. Topics Microbiol. Immunol.* **264**:109-125.
149. **Kuhn, M., S. Kathariou, and W. Goebel.** 1988. Hemolysin supports survival but not entry of the intracellular bacterium *Listeria monocytogenes*. *Infect. Immun.* **56**:79-82.
150. **Kuhn, M., and W. Goebel.** 1989. Identification of an extracellular protein of *Listeria monocytogenes* possibly involved in intracellular uptake by mammalian cells. *Infect. Immun.* **57**:55-61.
151. **Kuhn, M., and W. Goebel.** 1994. Induction of cytokines in phagocytic mammalian cells infected with virulent and avirulent *Listeria* strains. *Infect. Immun.* **62**:348-356.
152. **Kuhn, M., and W. Goebel.** 1995. Molecular studies on the virulence of *Listeria monocytogenes*. *Genet. Eng.* **17**:31-51.
153. **Kuhn, M., and W. Goebel.** 1998. Host cell signalling during *Listeria monocytogenes* infection. *Trends Microbiol.* **6**:11-15.
154. **Kunst, F., et al.** 1997. The complete genome sequence of the gram positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature.* **390**:249-256.
155. **Laine, R. O., K. L. Phaneuf, C. C. Cunningham, D. Kwiatkowski, T. Azuma, and F. S. Southwick.** 1998. Gelsolin, a protein that caps the barbed ends and severs actin filaments, enhances the actin-based motility of *Listeria monocytogenes* in host cells. *Infect. Immun.* **66**:3775-3782.
156. **Lampidis, R., R. Gross, Z. Sokolovic, W. Goebel, and J. Kreft.** 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.
157. **Lampidis, R.** 1997. *Molekulare Charakterisierung des plcA/prfA-Virulenzgenbereichs von L. seeligeri.* Dissertation. Würzburg.
158. **Lasa, I., V. David, E. Gouin, J.-B. Marchand, and P. Cossart.** 1995. The amino-terminal part of ActA is critical for actin-based motility of *Listeria monocytogenes*; the central proline-rich region acts as a stimulator. *Mol. Microbiol.* **18**:425-436.
159. **Lasa, I., V. David, E. Gouin, M. Goethals, K. Vancompernelle, V. David, J. Vandekerckhove, and P. Cossart.** 1997. Identification of two regions in the N-terminal domain of ActA involved in the actin comet tail formation by *Listeria monocytogenes*. *EMBO J.* **16**:1531-1540.
160. **Leblond-Francillard, M., J. L. Gaillard, and P. Berche.** 1989. Loss of catalase activity in Tn1545-induced mutants does not reduce growth of *Listeria monocytogenes* in vivo. *Infect. Immun.* **57**:2569-2573.
161. **Lebrun, M., J. Mengaud, H. Ohayon, F. Nato, and P. Cossart.** 1996. Internalin must be on the bacterial surface to mediate entry of *Listeria monocytogenes* into epithelial cells. *Mol. Microbiol.* **21**:579-592.
162. **Lecuit, M., H. Ohayon, L. Braun, J. Mengaud, and P. Cossart.** 1997. Internalin of *Listeria monocytogenes* with an intact leucine-rich repeat region is sufficient to promote internalization. *Infect. Immun.* **65**:5309-5319.
163. **Lecuit, M., S. Dramsi, C. Gottardi, M. Fedor-Chaiken, B. Gumbiner, and P. Cossart.** 1999. A single amino acid in E-cadherin responsible for host specificity towards the human pathogen *Listeria monocytogenes*. *EMBO J.* **18**:3956-3963.
164. **Lecuit, M., R. Hurme, J. Pizarro-Cerda, H. Ohayon, B. Geiger, and P. Cossart.** 2000. A role for alpha- and beta-catenins in bacterial uptake. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**:10008-10013.
165. **Leighton, I., D. R. Threlfall, and C. L. Oakley.** 1975. Phospholipase C activity in culture filtrates from *Listeria monocytogenes*, p. 239-241. In M. Woodbine (ed.), *Problems of listeriosis*. Leicester University Press, Leicester, England.
166. **Leimeister-Wächter, M., and T. Chakraborty.** 1989. Detection of listeriolysin, the thiol-dependent hemolysin in *Listeria monocytogenes*, *Listeria ivanovii* and *Listeria seeligeri*. *Infect. Immun.* **57**:2350-2357.
167. **Leimeister-Wächter, M., C. Haffner, E. Domann, W. Goebel, and T. Chakraborty.** 1990. Identification of a gene that positively regulates expression of listeriolysin, the major virulence factor of *Listeria monocytogenes*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **87**:8336-8340.

168. **Leimeister-Wächter, M., E. Domann, and T. Chakraborty.** 1991. Detection of a gene encoding a phosphatidylinositol-specific phospholipase C that is co-ordinately expressed with listeriolysin in *Listeria monocytogenes*. *Mol. Microbiol.* **5**: 361-366.
169. **Leimeister-Wächter, M., E. Domann, and T. Chakraborty.** 1992. The expression of virulence genes in *Listeria monocytogenes* is thermoregulated. *J. Bacteriol.* **174**:947-952.
170. **Lindsay, J. A., A. Ruzin, H. F. Ross, N. Kurepina, and R. P. Novick.** 1998. The gene for toxic shock toxin is carried by a family of mobile pathogenicity islands in *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* **29**:527-543.
171. **Lingnau, A., E. Domann, M. Hudel, M. Bock, T. Nichterlein, J. Wehland, and T. Chakraborty.** 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.
172. **Lingnau, A., T. Chakraborty, K. Niebuhr, E. Domann, and J. Wehland.** 1996. Identification and purification of novel internalin-related proteins in *Listeria monocytogenes* and *Listeria ivanovii*. *Infect. Immun.* **64**:1002-1006.
173. **Loisel, T. P., R. Boujema, D. Pantaloni, and M.-F. Carlier.** 1999. Reconstitution of actin-based motility of *Listeria* and *Shigella* using pure proteins. *Nature.* **401**:613-616.
174. **Lorber, B.** 1997. Listeriosis. *Clin. Infect. Dis.* **24**:1-11.
175. **MacDonald, T. T., and P. B. Carter.** 1980. Cell-mediated immunity to intestinal infection. *Infect. Immun.* **28**:516-523.
176. **Maguin, E., P. Duwat, T. Hege, D. Ehrlich, and A. Gruss.** 1992. New thermosensitive plasmid for gram-positive bacteria. *J. Bacteriol.* **174**:5633-5638.
177. **Maguin, E., H. Prévost, S. D. Ehrlich, and A. Gruss.** 1996. Efficient insertional mutagenesis in Lactococci and other gram-positive bacteria. *J. Bacteriol.* **178**:931-935.
178. **Marquis, H., V. Doshi, and D. A. Portnoy.** 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.
179. **McLauchlin, J.** 1990. Distribution of serovars of *Listeria monocytogenes* isolated from different categories of patient with listeriosis. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **9**:210-214.
180. **Mengaud, J., J. Chenevert, C. Geoffroy, J. L. Gaillard, and P. Cossart.** 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.* **56**:766-772.
181. **Mengaud, J., M.-F. Vicente, J. Chenevert, J. M. Pereira, C. Geoffroy, B. Giquel-Sanzey, F. Baquero, J. C. Perez-Diaz, and P. Cossart.** 1988. Expression in *Escherichia coli* and sequence analysis of the listeriolysin O determinant of *Listeria monocytogenes*. *Infect. Immun.* **56**:766-772.
182. **Mengaud, J., M.-F. Vicente, and P. Cossart.** 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.
183. **Mengaud, J., C. Geoffroy, and P. Cossart.** 1991. Identification of a new operon involved in *Listeria monocytogenes* virulence: its first gene encodes a protein homologous to bacterial metalloproteases. *Infect. Immun.* **59**:1043-1049.
184. **Mengaud, J., S. Dramsi, E. Gouin, J. A. Vázquez-Boland, G. Milon, and P. Cossart.** 1991. Pleiotropic control of *Listeria monocytogenes* virulence factors by a gene that is autoregulated. *Mol. Microbiol.* **5**:2273-2283.
185. **Mengaud, J., C. Braun-Breton, and P. Cossart.** 1991. Identification of phosphatidylinositol-specific phospholipase C activity in *Listeria monocytogenes*: a novel type of virulence factor? *Mol. Microbiol.* **5**:367-372.
186. **Mengaud, J., H. Ohayon, P. Gounon, R.-M. Mège, and P. Cossart.** 1996. E-cadherin is the receptor for internalin, a surface protein required for entry of *L. monocytogenes* into epithelial cells. *Cell.* **84**:923-932.
187. **Mounier, J., A. Ryter, M. Coquis-Rondon, and P. J. Sansonetti.** 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.
188. **Müller, S., T. Hain, P. Pashalidis, A. Lingnau, E. Domann, T. Chakraborty, and J. Wehland.** 1998. Purification of the *inlB* gene product of *Listeria monocytogenes* and demonstration of its biological activity. *Infect. Immun.* **66**:3128-3133.
189. **Murray, E. G. D., R. A. Webb, and M. B. R. Swann.** 1926. A disease of rabbits characterised by large mononuclear leucocytosis, caused by a hitherto undescribed bacillus, *Bacterium monocytogenes* (n. sp.). *J. Pathol. Bacteriol.* **29**:407-439.
190. **Nair, S., C. Frehel, L. Nguyen, V. Escuyer, and P. Berche.** 1999. ClpE, a novel member of the HSP100 family, is involved in cell division and virulence of *Listeria monocytogenes*. *Mol. Microbiol.* **31**:185-196.
191. **Nair, S., I. Debré, T. Msadek, O. Gaillot, and P. Berche.** 2000. CtsR controls classIII heat shock gene expression in the human pathogen *Listeria monocytogenes*. *Mol. Microbiol.* **35**:800-811.

192. Navarre, W. W., and O. Schneewind. 1994. Proteolytic cleavage and cell wall anchoring at the LPXTGX motif of surface proteins in gram-positive bacteria. *Mol. Microbiol.* **14**:115-121.
193. Niebuhr, K., T. Chakraborty, M. Rohde, T. Gazlig, B. Jansen, P. Köllner, and J. Wehland. 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.
194. Niebuhr, K., T. Chakraborty, P. Köllner, and J. Wehland. 1993. Production of monoclonal antibodies to the phosphatidyl choline-specific phospholipase C of *Listeria monocytogenes*, a virulence factor for this species. *Med. Microbiol. Lett.* **2**:9-16.
195. Niebuhr, K., F. Ebel, R. Frank, M. Reinhard, E. Domann, U. D. Carl, U. Walter, F. B. Gertler, J. Wehland, and T. Chakraborty. 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.
196. Nieman, R. E., and B. Lorber. 1980. Listeriosis in adults: a changing pattern. Report of eight cases and review of the literature 1968-1978. *Rev. Infect. Dis.* **2**:207-227.
197. Nishibori, T., H. Xiong, I. Kawamura, M. Arakaea, and M. Mitsuyama. 1996. Induction of cytokine gene expression by listeriolysin O and roles of macrophages and NK cells. *Infect. Immun.* **64**:3188-3195.
198. Nishimura, A., M. Morita, Y. Nishimura, and Y. Sugino. 1990. A rapid and highly efficient method for preparation of competent *Escherichia coli* cells. *Nucleic Acids Research.* **18**:6169.
199. Nyfelt, A. 1929. Etiologie de la mononucléose infectieuse. *C. R. Soc. Biol.* **101**:590-591.
200. Oelmüller, U., N. Krüger, A. Steinbüchl, and G. C. Friedrich. 1990. Isolation of procaryotic RNA and detection of specific mRNA with biotinylated probes. *J. Microb. Meth.* **11**:73-84.
201. Ohlsen, K., W. Ziebuhr, W. Reichardt, W. Witte, F. Götz, and J. Hacker. 1999. Mobile elements, phages, and genomic islands of Staphylococci and Streptococci. p. 265-287. *In* J. Kaper and J. Hacker (ed.), Pathogenicity islands and other mobile genetic elements. American Society for Microbiology, Washington D. C.
202. Parida, S. K., E. Domann, M. Rohde, S. Müller, A. Darji, T. Hain, J. Wehland, and T. Chakraborty. 1998. Internalin B is essential for adhesion and mediates the invasion of *Listeria monocytogenes* into human endothelial cells. *Mol. Microbiol.* **28**:81-93.
203. Park, S. F., and G. S. A. B. Stewart. 1990. High-efficiency transformation of *Listeria monocytogenes* by electroporation of penicillin-treated cells. *Gene.* **94**:129-132.
204. Peel, M., W. Donachie, and A. Shaw. 1988. Temperature-dependent expression of Flagella of *Listeria monocytogenes* studied by electron microscopy, SDS-PAGE and western blotting. *J. Gen. Microbiol.* **143**:2171-2178.
205. Perez-Casal, J., M. G. Capparon, and J. R. Scott. 1991. Mry, a trans-acting positive regulator of the M protein gene of *Streptococcus pyogenes* with similarity to the receptor proteins of two-component regulatory systems. *J. Bacteriol.* **173**:2617-2624.
206. Pfeuffer, T., W. Goebel, J. Laubinger, M. Bachmann, and M. Kuhn. 2000. LaXp180, a mammalian ActA-binding protein, identified with the yeast two-hybrid system colocalizes with intracellular *Listeria monocytogenes*. *Cell. Microbiol.* **2**:101-114.
207. Pirie, J. H. H. 1940. Listeria: Change of name for a genus of bacteria. *Nature.* **145**:264.
208. Pistor, S., T. Chakraborty, K. Niebuhr, E. Domann, and J. Wehland. 1994. The ActA protein of *Listeria monocytogenes* acts as a nucleator inducing reorganization of the actin cytoskeleton. *EMBO J.* **13**:758-763.
209. Pistor, S., T. Chakraborty, U. Walter, and J. Wehland. 1995. The bacterial actin nucleator protein ActA of *Listeria monocytogenes* contains multiple binding sites for host microfilament proteins. *Curr. Biol.* **5**:517-525.
210. Portnoy, D. A., P. Jacks, and D. J. Hinrichs. 1988. Role of hemolysin for the intracellular growth of *Listeria monocytogenes*. *J. Exp. Med.* **167**:1459-1471.
211. Portnoy, D. A., T. Chakraborty, W. Goebel, and P. Cossart. 1992. Molecular determinants of *Listeria monocytogenes* pathogenesis. *Infect. Immun.* **60**:1263-1267.
212. Poyart, C., E. Abachin, I. Razafimanantsoa, and P. Berche. 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.
213. Pron, B., C. Boumaila, F. Jaubert, S. Sarnacki, J.-P. Monnet, P. Berche, and J.-L. Gaillard. 1998. Comprehensive study of the intestinal stage of listeriosis in a rat ligated ileal loop system. *Infect. Immun.* **66**:747-755.
214. Racz, P., K. Tenner, and E. Mörö. 1972. Experimental *Listeria* enteritis. I. An electron microscopic study of the epithelial phase in experimental *Listeria* infection. *Lab. Invest. Meth. Cell Biol.* **26**:694-700.
215. Raffelsbauer, D., A. Bubert, F. Engelbrecht, J. Scheinflug, A. Simm, J. Hess, S. H. E. Kaufmann, and W. Goebel. 1998. The gene cluster *inlC2DE* of *Listeria monocytogenes* contains additional new internalin genes and is important for virulence in mice. *Mol. Gen. Genet.* **260**:144-158.

216. **Raveneau, J., C. Geoffroy, J.-L. Beretti, J.-L. Gaillard, J. E. Alouf, and P. Berche.** 1992. Reduced virulence of a *Listeria monocytogenes* phospholipase-deficient mutant obtained by transposon insertion into the zinc metalloprotease gene. *Infect. Immun.* **60**:916-921.
217. **Reinhard, M., K. Giehl, K. Abel, C. Haffner, T. Jarchau, V. Hoppe, B. M. Jockusch, and U. Walter.** 1995. The proline-rich focal adhesion and microfilament protein VASP is a ligand for profilins. *EMBO J.* **14**:1583-1589.
218. **Renzone, A., A. Klarsfeld, S. Dramsi, and P. Cossart.** 1997. Evidence that PrfA, the pleiotropic activator of virulence genes in *Listeria monocytogenes*, can be present but inactive. *Infect. Immun.* **65**:1515-1518.
219. **Renzone, A., P. Cossart, and S. Dramsi.** 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.
220. **Ripio, M.-T., C. Geoffroy, G. Domínguez-Bernal, J. E. Alouf, and J.-A. Vázquez-Boland.** 1995. The sulphhydryl-activated cytolysin and a sphingomyelinase C are the major membrane-damaging factors involved in cooperative (CAMP-like) hemolysins of *Listeria* ssp. *Res. Microbiol.* **146**:303-313.
221. **Ripio, M.-T., G. Domínguez-Bernal, M. Suárez, K. Brehm, P. Berche, and J.-A. Vázquez-Boland.** 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**:303-313.
222. **Ripio, M.-T., G. Domínguez-Bernal, M. Lara, M. Suárez, and J.-A. Vázquez-Boland.** 1997. A Gly145Ser substitution in the transcriptional activator PrfA causes constitutive overexpression of virulence factors in *Listeria monocytogenes*. *J. Bacteriol.* **179**:1533-1540.
223. **Ripio, M., K. Brehm, M. Lara, M. Suárez, and J.-A. Vázquez-Boland.** 1997. Glucose-1-phosphate utilization by *Listeria monocytogenes* is PrfA dependent and coordinately expressed with virulence factors. *J. Bacteriol.* **179**:7174-7180.
224. **Ripio, M.-T., J.-A. Vázquez-Boland, Y. Vega, S. Nair, and P. Berche.** 1998. Evidence for expressional crosstalk between the central virulence regulator PrfA and the stress response mediator ClpC in *Listeria monocytogenes*. *FEMS Microbiol. Lett.* **158**:45-50.
225. **Robbins, J. R., A. I. Barth, H. Marquis, E. L. de Hostos, W. J. Nelson, and J. A. Theriot.** 1999. *Listeria monocytogenes* exploits normal host cell processes to spread from cell to cell. *J. Cell Biol.* **146**:1333-1350.
226. **Rocourt, J., H. Hof, A. Schrettenbrunner, R. Malinverni, and J. Bille.** 1986. Meringie purpurulente aiguea *Listeria seeligeri* chez un adulte immunocompetent. *Schweiz. Med. Wochenschr.* **116**:248-251.
227. **Rouquette, C., M. T. Ripio, E. Pellegrini, J. M. Bolla, R. I. Tason, J.-A. Vázquez-Boland, and P. Berche.** 1996. Identification of a ClpC ATPase required for stress tolerance and in vivo survival of *Listeria monocytogenes*. *Mol. Microbiol.* **21**:977-987.
228. **Rouquette, C., C. de Chastellier, S. Nair, and P. Berche.** 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.
229. **Ruhland, G. J., M. Helwig, G. Wanner, and F. Fiedler.** 1993. Cell-surface location of *Listeria*-specific protein p60 – detection of *Listeria monocytogenes* cells by indirect immunofluorescence. *J. Gen. Microbiol.* **139**:609-616.
230. **Sallen, B. A., S. Rajoharison, S. Desverenne, F. Quinn, and C. Mabilat.** 1996. Comparative analysis of 16S and 23S rRNA sequences of *Listeria* species. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **46**:669-674.
231. **Sambrook, J., and D. Russell.** 2001. *Molecular Cloning. A laboratory manual.* Cold Spring Harbour Laboratory Press. Cold Spring Harbour.
232. **Sanger, J. M., J. W. Sanger, and F. S. Southwick.** 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.
233. **Schlech, W. F.** 1997. *Listeria* gastroenteritis – old syndrome, new pathogen. *N. Engl. J. Med.* **336**:130-132.
234. **Schlesinger, R.** 1989. Isolierung und Charakterisierung Transposon-induzierter Mutanten von *Listeria ivanovii*. Diplomarbeit. Würzburg.
235. **Schlüter, D., E. Domann, C. Buck, T. Hain, H. Hof, T. Chakraborty, and M. Deckert-Schlüter.** 1998. Phosphatidylcholine-specific phospholipase C from *Listeria monocytogenes* is an important virulence factor in murine cerebral listeriosis. *Infect. Immun.* **66**:5930-5938.
236. **Schuchat, A., B. Swaminathan, and C. v. Broome.** 1991. Epidemiology of human listeriosis. *Clin. Microbiol. Rev.* **4**:169-183.
237. **Schwan, W. R., A. Demuth, M. Kuhn, and W. Goebel.** 1994. Phosphatidylinositol-specific phospholipase C from *Listeria monocytogenes* contributes to intracellular survival and growth of *Listeria innocua*. *Infect. Immun.* **62**:4795-4803.
238. **Sechi, A. S., J. Wehland, and J. V. Small.** 1997. The isolated comet tail pseudopodium of *Listeria monocytogenes*: a tail of two actin filament populations, long and axial and short and random. *J. Cell. Biol.* **137**:155-167.
239. **Seeliger, H. P. R.** 1961. *Listeriosis.* 2nd ed. Karger, Basel.

240. Seeliger, H. P. R., J. Rocourt, A. Schrettenbrunner, P. A. D. Grimont, and D. Jones. 1984. *Listeria ivanovii* sp. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. **34**:336-337.
241. Seeliger, H. P. R., and D. Jones. 1986. Genus *Listeria*. Bergey's manual of systematic bacteriology. Vol. 2. Sneath, P. H. A., N. S. Mair, M. E. Sharpe, J. G. Holt (eds.). Williams and Wilkins, Baltimore. p. 1235-1245.
242. Sheehan, B., C. Kocks, S. Dramsi, E. Guin, A. D. Klarsfeld, J. Mengaud, and P. Cossart. 1994. Molecular and genetic determinants of the *Listeria monocytogenes* infectious process. Curr. Top. Microbiol. Immunol. **192**:187-216.
243. Sheehan, B., A. Klarsfeld, T. Msadek, and P. Cossart. 1995. Differential activation of virulence gene expression by PrfA, the *Listeria monocytogenes* virulence regulator. J. Bacteriol. **177**:6469-6476.
244. Sheehan, B., A. Klarsfeld, R. Ebricht, and P. Cossart. 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.
245. Shen, Y., M. Naujokas, M. Park, and K. Ireton. 2000. InlB-dependent internalization of *Listeria monocytogenes* is mediated by the met receptor tyrosine kinase. Cell. **103**:501-510.
246. Smith, G. A., H. Marquis, S. Jones, N. C. Johnston, D. A. Portnoy, and H. Goldfine. 1995. The two distinct phospholipases C of *Listeria monocytogenes* have overlapping roles in escape from a vacuole and cell-to-cell spread. Infect. Immun. **63**:4231-4237.
247. Smith, G. A., D. A. Portnoy, and J. A. Theriot. 1995. Asymmetric distribution of the *Listeria monocytogenes* ActA protein is required and sufficient to direct actin-based motility. Mol. Microbiol. **17**:945-951.
248. Smith, G. A., J. A. Theriot, and D. A. Portnoy. 1996. The tandem repeat domain in the *Listeria monocytogenes* ActA protein controls the rate of actin-based motility, the percentage of moving bacteria, and the localization of vasodilator-stimulated phosphoprotein and profilin. J. Cell Biol. **135**:647-660.
249. Smith, G. A., and D. A. Portnoy. 1997. How the *Listeria monocytogenes* ActA protein converts actin polymerization into a motile force. Trends Microbiol. **5**:272-276.
250. Sokolovic, Z., J. Riedel, M. Wuenscher, and W. Goebel. 1993. Surface-associated, PrfA-regulated proteins of *Listeria monocytogenes* synthesized under stress conditions. Mol. Microbiol. **8**:219-227.
251. Suárez, M., B. González-Zorn, Y. Vega, I. Chico-Calero, and J.-A. Vázquez-Boland. 2001. A role for ActA in epithelial cell invasion by *Listeria monocytogenes*. Cell. Microbiol. **3**:853-864.
252. Sun, A. N., A. Camilli, and D. A. Portnoy. 1990. Isolation of *Listeria monocytogenes* small-plaque mutants defective for intracellular growth and cell-to-cell spread. Infect. Immun. **58**:3770-3778.
253. Swartz, M. A., D. F. Welch, R. P. Narayanan, and R. A. Greenfield. 1991. Catalase-negative *Listeria monocytogenes* causing meningitis in an adult: clinical and laboratory features. Am J. Clin. Pathol. **96**:130-133.
254. Theriot, J. A., T. J. Mitchinson, L. G. Tilney, and D. A. Portnoy. 1992. The rate of actin-based motility of intracellular *Listeria monocytogenes* equals the rate of actin polymerization. Nature. **357**:257-260.
255. Theriot, J. A., J. Rosenblatt, D. A. Portnoy, P. J. Goldschmidt-Clermont, and T. J. Mitchinson. 1994. Involvement of Profilin in the actin-based motility of *L. monocytogenes* in cells and in cell-free extracts. Cell. **76**:505-517.
256. Tilney, L. G., and D. A. Portnoy. 1989. Actin filaments and the growth, movement, and spread of the intracellular bacterial parasite, *Listeria monocytogenes*. J. Cell Biol. **109**:1597-1608.
257. Tilney, L. G., P. S. Connelly, and D. A. Portnoy. 1990. Actin filament nucleation by the bacterial pathogen, *Listeria monocytogenes*. J. Cell Biol. **111**:2979-2988.
258. Vázquez-Boland, J.-A., L. Domínguez, E. F. Rodríguez-Ferri, and G. Suárez. 1989. Purification and characterization of two *Listeria ivanovii* cytolysins, a sphingomyelinase C and a thiol-activated toxin (ivanolysin O). Infect. Immun. **57**:3928-3935.
259. Vázquez-Boland, J.-A., C. Kocks, S. Dramsi, H. Ohayon, C. Geoffroy, J. Mengaud, and P. Cossart. 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.
260. Vázquez-Boland, J.-A., M. Kuhn, P. Berche, T. Chakraborty, G. Domínguez-Bernal, W. Goebel, B. González-Zorn, J. Wehland, and J. Kreft. 2001. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. Clin. Microbiol. Reviews. p. 584-640.
261. Vázquez-Boland, J.-A., G. Domínguez-Bernal, B. González-Zorn, J. Kreft, and W. Goebel. 2001. Pathogenicity islands and virulence evolution in *Listeria*. Microb. Infect. **3**:571-584.
262. Vega, Y., C. Dickneite, M.-T. Ripio, R. Böckmann, B. González-Zorn, S. Novella, G. Domínguez-Bernal, W. Goebel, and J.-A. Vázquez-Boland. 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.
263. Walker, S. J., and M. F. Stringer. 1987. Growth of *Listeria monocytogenes* and *Aeromonas hydrophila* at chill temperatures. J. Appl. Bacteriol. **63**:R20.

264. **Wawrzynow, A., B. Banecki, and M. Zylicz.** 1996. The Clp ATPases define a novel class of molecular chaperones. *Mol. Microbiol.* **21**:895-899.
265. **Weiglein, I., W. Goebel, J. Troppmair, U. R. Rapp, A. Demuth, and M. Kuhn.** 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.
266. **Welch, M. D., A. Iwamatsu, and T. J. Mitchison.** 1997. Actin polymerization is induced by Arp2/3 protein complex at the surface of *Listeria monocytogenes*. *Nature* **385**:265-269.
267. **Welch, M. D., J. Rosenblatt, J. Skoble, D. A. Portnoy, and T. J. Mitchison.** 1998. Interaction of human Arp2/3 complex and the *Listeria monocytogenes* ActA protein in actin filament nucleation. *Science* **281**:105-108.
268. **Williams, J. R., C. Thayyullathil, and N. E. Freitag.** 2000. Sequence variations within PrfA DNA binding sites and effects on *Listeria monocytogenes* virulence gene expression. *J. Bacteriol.* **182**:837-841.
269. **Wood, S., N. Maroushek, and C. J. Czuprinski.** 1993. Multiplication of *Listeria monocytogenes* in a murine hepatocyte cell line. *Infect. Immun.* **61**:3068-3072.
270. **Wuenschel, D. M., S. Köhler, W. Goebel, and T. Chakraborty.** 1991. Gene disruption by plasmid integration in *Listeria monocytogenes*: insertional inactivation of the listeriolysin determinant *lisA*. *Mol. Gen. Genet.* **228**:177-182.
271. **Wuenschel, D. M., S. Köhler, A. Bubert, U. Gerike, and W. Goebel.** 1993. The *iap* gene of *Listeria monocytogenes* is essential for cell viability, and its gene product, p60, has bacteriolytic activity. *J. Bacteriol.* **175**:3491-3501.
272. **Yao, Z., D. H. Jones, and C. Grose.** 1992. Site-directed mutagenesis of Herpesvirus glycoprotein phosphorylation sites by recombination polymerase chain reaction. *PCR Methods and Applications.* **1**:205-207.
273. **Zalevsky, J., I. Grigorova, and R. D. Mullins.** 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.

8 Anhang

8.1 Sequenzen

8.1.1 Sequenz des analysierten Bereichs upstream (rechts) von *smcL*

Nachfolgend ist die Sequenz des durch Genome Walking und Sequenzierungen analysierten Genom-Abschnitts rechts des *smcL*-Gens von *L. ivanovii* gezeigt. Die Start- und Stopcodons der einzelnen Gene bzw. Open Reading Frames sind durch Fettdruck hervorgehoben, ebenso die potentiellen Ribosomenbindungsstellen (RBS). Zudem sind mögliche PrfA-Boxen und Terminatoren in der Sequenz markiert.

Die Nukleotidsequenz ist doppelsträngig dargestellt, die Größe in Basenpaaren (bp) kann anhand der seitlich angegebenen Zahlen abgelesen werden. Zudem sind zu den einzelnen neu identifizierten Genen bzw. ORFs die zugehörigen Aminosäureabfolgen unterhalb der Nukleotidsequenz angegeben.

(Linear) MAP of: conneu4.txt check: 2539 from: 1 to: 14130

Contig[2019]

```

TATTAGATAGGATGAGGTTAGCATAACGAGTTTTAGGTTATTTCTCCGCGAAAACAAGC
1 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
ATAATCTATCCTACTCCAATCGTATTGCTCAAAATCCAAATAAAGAGGCGCTTTTGTTCG

                PrfA-Box
GAAAAAAAATTAACTTTTGTTATATACATAATTCTTTTCTTTTACTAGAAATATATAATTGA
61 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 120
CTTTTTTTAATTGAAAACAATATATGTATTAAAGAAAAGAAAATGATCTTATATATTAACT

AATGTGTAAAAGATTTGTGGATATTTAGTTAGGTGACAAAATATAGTCCATTGAAAATT
121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 180
TTACACATTTTCTAAACACCTATAAATCAATCCACTGTTTTATATCAGGTAAGCTTTTAA

                                RBS                ▶Start i-inlF
GTTTTTGGTGTTCCTAATTTATGTAAGGGGGAGTGTAAAATCGTTGAGGAAAAATGACTGGT
181 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 240
CAAAAACCACAAAGATTAAATACATTCCCCCTCACATTTAGCAACTCCTTTTTACTGACCA

TGAAAAATGTTTTAATAACAATTTTAGTAACAGTTTTTGTGTATGCGTCAACATGAGTT
241 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 300
ACTTTTTACAAATTTATGTTAAAATCATGTCAAAAACAACATACGCAGTTGTACTCAA

TGGAAACAAAGGCACAAGCAGCTAATATTCACACCCGCTGCCAATTAATCGAATCTTTC
301 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 360
ACCTTTGTTTCCGTGTTTCGATTATAAGGTGTGGGCGACGGTTAATTAGCTTAGAAAAG

CAGATCCTGATCTAGCGAAAGAGTGAAAGAAACCCTTAAAAAGAGCAATGTAACAGATG
361 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 420
GTCTAGGACTAGATCGCCTTCTCACTTCTTTGGGAATTTTTCTCGTTACATTGTCTAC

TTGTTTCGAAAGGGAAGTAGATGAAGTGCAAATATCAATGGAAATGGTCGCACTATTA
421 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 480
AACAAAGCGTTTCCCTTGATCTACTTCACGTTTATAAGTTACCTTTACCAGCGTGATAAT

TATCTATTGATGGCTTACAATACTTTACTAATTTAAAAGAGTTATATCTGTGCGTAATC
481 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 540
ATAGATAACTACCGAATGTTATGAAATGATTAATTTTCTCAATATAGACAGCGCATTAG

ACATCCGAGATCTTACTCCTTTAAAAGATTTAACTAATTTAGCGATACTTTGTTTGGATA
541 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 600
TGTAGGCTCTAGAATGAGGAAATTTTCTAAATTTGATTAATTCGCTATGAAACAAACCTAT

AAAATAGGCTAGAAAATTTGAATGGCATTCCAAGTAACAAATTAGTCCGTTTATCGCTCG
601 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 660
TTTTATCCGATCTTTTAAACTTACCGTAAAGTTCATGTTAATCAGGCAAATAGCGAGC

AAGATAATGAACTCACACAGGTTGATGCCCTTGCTAATTTGACGCAACTAGAAACATTGT
661 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 720
TTCTATTACTTGAGTGTGTCCAACTTACGGGAACGATTAACTGCGTTGATCTTTGTAACA

```

TTATTAGTAAAAATCAGCTGAAAAACATTGATGCCCTTGCTAATTTAACCAACCTAAAAA
 721 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 780
 AATAATCATTTTTAGTCGACTTTTTGTAACACTACGGGAACGATTAAATGGTTGGATTTTT

 CATTGGATTTAAATAGAAATGAACTAGAAGATTTAAGCCCATTAGCAAGATTAGAGAATC
 781 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 840
 GTAACCTAAATTTATCTTTACTTGATCTTCTAAATTCGGGTAATCGTTCATCTCTTAG

 TAACCTCGCTTGATTTGGCTAATCAGAAATGTGTAAAGGAAGCATTAGTATACAAACCCA
 841 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 900
 ATTGGAGCGAACTAAACCGATTAGTCTTTACACATTTCCCTTCGTAATCATATGTTTGGGT

 AATTAGTTATTCCAAATACTATTAAAGGTCCGGATAAAGTCTTAATTACCCCAAGCTATA
 901 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 960
 TTAATCAATAAGGTTTATGATAATTTCCAGGCCTATTTCAGAATTAATGGGGTTCGATAT

 TTAGCGATAACGGAAGCTATACAAATGGTCAACTCAAATGGAACCTACCTGTTTGTAAAGG
 961 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1020
 AATCGCTATTGCCTTCGATATGTTTACCAGTTGAGTTTACCTTGAATGGACAAACATTCC

 AAAAAGTATGCTATACATTTGCGCAGCTTGTACGAGTTGGGAAAACAGAGGTCGTATTTA
 1021 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1080
 TTTTTCATACGATATGTAACGCGTCGAACATGCTCAACCCTTTTGTCTCCAGCATAAAT

 ATGGTGTGGTTATCCAGCCATTATACCCAAAGAAGCTAGAGACTAAAAAAGAGCTTCAT
 1081 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1140
 TACCACCAATAGGTCGGTAATATGGGTTTCTTCGATCTCTGATTTTTTCTCGAAGTA

***i-inlF* Stop◀**
 TTTACCTATGTGGTTTAAACAAAATAAATGATGATAACTAACTTCAAATAGTTTTATACAA
 1141 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1200
 AAATGGATACACCAAATTGTTTTATTACTACTATTGATTGAAGTTTATCAAAATATGTT

 TATATATTAATTTCCCTTAGCCATTATATTAACCTTAAGAAAATCTTCAAACGTGAACC
 1201 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1260
 ATATATAATTAAGGGAATCGGTAATATAAATTGAATCTTTTAGAAGTTTGCCTTGG

 CCTAGGAATAAAAGATAGTAAACGATTTGAAGATTTTTTGTGTTTATTATTTCCGTTT
 1261 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1320
 GGATCCTTAATTTTCTATCATTTGCTAAACTTCTAAAAACACAAGTAAATAAAGGCAAA

 TAATGGTACTTTTTGCAGTAAATTCATCCTTTATTAGTATGAAAAGCTATACACATTTA
 1321 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1380
 ATTAACCATGAAAACGTCATTTAAGTAGGAAATAATCATACTTTTCGATATGTGTAAT

PrfA-Box
 TAATGTTTATCTAAAAAGTGAATCGTTTAAACATTTGTTAAATGACGAGAATTTATATTTT
 1381 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1440
 ATTACAAATAGATTTTTCACCTTAGCAAATTGTAACAATTACTGCTCTTAAATATAAAG

 AAGTATGATGTGTATATAGAGATGAGGAAAATGGATGTGAAAGAATTTGAATGAAGAGAA
 1441 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1500
 TTCATACTACACATATATCTCTACTCCTTTTACCTACACTTCTTAAACTTACTTCTCTT

RBS
 ATTTTCAGAAAGGTTCCGCATGAAAATTTTCCTTTTCTAATTTTTTTAAAGGAGTGAAGA
 1501 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1560
 TAAAAGTCTTTCCAAGGCGTACTTTTTAAAGGAAAAGATTAAAAAATTTTCCTCACTTCT

▶Start *i-inlE*
 TCAGTGAAGAAAAGTAATTTGGTTAAAAAGTGTAGTAGTAGCAATGTTAGTATTAATTGTA
 1561 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1620
 AGTCACTCTTTTTTCATTAACCAATTTTTCACATCATCATCGTTACAATCATAATTAACAT

 GGTTTTTGTATTAATATTTGGTTCTGGAACAAAGGTACATGCCGCAAATATTTTACATCCG
 1621 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1680
 CCAAAAACATAATTATAACCAAGACCTTGTTTCCATGTACGGCGTTTATAAAATGTAGGC

 ATGCCTATTAATCAAATTTTCCAGATCTGATCTAGCGAAAGTAGTAAAACGAACTTTA
 1681 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1740
 TACGGATAATTAGTTTAAAAAGGTCTAGGACTAGATCGCTTTCATCATTTTGCCTGAAAT

```

GGAAAACAAAGTGTACAGATGTAGTTTCTCAAAGGAACTAGATAGCGTACAAGGATTA
1741 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1800
CCTTTTGTTCACAATGTCTACATCAAAGAGTTTTCCCTTGATCTATCGCATGTTCCCTAAT

AATGGTAATGAAAGCAACATTAAGTCCCTGGAAGGATTACAACATTTTAATAAATTAGAA
1801 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1860
TTACCATTACTTTTCGTTGTAATTCAGGACCTTCCTAATGTTGTAATAATATTTAATCTT

GTGCTATTTTTAGCTTCTAATCAAATAAAGGATATTACTCCATTGAAAAATTTAACCAAT
1861 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1920
CACGATAAAAAATCGAAGATTAGTTTATTTCTATAATGAGGTAACCTTTTAAATTGGTTA

CTAAAAGTATTAGATTTGAAAGTGAATCAAATAAGTGATTAAACACCATTATATGGTTTG
1921 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1980
GATTTTCATAATCTAACTTTCCTTAGTTTATTCACTAAATTGTGGTAATATACCAAAC

AAAAATTTAACCTCTCTAGATGTGGTTTATCAAAAAATAGTTGAAACACCGGTGACTTAC
1981 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2040
TTTTTAAATTGGAGAGATCTACACCAAATAGTTTTTTTATCAACTTTGTGGCCACTGAATG

GAGCCAGACTTGGTTATTCAGTTACGGTTAAAAAACCAGATGGAAGCTTAGTTACTCCA
2041 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2100
CTCGGTCTGAACCAATAAGGTCAATGCCAATTTTTTGGTCTACCTTCGAATCAATGAGGT

AAATGTATTACAGATAACGGAGCCTATATATATGATGATATTATTTGGAAGTTGCCAGCT
2101 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2160
TTTACATAATGTCTATTGCCTCGGATATATACTACTATAATAAACCTTGAACGGTCGA

TATAAAAAAGAAGTAAGTTATAAATTTGGGGAACGTATCCAAGTGGGGAAAGTAAGTACC
2161 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2220
ATATTTTTTCTTCATTCAATATTTAAACCCTTGCATAGGTTCACCCCTTTCATTCATGG

                                i-inlE Stop
ACATTTACTGGTATGGTGAAACAGCCATTGACACGCTGACATCAAGGATTTTAGGATAAA
2221 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2280
TGTAATGACCATAACCACTTTGTCCGTAAGTGTGCGACTGTAGTTCCATAAATCCTATTT

                                Terminator
ACTTGGAGGATTTCAAAAAATCTAAACCCTCGCATTGCGGGGGTTTTTATATTTTGA
2281 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2340
TGAACCTCCTAAAGTTTTTTAGATTTGGGAGCGTAAAACGCCCAAAAAATATAAACT

TTTAATAAAAAATATCTATACAAGTAAAATACTAACTTTTTCTTATAAAATAATTTTAAG
2341 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2400
AAATTATTTTTTATAGATATGTTTCAATTTATGATTGAAAAAGAATATTTATTAATAATTC

TGGAGATACATATTTGAAACAGGTTAAAAAGATTGTGAAGTATGTAAGTAGGTTTTTATT
2401 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2460
ACCTCTATGTATAAACTTTGTCCAATTTTCTAACACTTCATACATTCAACAAAAATAA

AACCTTGATAATCTTTTTGATCTTTCTATTTTATTTAAAAGGAGAGTAAAGAGTAGAG
2461 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2520
TTGGGAACATTAAGAAAAACTAGAAAGATAAAATAAATTTTCTCTCATTTCTCATCTC

GAATTAAGTATGATTCTGCCTTTTTCAAACCTAAGAGGGCTTTATTGGAGTACAAATTA
2521 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2580
CTTAATTCATACTAAGACGGAAAAAGTTTGGATTCTCCGAAATAACCTCATGTTTAATT

ATAGATAAAATAATTGTAAGGGCTAGAACTGGTCTATAAAATATACTCCTTTAATATAAA
2581 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2640
TATCTATTTTATTAACATTCCCGATCTTGACCAGATATTTTATATGAGGAAATTATATTT

CGAGTAGAGGATAGTATGCCTATTTAATAATACACTTCAATAGAGCATTTTTTGTTAAAG
2641 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2700
GCTCATCTCCTATCATAACGATAAATTTATATGTGAAGTTATCTCGTAAAAACAATTTCT

AAAAACGAGCTATTTTTATTTTTATAATAATATATAAACAAAAATGATTCTCAAATAACTA
2701 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2760
TTTTTGCTCGATAAAAAATAAATATTATATATATTTGTTTACTAAGAGTTTATTTGAT

```


2761 CACCAATACAAGCCCAGCAAGGAAGTCTCGAATATATTAATCTAGTGACAGGAACTCCTG 2820
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 GTGGTTATGTTTCGGGTCGTTCCCTTCAGAGCTTATATAAATTAGATCACTGTCCTTGAGGAC

 2821 TTTTGTATAATAACAACAATACTATATACATATATATACAGTCCTTATTTTAAAT 2880
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 AAAACAATATTATGTTGTTGATTAGATATATGTATATATATGTCAGGAATAAAATTTTA

 2881 TATGTTAAAAATAGTAATAAATTCCTCCTAGTTACTATAAAAAATAGATAGTAACTTATT 2940
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 ATACAATTTTTATCATTATTTAAGAAGGATCAATGATATTTTTATCTATCATTGAAATA

 2941 CAAAAATGAATTTTTTGTGACAGCTTAATTTAACTTTGCATAAATTGTAATAATGACTC 3000
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 GTTTTACTTAAAAAACACTGTCGAATTAATTGAAACGTATTTAACATTTATTACTGAG

 3001 AAAGAAAGAATTTTTAAGCATAAAAAATCATTATCAGGCTCAAGCCCATGTAACAATTTT 3060
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 TTTCTTCTTATAAAAATTCGTATTTTTTAGTAATAGTCCGAGTTCGGGTACATTGTTAAAA

 3061 CTTAAGACAACCATTTTTATTGCCATCTGAAATAAAAAGGTAGCACTTCTTTACAGTTTC 3120
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 GAATCTGTTGGTAAAAATAACGGTAGACTTTATTTTTCCATCGTGAAGAAATGTCAAAG

 RBS
 3121 GGTTATACATACCTTACTCATGTTATCCTATATTTCTAAAAACATCTTAGAAA**GAGGG**AAA 3180
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 CCAATATGTATGGAATGAGTACAATAGGATATAAAGATTTTGTAGAATCTTCTCCCTTT

►Start ORF3
 3181 **ACATG**AAAAAACAATGGATAATTACAGTAGCCGCTTGTTCATTTTTGCAAACATAGCAC 3240
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 TGTACTTTTTTGTACCTATTAATGTCATCGGCCGAACAAAGTAAAAACGTTTGTATCGTG
 M K K Q W I I T V A A C F I F A N I A P -

 3241 CATCAGTCTCATTAGCTAATGAGAATCAAGAAGAAAATAGTATAGGAGGGAAGATGTCTA 3300
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 GTAGTCAGAGTAATCGATTACTCTTAGTTCTTCTTTTATCATATCCTCCCTTCTACAGAT
 S V S L A N E N Q E E N S I G G K M S T -

 3301 CCAATAGCAAGGCTGTTAATTTCTTAAATAGCAATTTAGAAAACGAGTGCAGAACCAATCA 3360
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 GGTTATCGTTCCGACAATTAAGAATTTATCGTTAAATCTTTGCTCACGCTTGGTTAGT
 N S K A V N F L N S N L E T S A E P I I -

 3361 TCCAAATGGTTACTTCTAACCAAACGGATGGTGGTGGATCTAGTTATAAATATGTTTCCA 3420
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 AGGTTTACCAATGAAGATTGGTTTGCCTACCACCACCTAGATCAATATTTATACAAAGGT
 Q M V T S N Q T D G G G S S Y K Y V S K -

 3421 AACAAGTAGTTAATTTAGAAAGCATAGGAGTTAACCTTGATACAGAGCTTTGATTGCTG 3480
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 TTGTTTCAATTAATCTTTTCGTATCCTCAATTGGAACATATGTCTCGAAACTAACGAC
 Q V V N L E S I G V N L V Y R A L I A G -

 3481 GTGGTCTTGGTTCCGTACGAATGGGAAAAGCAGCTGCTAGAGCGATGATTACAACAGGAT 3540
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 CACCAGAACCAAGGCATGCTTACCCTTTTCGTCGACGATCTCGCTACTAATGTTGTCCTA
 G L G S V R M G K A A A R A M I T T G L -

 3541 TAAGTGGTTTATTTGATACCTATAAATATATGAGGCAAACGATTTACAAAAATCAGATA 3600
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 ATTCACCAAATAAATATGGATATTTATATACTCCGTTTGCTAAATGTTTTTTAGTCTAT
 S G L F D T Y K Y M R Q T I Y K K S D K -

 3601 AAAAATATTACTATTATAAAGTTATAAATGAATTTTCAAACAGTAAAACGACTTGAAAG 3660
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 TTTTTATAATGATAATATTTCAATATTTACTTAAAAGTTTGTCAATTTGCTGAACCTTTC
 K Y Y Y Y K V I N E F S N S K T T W K G -

ORF3 Stop◀

3661 GTCCAGTAAAAACGAGTTATCAAAAAGTGAGAAGA**TAAAA**ACTATTAGGGAGCTAACCAT 3720
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 CAGGTCATTTTTGGCTCAATAGTTTTTTCACCTTCTATTTTTGATAAATCCCTCGATTGGTA
 P V K T S Y Q K V R R *

3721 CTTGAATTATAAAAAATGGATTGGATACATACTTTTTTTCATTGTAATATTTACTGCGGG 3780
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 GAACTTAATATTTTTTACCTAACCTATGTATGAAAAAAGTAACATTATAAATGACGCCC

3781 GACACTTTTATTTAAAAATTTTGATATTAGCGTATTGATTATTGCAACGATTGCCTATTC 3840
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 CTGTGAAAAATAATTTTTTAAAACTATAATCGCATAACTAATAACGTTGCTAACGGATAAG

Terminator

3841 AATAGCAATTATACCAACTATTTAAAAAGAAAAAGAATAATCTTT**CAAGATCTCAAATT** 3900
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 TTATCGTTAATATGGTTGATAATTTTTCTTTTTCTTATTAGAAAGTTTCTAGAGTTTAA

3901 **TATTTTTGAGATCTTT**TTTTAGGGGGATCAACATCCTAATAAATATACATATTTATTTGA 3960
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 ATAAAACTCTAGAAAAAATCCCCCTAGTTGTAGGATTATTTATATGTATAAATAAACT

3961 CTTCTATATGAAAAATAACCATAAATCAAGATAATTCAATTGAAAATGAAGCGTAAAATT 4020
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 GAAGATATACTTTTTATTGGTATTTAGTTCTATTAAGTTAACTTTTACTTCGCATTTTAA

4021 TATTAAGAGAGGATGACATAAACGAAGAACAATAAGCTAAAATATAAGCACCGATACAA 4080
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 ATAATCTCTCCTACTGTATTTGCTTCTGTTTTATCGATTTTATATTCGTGGCTATGTT

▶Stop ydeI

4081 AACAATCTTAAGCCTCGTGTGCGCGCTTCATTAAATTTAATCATTGAGTCCTAATCCATC 4140
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 TTGTTAGAATTCGAGCACAGCCGGAAGTAATTT**AAAT**TAGTAACTCAGGATTAGGTAG
 * D N L G L G D -

4141 AAATATCTGTTCTCGGTATTTTTCAATCCGTGAAACCCGTGTTTTAGATTGTTTTGGTG 4200
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 TTTATAGACAAGGACCATAAAAAGTTAGCCTTTGGGCACAAAATCTAACAAAACCACG
 F I Q E Q Y K E I R S V R T K S Q K P A -

4201 TGCAAAAAATAGCAAGTAAGCTCGTTGACGTCCAGGCGTTAAAGCTTCGAATGCCTCTTT 4260
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 ACGTTTTTATCGTTCATTTCGAGCAACTGCAGTCCGCAATTTCAAGCTTACGGAGAAA
 A F F L L Y A R Q R G P T L A E F A E K -

4261 AAATGCAGGTAGCTCGTCAAATTTTCGTTTGAAGTCTTCGGAATAGGGAATTCTCTATC 4320
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 TTTACGTCCATCGAGCAGTTTAAAGCAAACCTCAAGAAGCCCTTATCCCTTAAGAGATAG
 F A P L E D F K T Q L E E P I P F E R D -

4321 CTGCTTCATCGCCACTTTTAGACCTGCAGCTTCTACTTCGATTGCATTTTGAATGTAAC 4380
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 GACGAAGTAGCGGTGAAAATCTGGACGTCAAGATGAAGCTAACGTAAAACCTTACATTGA
 Q K M A V K L G A A E V E I A N Q I Y S -

4381 TTTTAAAGTAGACTCCATATCTAAAATTTGTTGAAGGTTAGTGAATCTGATTTGCCTTGC 4440
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 AAAATTTTCATCTGAGGTATAGATTTTTAAACAACCTCCAATCACTTAGACTAAACGGAACG
 K L T S E M D L I Q Q L N T F R I Q R A -

4441 AGCTTGACATTTTTCGGTTTGTGTACTAAAATATTTGCAGGATCACGTAGTAGCGCACC 4500
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 TCGAACGTGTAAGCCAAACAACATGATTTTATAAACGTCTAGTGCATCATCGCGTGG
 A Q V N E T Q Q V L I N A P D R L L A G -

4501 TTTCATAAATAGAAGGGCACAGTATTTTAAAGCCATGAATGAGGAAGATATTGCCACT 4560
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 AAAGTATTTATCTTCCCGTGCATAAGAAATTTTCGGTACTTACTCCTTCTATAACGGTGA
 K M F L L A C Y E K F G H I L F I N G S -

```

GTTTAAAGCGTAACAAGGTTTGCCCCATTGAACTCTTCTGTTAGTCCAAACTCGACTGC
4561 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 4620
CAAATTTTCGCATTGTTCCAAACGGGGTAAACTTGAGAAGACAATCAGGTTTGAGCTGACG
  N L A Y C P K G W K F E E T L G F E V A -
AATTGCTCTTAAAGCTTTAAATTCTGCTTGCCAGTTGCTTGGTTTGTAAAGTAAAGCATC
4621 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 4680
TTAACGAGAATTTGAAATTTAAGACGAACGGTCAACGAACCAAACAATTCATTTTCGTAG
  I A R L A K F E A Q W N S P K N L L A D -
                                ydeI Start◀                RBS
TACTTTTGGATTTAATTCGGTTTTTGCCATAAAAGAATACCTCGTTTCACTTGTATTATCA
4681 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 4740
ATGAAAACCTAAATTAAGGCAAAAACGGTATTTTCTTATGGAGCAAAGTGAACAAATAGT
  V K P N L E T K A M -
TTCTGTGGTACGTGTTATTTAACTTAAATGAAAGGCCTTGCAAATGGATGAAAAGAA
4741 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 4800
AAGACCCATGCACAATAAAATTGAATTTTACTTTCCGGAACGTTTAACTACTTTTCTT
                                ▶Stop ORF5
AGAACCTGAAAGCTATTCAGATTCTTTTTGAAATTAAGATAAATTAATTGCCAACCA
4801 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 4860
TCTTGGACTTTCGATAAGGTCTAAGAAAAACTTTAATTCTATTTAATTTAACGGTTGGT
                                * S L N F Q W G -
ATACCAAAGCGATCAGTAACCTGACCATATTTTTCTGACCAAAAAGTCTTGGTAAGTGGC
4861 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 4920
TATGGTTTCGCTAGTCATTGGACTGGTATAAAAAGACTGGTTTTTTCAGAACCATTCACCG
  I G F R D T V Q G Y K E S W F T K T L P -
ATGATGACTGTACCACCTCAGAAAGTTGGTTAAATTGCTTAGTAAGTGCATTTTCATCA
4921 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 4980
TACTACTGACATGGTGAAGTCTTTCAACCAATTTAACGAATCATTCAACGTAAAGTAGT
  M I V T G G E S L Q N F Q K T L Q M E D -
GCTGTATCAATCACTAAGGTAATATTATCACCAAAAGTGAAGTGGCATAGATTTAGGAATA
4981 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 5040
CGACATAGTTAGTGATTCCATTATAAATAGTGGTTTTTCACTCACCGTATCTAAATCCTTAT
  A T D I V L T I N D G F T L P M S K P I -
TCAGAAAACATCACTTTTACCCCATCAATCAGCAAACCTAGCATTCATCACTAGATCTTTT
5041 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 5100
AGTCTTTTGTAGTGAATAAGGGTAGTTAGTCGTTTGATCGTAAGTAGTGATCTAGAAAA
  D S F M V K V G D I L L S A N M V L D K -
ACCTCGTCATCAATCGGTTTCAATTTCTGGATGGACTTCGCCGTACGTCAATTAATCTGTA
5101 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 5160
TGGAGCAGTAGTTAGCCAAGTAAAAGACCTACCTGAAGCGGCATGCAGTAATTTAGACAT
  V E D D I P E N E P H V E G Y T M L D T -
CATGTACCCCAAAAACCTTCTTCATAAAACGTAATAGCATCTCTGGATTGTGTCCGAAA
5161 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 5220
GTACATGGGGGTTTTTGAAGAAGTATTTGCATTATCGTAGAGACCTAACACAGGCCTTT
  C T G G F V E E Y F T I A D R S Q T R F -
                                ORF5 Start◀                RBS
GTCAAATAAACATTTTAAACCATTTGAACTCCTCCTCGATTTATATTCGTTCAAGTAAGA
5221 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 5280
CAGTTTATTTGTAATTTTGGTAACTTGAGGAGGAGCTAAATATAAGCAAGTTCATTCT
  T L Y V N L V M -
ATCATTTAAGTGATTTTATTATAGCAGATGCAGTTGAAAAGAGGAAAAATTAAGATAATC
5281 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 5340
TAGTAAATTCATAAAATAATATCGTCTACGTCAACTTTTCTCTTTTAAATCTATTAG
                                RBS
AATTGTTTACTTGGAGTTACTCCAGGATGGTAGACTATAAATAAGCCATATTTTGGAGG
5341 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 5400
TTAACAAACTGAACCTCAATGAGGTCCTACCATCTGATATTTATTTCGGTATAAAACCTCC

```

►Start ORF6

GAATTAGATGAAAAAAAAATAGTATATTTAATGCGTCATGGACAAACATTGTTTAATGAACG
 5401 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 5460
 CTTAATCTACTTTTTTATCATATAAAATTACGCAGTACCTGTTTGTAACAAATTACTTGC
 M K K I V Y L M R H G Q T L F N E R -

 AAAAAAATTCAAGGTTTTTGTGATGCACCCTGACAGAACTTGAATCAAACAAGCCAA
 5461 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 5520
 TTTTTTTAAGTTCCAAAAACACTACGTGGTGACTGTCTTGAACCTTAGTTTGTTCGGTT
 K K I Q G F C D A P L T E L G I K Q A K -

 AATAGCGGGAAGCTACTTTCAAGAAAATAATATCCAGTTTGATAAAGTCTACAGTTCCAC
 5521 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 5580
 TTATCGCCCTTCGATGAAAGTTCTTTTATATAGGTCAAACCTATTTTCAGATGTCAAGGTG
 I A G S Y F Q E N N I Q F D K V Y S S T -

 ATCAGAAAGAGCTTCAGACACATTAGAATTAGTACAAAAATGGATTACATAAGATTAAA
 5581 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 5640
 TAGTCTTTCTCGAAGTCTGTGTAATCTTAATCAGTGTTTTACCTAATGTATTCTAATTT
 S E R A S D T L E L V T K M D Y I R L K -

 AGGATTGAAAGAGTGAATTTTGAACATTTAAAGGGGAAAGTGAAGAGTTAAATCCAGC
 5641 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 5700
 TCCTAACTTTCTCACCTTAAACCTTGTAATTTCCCTTTCCTTCTCAATTTAGGTGC
 G L K E W N F G T F K G E S E E L N P A -

 ACTACCATACGGAGACTTTTTTGTGCATATGGCGGGGAAACGAGAAAAAGACTTCCAAAA
 5701 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 5760
 TGATGGTATGCCTCTGAAAAACGACGTATACCGCCCTTGCTCTTTTTTCTGAAGGTTTT
 L P Y G D F F A A Y G G E R E K D F Q K -

 GCGGATAGTTTCGACGATGGAGCGTATTATGAGTCAAGAGCCGCATGAAGTGATTTTGGC
 5761 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 5820
 CGCCTATCAAAGCTGCTACCTCGCATAATACTCAGTTCTCGGCGTACTTCACTAAAACCG
 R I V S T M E R I M S Q E P H E V I L A -

 TGTTTCTCATGGAGCAGCATGTGCGCAATTTGCCCGTTACTGGGAAAACACAAGTAAAAT
 5821 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 5880
 ACAAAGAGTACCTCGTGTACACGCGTTAAACGGGCAATGACCCTTTTGTGTTCAATTTA
 V S H G A A C A Q F A R Y W E N T S K I -

 TGGCAAATAAGTGGGTTGAAAAACGGGTGCATTTTAAAATTCGAATATGAACATAGCGC
 5881 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 5940
 ACCGTTTTATTACCCAACTTTTTGCCACGTAAAATTTAAGCTTATACTTGTATCGCG
 G K I S G L K N G C I L K F E Y E H S A -

 ATTTGCGCTTGTAACCTCATCAATCATGATTTTGAGAACGGAGCGCATATCGAAGCAGT
 5941 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 6000
 TAAAGCGGAACATTTGAAGTAGTTAGTACTAAAACCTCTGCTCGCGTATAGCTTCGTCA
 F R L V N F I N H D F E N G A H I E A V -

ORF6 Stop◄

TAAAACAGCAACTAAATAAAAAATAGCCTCTTAATTAGAAATAGTTCTAATAAGAGGCTA
 6001 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 6060
 ATTTTGTGTTGATTGATTTTTTATCGGAGAATTAATCTTTATCAAGATTATTCTCCGAT
 K T A T N * -

►Stop ORF7

TTTTTATTGAAATAAATTCTTTATCTTATCCAAAAACCACCAGTCAATTCATTTGCAGT
 6061 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 6120
 AAAAATAAATTTTAAAGAAATAGAATAGGTTTTTTGGTGGTCAAGTAAACGTC
 *** Q F L N K I K D L F G G T L E N A T** -

 ATCTTCTATGTTTTCTGTAAGTCCGCTTGCTTGATCTTGTAGTTCTCTGTAATATTGGT
 6121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 6180
 TAGAAGATACAAAAGACATTCAGGCGAACGAACCTAGAACATCCAAGAGACATTATAACCA
 D E I N E T L G S A Q D Q L N E T I N T -

```

AGCTTTATATTGCAGATTTTCGGTTACATTAGTTGCTTGATCGCCGAGTTCAGAAGCTTT
6181 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 6240
TCGAAATATAACGTCTAAAAGCCAATGTAATCAACGAACTAGCGGCTCAAGTCTTCGAAA
  A K Y Q L N E T V N T A Q D G L E S A K -

AGTAGTGGCATCTTCTGTCAGTTGTCCTAATTTATCCAGTGGCAATGACTCCGTTACTTT
6241 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 6300
TCATCACCGTAGAAGACAGTCAACAGGATTAATAGGTCACCGTTACTGAGGCAATGAAA
  T T A D E T L Q G L K D L P L S E T V K -

                ORF7 Start◀                RBS
ATTCTTTAAATCCTCTAAATTCATTATTTTCCTCCTTGTTTTGGGGGCTTATAATTCATC
6301 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 6360
TAAGAAATTTAGGAGATTTAAGTAATAAAAGGAGGAACAAAACCCCCGAATATTAAGTAG
  N K L D E L N M -

TTAGAGGAAGAAAGCAGGAAGTACAAACAATTCGTATTATCTAGGGGAACAAATATGGT
6361 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 6420
AATCTCCTTCTTTTCGTCCTTCATGTTTGTAAAGCATAATAGGATCCCCCTGTTTATACCA

                RBS                ▶Start rnaH
ATGATGGGATGAGGAAATGAGGACTGACATGAATAATTTAAATTTAAGTGAAGAAATTA
6421 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 6480
TACTACCCTACTCCTTTACTCCTGACTGTACTTATTAATTTAAATTCACTTCTTTAATT
                M R T D M N N L N L S E E I K -

ACGAGCAATTAATGAACTAGGATATAAAGAAGCGACACCTGTTCAAAGGAAGTTATCCC
6481 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 6540
TGCTCGTTAATTACTTGATCCTATATTTCTTCGCTGTGGACAAGTTTTCCCTCAATAGGG
  R A I N E L G Y K E A T P V Q K E V I P -

TGTTGCATTAACAGGAAAAGACATTGTGGCAAAATCACAAACAGGAAGTGGTAAAACAGC
6541 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 6600
ACAACGTAATTGTCCTTTTCTGTAACACCGTTTTAGTGTGTGTCCTTACCATTTTGTGC
  V A L T G K D I V A K S Q T G S G K T A -

CGCATTTGCGATTCCAATTGCTGAACAAGTCATTTGGGAAGAAAACAAACCTCAAGCATT
6601 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 6660
GCGTAAACGCTAAGGTTAACGACTTGTTCAGTAAACCTTCTTTTGTGAGTTTCGTAA
  A F A I P I A E Q V I W E E N K P Q A L -

AATTATCGTTCCAACCTAGAGAGCTAGCTATGCAGGTTAAAGCGGAATGACTAATATAGG
6661 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 6720
TTAATAGCAAGGTTGATCTCTCGATCGATACGTCCAATTTTCGCCTTACGTGATTATATCC
  I I V P T R E L A M Q V K A E C T N I G -

TAGATTTAAACGCATTTAAAGCTGCAGCAATTTATGGGCAATCTCCCTTTGCTAAACAAAA
6721 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 6780
ATCTAAATTTGCGTAATTTTCGACGTCGTTAAATACCCGTTAGAGGAAACGATTTGTTTT
  R F K R I K A A A I Y G Q S P F A K Q K -

ATTAGAATTAAGCCAAAAAATCATATCGTCGTTGGAACCCCGGGCGTTTGTAGACCA
6781 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 6840
TAATCTTAATTCGGTTTTTTTAGTATAGCAGCAACCTTGGGGCCCCGAAACAATCTGGT
  L E L S Q K N H I V V G T P G R L L D H -

TATTGAAAAGGCACACTTAACGTGGATAAAGTTGCTTACTTAGTTTTAGATGAAGTAGA
6841 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 6900
ATAACTTTTTCCGTGTGAATTGCACCTATTTCAACGAATGAATCAAAATCTACTTCATCT
  I E K G T L N V D K V A Y L V L D E V D -

CGAAATGTTAAGTATGGGATTCATTGATCAAGTAGAAGATATTTTGCAGTTTTTACCTAA
6901 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 6960
GCTTTACAATTCATACCCTAAGTAAGTACTAGTTCATCTTCTATAAAACGTCAAAAATGGATT
  E M L S M G F I D Q V E D I L Q F L P K -

AAAGCGCCAAAATCTATTTCTTTTCGGCAACAATGCCAGAGGAAATGCAAGATTTAATCAA
6961 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 7020
TTTCGCGTTTTAGATAAGAAAAGCCGTTGTTACGGTCTCCTTTACGTTCTAAATTAGTT
  K R Q N L F F S A T M P E E M Q D L I K -

```

```

7021  ACGATATCAAGACGATCCCATTGTTATTGAAATGGCAGCAGAAAAACAACCCAATCAC 7080
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TGCTATAGTTCTGCTAGGGTAACAATAACTTTACCGTCGTCTTTTTTGTGGGTTAGTG
R Y Q D D P I V I E M A A E K T N P I T -

7081  ACATATCGAAATGCAAACAGAGAATAAAGAAAAGACGCTCCAAGATGTTTTAATCACAGA 7140
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TGTATAGCTTTACGTTTGTCTCTTATTTCTTTTCTGCGAGGTTCTACAAAATTAGTGTCT
H I E M Q T E N K E K T L Q D V L I T E -

7141  AAATCCAGATAGTGCATTATTTTTTGTAACTAAAAATCAAGTAGATGAACTAAGTGA 7200
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TTTAGGTCTATCACGCTAATAAAAAACATTGTGATTTTAGTTCATCTACTTGATTCCT
N P D S A I I F C N T K N Q V D E L S D -

7201  CTTACTACAAGTAAATACAGCTAAAATCCATGGAGGTTTACGACAAGAAGAGCGTTTCCG 7260
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GAATGATGTTTCATTTATGTCGATTTTAGGTACCTCAAATGCTGTTCTTCTCGCAAAGGC
L L Q V N T A K I H G G L R Q E E R F R -

7261  TGCGATGGATGATTTTAAAAGTGGCAAATCGCGCTTTTAAATTGCAACAGATGTAGCTGG 7320
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
ACGCTACCTACTAAAATTTTACCCTTTAGCGCGAAAAATTAACGTTGTCTACATCGACC
A M D D F K S G K S R F L I A T D V A G -

7321  TCGTGGGATTGATGTGGAAAATGTCACGCTAGTAATTAATTATGACTTACCAATCGAAAA 7380
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
AGCACCTAACTACACCTTTTACAGTGCATCATTAAATAACTGAATGGTTAGCTTTT
R G I D V E N V T L V I N Y D L P I E K -

7381  AGAAAACATATGTGCACCGAATCGGTCTACTGGTCGCGCGGAAACAGTGAAAAGCAAT 7440
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TCTTTTGATACACGTGGCTTAGCCAGCATGACCAGCGCCCTTTGTCACCTTTTCGTTA
E N Y V H R I G R T G R A G N S G K A I -

7441  CAGTTTTGTCAAAACAAACGAAAATCCCTTACTTAGAGATATGGAAGATATGCTAAAAAT 7500
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GTCAAAACAGTTTTGTTGCTTTTAGGGAATGAATCTCTATACCTTCTATACGATTTTAA
S F V K T N E N P L L R D M E D M L K I -

7501  CACGATTGAAAAGAAACGTAAACCAACCATATCGAAGTAAAGGCAAGCGAAGAAGCTTT 7560
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GTGCTAACTTTTCTTTGCATTTGGTTGGTAATAGCTTCATTTCCGTTTCGCTTCTTCGAAA
T I E K K R K P T I I E V K A S E E A F -

7561  CCGCAAGAAACAACAAAAACGTCCAACCATCAAAAAAGCTCGTGGCGAAAAGCTGAATAA 7620
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GGCGTCTTTGTTGTTTTGTCAGGTTGGTAGTTTTTTCGAGCACCGCTTTTCGACTTATT
R K K Q Q K R P T I K K A R G E K L N K -

7621  AAATATTATGAAACTGTACTTTAATGGCGGAAAAAGAAAAAATTCGAGCTGTGGATTT 7680
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TTTATAATACTTTGACATGAAATTACCGCCCTTTTCTTTTTTTAAGCTCGACACCTAAA
N I M K L Y F N G G K K K K I R A V D F -

7681  TGTAGGAACCATTTCAAAATTAGAAGGAATTACATCAGAAGATATCGGTATTATTACTAT 7740
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
ACATCCTTGGTAAAGTTTTAATCTTCTTAATGTAGTCTTCTATAGCCATAATAATGATA
V G T I S K L E G I T S E D I G I I T I -

7741  AGAAGATCATGTGTCATTTGTAGAAATCTTAATGGTAAAGGACCAGCTGTGCTTGAAT 7800
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TCTTCTAGTACACAGTAAACATCTTTAAGAATTACCATTTCCTGGTCGACACGAACCTTA
E D H V S F V E I L N G K G P A V L E M -

7801  GATGCGTTCGCGTAAAGTAAAAGGTAGACAGCTAAAAGTGAACGAAGCAAGAAAGCGATA 7860
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CTACGCAAGCGCATTTTCATTTCCATCTGTCGATTTTCACTTGCTTCGTTCTTTTCGCTAT
M R S R K V K G R Q L K V N E A R K R * -

```

rnaH Stop

```

RBS      ▶Start ORF8
ATTTAAAGAAAAGAAGGTTGCTGGCATGGAAAGACCTAGTAATAGTCTTATTCTAATGGT
7861 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 7920
TAAATTTCTTTTTCTTCCAACGACCGTACCTTCTGGATCATTATCAGAATAAGATTACCA
      M E R P S N S L I L M V -
ACTAAATGTCGTTAAAAATCCAACGTATAACATAAAATCATTAAACGATTAATTTTTTGGA
7921 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 7980
TGATTTACAGCAATTTTTAGGTTGCATATTGTATTTTAGTAATTGCTAATTAATAAACCT
      L N V V K N P T Y N I K S L T I N F L E -
AAATGATGTTGTTGGAGATTCTACTAGAAATCAGCTTTTATACTGCACTTATTGGCTAGA
7981 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 8040
TTTACTACAACAACCTCTAAGATGATCTTTAGTCGAAAATATGACGTGAATAACCGATCT
      N D V V G D S T R N Q L L Y C T Y W L E -
ATTCCATGGTTTTATTCAACGTGATGAAAGTAATATTAACAGAAATATTATAGCATCAC
8041 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 8100
TAAGGTACCAAATAAGTTGCACTACTTTCATTATAATTTGCTTTTATAATATCGTAGTG
      F H G F I Q R D E S N I K Q K Y Y S I T -
ORF8 Stop◀
CAAACAAGGAGATTTTTTACTGCAGAAAATTAATAATGAACTTTCATAGTTTGTTTCATAG
8101 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 8160
GTTTGTTCCTCTAAAAAATGACGTCTTTTAATTTTTACTTGAAAGTATCAAACAAGTATC
      K Q G D F L L Q K I K N E L S * -
TCTATTCATATTTATTTCGTTATATTAAGAATAACCTTTTTTCAATGAAATATCTCACCTG
8161 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 8220
AGATAAGTATAAATAAGCAATATAATTCTTATTGGAAAAAGTTACTTTATAGAGTGGAC
ACAGCATCCGTCTCCCTACTAAAACGCGGATGCTGTTATTTGTGCTATACTAAAACAAAA
8221 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 8280
TGTCGTAGGCAGAGGGATGATTTTGCGCCTACGACAATAAACACGATATGATTTTGTTTT
RBS      ▶Start ORF9
ATGAAAAGTAGGTGGAAACATGTATCAATATACACTTTGCTTTATCGAGCGTGCAGATG
8281 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 8340
TACTTTTACATCCACCTTGTACATAGTTATATGTGAAACGAAATAGCTCGCACGTCTAC
      M Y Q Y T L C F I E R A D E -
AAATTTTATTATTAATAGACAAACAAGTCCGTGGATGGGAAGTTGGAATGGAGTAGGTG
8341 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 8400
TTTAAATAATAATTTATCTGTTTGTTCAGGCACCTACCCTTCAACCTTACCTCATCCAC
      I L L L N R Q T S P W M G S W N G V G G -
GGAAATTGAGCAAGGGGAATCGCTTCTTCATTCGATTAAACGTGAAATTGCCGAAGAAA
8401 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 8460
CCTTTTAACTCGTTCACCCTTAGCGAAGAAGTAAGCTAATTTGCACTTTAACGGCTTCTTT
      K I E Q G E S L L H S I K R E I A E E T -
CAGGCATCCCGCAACCGATTATCAGATTCGTGATATTGGCGTAATGAAATGGTTTGTCTG
8461 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 8520
GTCCGTAAGGGCGTTGCCTAATAGTCTAAGCACTATAACCGCATTACTTTACCAAACAGC
      G I P A T D Y Q I R D I G V M K W F V G -
GTGGAGAAAATCTTGCGGCATGCATTTATTTATCGCAAACCTTCTGATAATTATCAGT
8521 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 8580
CACCTCTTTTAGAACCCTGCTAGCTAAATAAATAGCGTTTGAAGGACTATTAATAGTCA
      G E N L G G M H L F I A K L P D N Y Q C -
GCTCAACTCCCATAGCTACAGAGGAAGGCATACTTGATTTTAAAGAAAAAACTTGGATTT
8581 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 8640
CGAGTTGAGGGTATCGATGTCTCCTCCGTATGAACATAAATTTCTTTTTTGAACCTAAA
      S T P I A T E E G I L D F K K K T W I L -
TAAATCCTGAAATACCGGCATTGTCAATAATCTCCCGTACATACTCCAACATATTCCCC
8641 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 8700
ATTTAGACTTTTTATGGCCGTAACAGTTATTAGAGGGCATGTATGAGGTTGTATAAGGGG
      N P E N T G I V N N L P Y I L Q H I P H -

```

ATAAATCAAACAGAATAGAAATTTTCGACCGACTATCATGAAAATATATTATTAGATATAA
 8701 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 8760
 TATTTAGTTTGTCTTATCTTTAAAGCTGGCTGATAGTACTTTTATATAATAATCTATATT
 K S N R I E I S T D Y H E N I L L D I S -

ORF9 Stop

GTCATCAACTTTTTATAAAAAGCATTGTGCCTAGGTAAGTACCTCACTAAATACTAAACTT
 8761 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 8820
 CAGTAGTTGAAAATATTTTTCGTAACACGGATCCATTCATGGAGTGATTTATGATTTGAA
 H Q L L * -

TTTCTAGTATTTGGTATTTTTTAAAAGCGTAACGGAGAAAGTAGTATTCGCTTCTCCTTC
 8821 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 8880
 AAAGATCATAAACCATAAAAAATTTTCGCATTGCCTCTTTCATCATAAGCGAAGAGGAAG

TTTAGCACATCGAAAGGAAGTAAATACATTTATTGAGAGAGACGACGAATAAACTGATAA
 8881 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 8940
 AAATCGTGTAGCTTTCCTTCATTTATGTAATAACTCTCTCTGCTGCTTATTTGACTATT

TGGTGGGGGCTAGACCAAATTATCTCTAACATAAATAAAGCAGGAATCATCTCTATTC
 8941 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 9000
 ACCACCCCGATCTGGTTAATAGAGATTGTATTTATTATTTCGTCTTAGTAGAGATAAG

CATTTTTTTAATGGCGATATATAATGATTCCTGCTTATCTATTTTCATTATGTGTTTTA
 9001 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 9060
 GTAAAAAATTACCGCTATATATTACTAAGGACGAATAGATAAAAAGTAATAACACAAAAT

►Stop ORF9A

GTTATGTCTAAGCTTCAGCGCTACTTGACCATCCCTAGAAGAGTTCCACCAATTATAATT
 9061 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 9120
 CAATACAGATTCGAAGTCGCGATGAACGGTAGGGATCTTCTCAAGGTGGTTAATATTTAA
 * K V M G L L T G G I I I -

AGGAAGCACCTATCACTGTTAGGAACAATTCTCGTTTTGTATTGGCTTCTTTTAAAATA
 9121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 9180
 TCCTTCGTGGGATAGTGACAATCCTTGTAAAGACAAAACATAACCGAAGAAAATTTTAT
 L F C G I V T L F L E R K T N A E K L I -

AATATTCGCCTAGGGTTGAAATAACAATACCTGCCTGAGAAAGAGAAAAGCTTGTGCG
 9181 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 9240
 TTATAAGGCGGATCCCAACTTTATTGTTATGGACGGACTCTTCTCTTTTCGAACAACGC
 F I G G L T S I V I G A Q S L S F S T A -

AGTCCAACCTTTTTCCATTGCAATAAACATAAATAAGTTACCAATCGCCCATGTAAGACCA
 9241 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 9300
 TCAGGTTGAAAAAGGTAACGTTATTTGTATTTATTCAATGGTTAGCGGGTACATTCTGGT
 L G V K E M A I F M F L N G I A W T L G -

GTAAGGATATTTAACCTTGTTTTTCGTTCAATTATATCTTTCTTCTTGCAAATACAGAGA
 9301 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 9360
 CATTCTATAAATTGGAACAAAAGCAAGTTAATATAGAAAGAAGAACGTTTATGTCTCT
 T L I N L R T K R E I I D K K K C I C L -

GCTCCTATTAACATTTCCACAGCTTGC GAAGTATCACTGCGGTAGATTCAACATCGTAC
 9361 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 9420
 CGAGGATAATTGTAAGGGTGTGCAACGCCTTCATAGTGACGCCATCTAAGTTGTAGCATG
 A G I L M G V A Q P L I V A T S E V D Y -

ATCACTTGTCATACCTTACTATAATTGTATATAACACAAAATCTACAGTAGATATCAGT
 9421 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 9480
 TAGTGAACAGGTATGGAATGATATTAACATATATTGTGTTTAGGATGTCATCTATAGTCA
 M V Q G Y R V I I T Y L V F G V T S I L -

AATGGAAGAACTTTAGGTAGCCTTTGGAATTTTCTTTTTTTCATTATCTGTTTTTCTTCA
 9481 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 9540
 TTACCTTCTTTGAAATCCATCGGAAACCTTAAAAGAAAAAGTAATAGACAAAAAGAAGT
 L P L F K L Y G K S N E K K M I Q K E E -


```

TACGCGGTGAATATCGCCCCAAGAATAAGTAGGATAATAGCAGTACTGCCAAGAAGATAA
9541 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 9600
ATGCGCCACTTATAGCGGGGTTCTTATTCATCCTATTATCGTCATGACGGTTCTTCTATT
  Y A T F I A G L I L L I I A T S G L L Y -

TCCCATTGTTTGGCATTCTTGAAAAATCAATACAGCAACCATTGTATTAACATCAAT
9601 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 9660
AGGGCTAAACAAACGGTAAGAACTTTTAGTTATGTGCGTTGGTAACATAATTGATAGTTA
  D R N T Q W E Q F I L V A V M T N V I L -

TGCAGACCAGTTGACATTGGTACTGTTTTGAAACACCTATTTTATAAAAGGATTGAAAA
9661 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 9720
ACGTCCTGGTCAACTGTAAACCATGACAAAACTTTGTGGATAAAATATTTTCCCTAACTTTT
  Q L G T S M P V T K S V G I K Y F S Q F -

TACATGCTTTGCCCCAAAACCCAAAATAGTCCTGAAATCAAACCAATAATCCATGTTGCT
9721 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 9780
ATGTACGAAACGGGGTTTTGGGTTTTATCAGGACTTTAGTTTGGTTATTAGGTACAACGA
  Y M S Q G L V W F L G S I L G I I W T A -

GTACTTAAATACGGTGTGAAAAATAAAAGGGAAAGTAGCCCTATAATGAATGCACCCATT
9781 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 9840
CATGAATTTATGCCACACTTTTATTTTTCCCTTTCATCGGGATATTACTTACGTGGGTAA
  T S L Y P T F I F L S L L G I I F A G M -

GTCATTCCTAGTGTGTTGACGAAAAATCCCACCAAGTTTTCCAGCAATTAATCCGATA
9841 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 9900
CAGTAAGGATCACAAACAACTGCTTTTTAAGGGTGGTTCAAAAGGTCGTTAATTAGGCTAT
  T M G L T Q Q R F N G G L K G A I L G I -

                                ORF9A Start◀                RBS
CTTCCCCAAGCAATTGCAGGTATTAAGCAATTAATATATCCATAATAATAACCCACTCA
9901 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 9960
GAAGGGGTTTCGTTAACGTCACATAATTTTCGTTAATTATATAGGTAATTATTATTGGGTGAGT
  S G W A I A P I L A I L I D M -

      ▶Stop ORF9B
TAAATTTATGCGTTCCTCCTCGTTGCCGTACAACAATAGTTGATGTATCAATATTGCTT
9961 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 10020
ATTTAAATACGCAAGGGAGGAGCAACGCATGTTGTTATCAACTACATAGTTATAACGAA
  * A N G G R Q R V V I T S T D I N S -

GGCTGATTAATGGCAAATAAAACTGCTTCTGCAATACTTTCAGGTGAAATAGCTAACTTT
10021 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 10080
CCGACTAATTACCGTTTATTTGACGAAGACGTTATGAAAGTCCACTTTATCGATTGAAA
  P Q N I A F L V A E A I S E P S I A L K -

CTAATTTCTTTAAGTCCGTTTATAATGTCTTCTTCTGTAATATCTTCTCCTAATTCAGTA
10081 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 10140
GATTAAGAAATTCAGGCAAATATTACAGAAGAAGACATTATAGAAGAGGATTAAGTCAT
  R I E K L G N I I D E E T I D E G L E T -

TCTGTCACCCAGGAGCCAGTAGGGTAAGTTTGATACGTCATCAAGTTCCTTCTAAGG
10141 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 10200
AGACAGTGGGGTCCCTCGGTCATCCCATCAAACATGCAGGTAGTTCAAGGGAAGATTCC
  D T V G P A L L T L K I R G D L E R R L -

CCTTCATGAATTGCACGAATAGCAAATTTGTTCCCTGCATAAATAACCCCTGTGGGTTCT
10201 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 10260
GGAAGTACTTAACGTGCTTATCGTTTTAAACAAGGACGTATTTATTGGGGACACCCAAGA
  G E H I A R I A F K T G A Y I V G T P E -

GCATTATAACTAGCGACTGAACCTGTTGTGATAATCTGACCATCGCCTGCTTCAAGCATA
10261 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 10320
CGTAATATTGATCGCTGACTTGGACAACACTATTAGACTGGTAGCGGACGAAGTTCGTAT
  A N Y S A V S G T T I I Q G D G A E L M -

ATTGGCATAACGGCTGCTAACCCATGTAAAACACCTTTGATATTCACGTCCACCATCTTA
10321 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 10380
TAACCGTATTGCCGACGATTGGGTACATTTTGTGAAACTATAAGTGCAGGTGGTAGAAT
  I P M V A A L G H L V G K I N V D V M K -

```

```

TCCCATTCATCAGTTTTAAAAGATTCTACATGAGATAATGGCATAATTCCTGCGTTGTTA
10381 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 10440
AGGGTAAGTAGTCAAAATTTTCTAAGATGTACTCTATTACCGTATTAAGGACGCAACAAT
  D W E D T K F S E V H S L P M I G A N N -
AACATAACATCAACTTGACCAAATGTAGCTAATGATACTCGAACTAATTCATCGACTTCT
10441 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 10500
TTGTATTGTAGTTGAAGTGGTTTACATCGATTACTATGAGCTTGATTAAGTAGCTGAAGA
  F M V D V Q G F T A L S V R V L E D V E -
TCTTTCTTTGTGACATCTGTACGGCATAAATTGCTTCACCTCCGTTATCAACAATTGTC
10501 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 10560
AGAAAGAAACACTGTAGACAGTGCCGTATTTAACGAAGTGGAGGCAATAGTTGTTAACAG
  E K K T V D T V A Y I A E G G N D V I T -
TTAACAATTGTTTTTAAGCGATCTTCAGACGGGCTCCCAAGACAATTTTCGCTCCTTTT
10561 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 10620
AATTGTTAAACAAAATTCGCTAGAAGTGTGCCCGAGGGTCTGTAAAAGCGAGGAAAA
  K V I T K L R D E R R A G L V I K A G K -
TTCGATAGCAATAGAGCAGTTGCTCGACCAATACCACTACTTGTCTCTGTAATTACAATA
10621 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 10680
AAGCTATCGTTATCTCGTCAACGAGCTGGTTATGGTGATGAACGAGGACATTAATGTTAT
  K S L L L A T A R G I G S S A G T I V I -
                                ORF9B Start◀          RBS
ACTTTTCCTTTGATATTAGACATATATGATATTCTCCTTCTTATTATGATACAATAAAA
10681 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 10740
TGAAAAGGAAACTATAATCTGTATATACTATAAGAGGAAAGAATAATACTATGTTATTTT
  V K G K I N S M -
                                RBS          ▶Start ORF9C
GCATAGCACCTTAGAGTTAGTCTCAGTCAAGCAAATATAGTAGGAGCGTGAAAAATATGA
10741 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 10800
CGTATCGTGGAATCTCAATCAGAGTCAGTTCGTTTATATCATCCTCGCACTTTTTTATACT
                                M T -
CTTATACAATTAAGAAGTAGCCACAATAATGAATATCTCTGCACATACATTACGGTTTTT
10801 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 10860
GAATATGTTAATTTCTTCATCGGTGTTATTAATAGAGACGTGTATGTAATGCCAAAA
  Y T I K E V A T I M N I S A H T L R F Y -
ATGATGATCATGGATTATTTCTTTTTGTACATCGGGATAAAAATAATGTACGTCAATTTT
10861 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 10920
TACTACTAGTACCTAATAAAGGAAAACATGTAGCCCTATTTTATTACATGCAGTTAAAA
  D D H G L F P F V H R D K N N V R Q F S -
CTGAAAAAGACTTAGAGTGGGTATATGTTGTTCAATGTCTGCGAACAACACTGGGCTTCCCA
10921 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 10980
GACTTTTTCTGAATCTCACCCATATAACAAGTTACAGACGCTTGTGACCCGAAGGGT
  E K D L E W V Y V V Q C L R T T G L P I -
TTGAGCAAGTGAAGCATTATATAAATATGTGTGTTGAAGGTGACGCAACAACAGAAGAGC
10981 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 11040
AACTCGTTCACTTCGTAATATATTTATACACACAACCTCCACTGCGTTGTTGTCTTCTCG
  E Q V K H Y I N M C V E G D A T T E E R -
GTTACAACCTAATGTTACAACAACGCGAGGTCATGCGAGCTGAATTACAAAAAATTGAAA
11041 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 11100
CAATGTTGGATTACAATGTTGTTGCGCTCCAGTACGCTCGACTTAATGTTTTTTAACTTT
  Y N L M L Q Q R E V M R A E L Q K I E K -
AACAATTGAAAATGCTTGATTATAAACGCAATACTATCATAATATTTTATTTAATGAGA
11101 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 11160
TTGTTAACTTTTACGAACTAATATTTTGCCTTATGATAGTATTATAAAAATAAATCTCT
  Q L K M L D Y K T Q Y Y H N I L F N E K -

```

ORF9C Stop◀

11161 AAAAAGATTTGCATAATCCTTTTATTTTTGATAGTCCGATACAAGAAGCT**TAAG**GATTAAT 11220
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 TTTTCTAAACGTATTAGGAAAATAAAAACATATCAGGCTATGTTCTTGACATTCTAATTA
 K D L H N P F I F D S P I Q E L * -

11221 TTTAATTACGTAAATAGCAATGTATCTGGGCTTTAGTTTTTTGAAGTGCATCAACTCAC 11280
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 AAATTAATGCATTTATCGTTACATAGACCCGAAATCAAAAACTTCACGATAGTTGAGTG

11281 TACCGAATTATTACTTGCACGAATTGATGAGATAATTATTCATGAAAGAATCCAAATTGA 11340
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 ATGGCTTAATAATGAACGTGCTTAACACTCTATTAATAAGTACTTTCTTAGGTTAACT

11341 AGTACACTATAAATTCGGCTTAAGTGATTTAGGTGCACTCACTAAAAAATGGTATAAAA 11400
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 TCATGTGATATTTAAGCCGAATTCACTAAATCCACGTGAGTGATTTTTTTTACCATATTTT

11401 AAAGAGGCATGATTTCAATGCCTCTACTGAAATGAAACTATACTTGCTTATGAATAACTA 11460
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 TTTCTCCGTAATAAGTTACGGAGATGACTTTACTTTGATATGAACGAATACTTATTGAT

▶**Stop ORF10**

11461 CCATTAGCGCAATGCTTTTACTAATATCATGAAGTGGTAAAGTAGTTTGCTTGCCATCTA 11520
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 GGTAATCGCGTTACGAAAATGATTAT**AGT**ACTTCCACATTCATCAAACGAACGGTAGAT
 * S T T F Y N A Q W R -

11521 CTAATTAATCTTTGGCATCCTCTGTGGATAACTTTTTGTGGCCAATAATTTGTTCTTTA 11580
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 GATTAATTTAGAAACCGTAGGAGACACCTATTGAAAAACACCGGTTATTAACAAGAAAT
 S I L D K A D E T S L K K H G I I Q E K -

11581 GCAATTTCTAAACTTTCAAAGTGATCAATTAATCGCTGTGCAGGTTATTAATATATACA 11640
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 CGTTAAAGATTTGAAAGTTTCACTAGTTAATTAGCGACACGTCCCAATAATTATATATGT
 A I E L S E F H D I L R Q A P N N I Y V -

11641 TCACTTAAAAGAATGGAAGCTGTTTTTCTGTCTCAGCAGCGTGAATCCAACGATATAT 11700
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 AGTGAATTTTCTTACCTTCGACAAAAAGACAGAGTCGTCGCACTTAAGTTGCTATATA
 D S L L I S A T K E T E A A H I G V I Y -

▶**Stop norA**

ORF10 Start◀ **RBS**

11701 CCTGCTGCTGTAACATAATAAATTTATTCATATTTCTTCGCTCCCTTGATTTGTTCTA 11760
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 GGACGACGACATTGATTATTATTAATA**AGT**ATAAAGAAG**GAGGGA**ACATAAACAAGAT
 G A A T V L L L K N **M**
 * I E E S G Q I Q E -

11761 CTGTGTTATGAACCGATTTTTTCTAGATAAAAAACATATAAATGAAATACAGGAAAAGG 11820
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 GACACAATACTTGGCTAAAAAAGATCTATTTTTGTATATTTACTTTTATGTCCTTTTCC
 V T N H V S K K R S L F M Y I F I C S F -

11821 CAATCAAACCTGCAATAATATAAATGCCTTGAACGACAATACATGATGGATTTGCCCCA 11880
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 GTTAGTTTGGACGTTATTATATTTACGGAACCTTGCTGTTATGTACTACCTAAAGCGGGT
 A I L G A I I Y I G Q F S L V H H I E G -

11881 TAATATAAGGACCAATTCCTAAGCCTAAATCAAGCCCAATAAAAATAAGTAGATAACCCAA 11940
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 ATTATATTCCTGGTTAAGGATTCGGATTTAGTTCGGGTTATTTTATTCATCTATTGGGTT
 M I Y P G I G L G L D L G I F Y T S L G -

11941 TCCCAATTCGATGTGGCTCACAACTTTTAAACAACTGCTTGGCCATTTGACATAAAGG 12000
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 AGGGTTAAGCTACACCGAGTGTGTTGAAAATTTGTTTGACGAACCGGTAAACTGTATTTCC
 I G I R H P E C V K L C V A Q G N S M F -

```

12001 TGCCGTAACCCAAGCCAATCAGTCCACCTGAAATAAGTAAACTAAACTAGAAGTCGCAG
-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 12060
ACGGCATTGGGTTCCGGTTAGTCAGGTGGACTTTATTCATTTTGATTTGATCTTCAGCGTC
T G Y G L G I L G G S I L L V L S S T A -

12061 TGCTTAAAACTACTAAACCTACTGCCAAAAAGATATAACTAGGGTACATAACATATTTTT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 12120
ACGAATTTTGATGATTTGGATGACGGTTTTTCTATATTGATCCCATGTATTGTATAAAAA
T S L V V L G V A L F I Y S P Y M V Y K -

12121 CGCCCTTCACATCAAAGATTTTCCCGGACATCGGTCTTGTAAGGTAATAACCAACGCAT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 12180
GCGGGAAGTGATGTTTTCTAAAAGGGCCTGTAGCCAGAACATTTCCATTATTGGTTGCGTA
E G K V D F I K G S M P R T F T I V L A -

12181 AAACAACAAAGAAAAAGTTCCAGCACTTACTAAATTAATTTCTCTTGCATAAGAAGCGA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 12240
TTTGTGTTTCTTTTTCAAGGTCGTGAATGATTTAATTAAGAGAACGTATTCTTCGCT
Y V V F F F T G A S V L N I E R A Y S A -

12241 GGAATGTGAGTACACTGGAATAAGAAATCCCCATTA AAAAGGCAATAAACGTAATTGGAA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 12300
CCTTACACTCATGTGACCTTATTCTTTAGGGTAATTTTCCGTTATTTCATTAAACCTT
L F T L V S S Y S I G M L F A I F T I P -

12301 TAACTTTGTATTTCGATAAAACTTTTCCAGTCCAAGTTTGTAAGCTTTTTTGTGTTCCG
-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 12360
ATTGAAACATAAGCTATTTTGAAAAGTGCAGGTTCAAACATTTTCGAAAAACACAAGCC
I V K Y E I F S K V T W T Q L A K K H E -

12361 GTGTTAAACAATATTTTAACTGGAAGATAGAAACAAAGAATGGCTGTAGGAAAACAA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 12420
CACAATTTTGTATAAAAATTGACCTTCTATCTTTGTTTCTTACCGACAATCCTTTTGT
P T L V I N K V P L Y F C L I A T L F V -

12421 TGACAGAAGAGAAAATAATAATCGTATAAAAATTTGTATGACTTAATAAAAATCATCCAA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 12480
ACTGTCTTCTTTTTATTATTAGCATATTTTTAAACATACTGAATTATTTTAGTAGGGTT
I V S S F I I I T Y F N T H S L L I M G -

12481 TAAAAGGACCAATAGCAGCTGCGAGACTCGTGCTAAGACCGTAATAATTAATTCCTTCTC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 12540
ATTTTCTGTTATCGTCGACGCTCTGAGCAGATTCTGGCATTATTAATTAAGGAAGAG
I F P G I A A A L S T S L G Y Y N I G E -

12541 CATTTCTAGATGGAGGAATGTAGGCTGTTACAATCGCGTTGGTGGCCGTAGATGTTGTT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 12600
GTAAAGATCTACCTCCTTACATCCGACAAATGTTAGCGCAACCACCGGCATCTACAACAAG
G N R S P P I Y A T V I A N T A T S T T -

12601 CATA CGCAAACCATTTAAGAAGCGAATAAAGAACATTATCCCAATGGTCGGCATATATA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 12660
GTATCGGTTTTGGTAAATTTCTTCGCTTATTTCTTGTAAATAGGGTTACCAGCCGTATATAT
G Y A F G N L F R I F F M I G I T P M Y -

12661 AGTAAGCTACCGTAGTTAGTAAGAAAAATAAAATGCCATATCTTAAACTCGCTGACGTC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 12720
TCATTTCGATGGCATCAATCATTCTTTTTATTTTACGGTATAGAATTTTGAGCGACTGCAG
L Y A V T T L L F F L I G Y R L V R Q R -

12721 CTAGTAATTCTAACTTTTTACCCATATATAATCTGGCAAGTAAAGTCCCGATAATATAAA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 12780
GATCATTAAAGATTGAAAAATGGGTATATATTAGACCGTTCATTTACGGGCTATTATATTT
G L L E L K K G M Y L R A L L T G I I Y -

12781 TACCGGAAGCAAACACAGCCTCACCAAGTGACGCATTCAATTCCTCTTGGGCGATTACGG
-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 12840
ATGGCCTTCGTTTTGGTCGGAGTGGTTCAGTGCCTAAGTTAAGGAGAACCCGCTAATGCC
I G S A F G A E G L S A N L E E Q A I V -

```

CGATAATAACCATCAGCAAATAATAAACCAGATAAACAACAAAGTTAATCAATGTAATCA
 12841 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 12900
 GCTATTATTGGTAGTCGTTTATTATTTGGTCTATTTGTTGTTTCAATTAGTTACATTAGT
 A I I V M L L Y Y V L Y V V F N I L T I -

norA Start ← **RBS**

 AGATAAACCCCTTATTAATAATTTTTCTTTCATAAAAATAAAATCCCTTCTACTTGTAA
 12901 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 12960
 TCTATTTGGGGAATAATTTATTAAGAAAGAAAGTATTTTATTTT**AGGGAA**AGATGAACATT
 L I F G K N F L K E K **M** -

 TCTGTTATTTTTCTCAGCGACAAGCAATATTATAGGGGATTTTTCTTTTGGATACTTTTT
 12961 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 13020
 AGACAATAAAAAGAGTCGCTGTTTCGTTATAATATCCCTTAAAAAGAAAACCTATGAAAAA

PrfA-Box

 AATTTGGTAAATCTTTCTGATATATACAAATATGT**ATAACAAATGTTGA**AAAAAATGGTA
 13021 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 13080
 TTAAACCATTTAGAAAGACTATATATGTTTATACATATTGTTTACAACCTTTTTTTACCAT

RBS

 ATATTATTTTGTATGATTAATAAGTTAGTTTATTAGTACAAAGAAAA**AAGGAC**GGTGCAC
 13081 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 13140
 TATAATAAACATACTAATTATTCAATCAAATAATCATGTTTCTTTTTTCTGCCACGTG

Start ORF11

AATGGATTATGACATACTTGATAACTACGTAAGTTCCAATGATTTCCAAATAATCACTAG
 13141 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 13200
 TTACCTAATACTGTATGAACATTGATGCATTCAAGGTTACTAAAGGTTTATTAGTGATC
M D Y D I L D N Y V S S N D F Q I I T R -

 AAAAAACGGAAATATTTAACTTATGAAGGACTGGAAGATTCTTATGTCTATATATTA
 13201 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 13260
 TTTTTTGCCTTTATAAATTGAATACTTCTGACCTTCTAAGAATACAGATATATAATTT
 K K R K Y L T Y E G L E D S Y V Y I L K -

 AAAGGAATTATTAACAAGTATTATTTCTAGAGATGGCCGAGAATTTAATCTAGGCTA
 13261 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 13320
 TTTCCCTAATAATTTGTTTATAAATAAGATCTCTACCGGCTCTTAAATTAGATCCGAT
 K G I I K T S I I S R D G R E F N L G Y -

 TATCAATAAAATGGATATTTGTGTCTCTTTTAAAAGATGAGTACTCTCAGTTTGCCAATGC
 13321 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 13380
 ATAGTTATTTTACCTATAACACAGAGAAAATTTTCTACTCATGAGAGTCAAACGGTTACG
 I N K M D I V S L L K D E Y S Q F A N A -

 ACCATTTAACCATTCGCGTGAATCAGACCAGTGTGAGCTTTATCAAATGACCGAGTT
 13381 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 13440
 TGGTAAATTGGTAAGCGCACCTTAGTCTGGTCACGACTCGAAATAGTTTAACTGGCTCAA
 P F N H S R G I R P V L S F I K L T E F -

ORF11 Stop ←

 CGATTTTGGAAAGACGTCAATCAGGATCAGGATTTACAATTTTATGT**AAA**AGATTATTAT
 13441 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 13500
 GCTAAAACCTTTCTGCAGTTAGTCCTAGTCCCTAAATGTTAAAATACATTTTCTAATAATA
 D F G K T S I R I R I Y N F M ***** -

 CGAACGCGATTGCTCCCAATCTATCAAAAAATGCAACAAATGCTGATGAANGGGAAATT
 13501 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 13560
 GCTTGCCTAACGAGGTTAGATAGTTTTTTTACGTTGTTTACGACTACTNCCCTTTAA

 GGGTGCAATCTGTACGCAATTATATGAGCTTTTATACTTTATTCGGAGTGGAAATAGAAGA
 13561 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 13620
 CCCACGTTAGACATGCGTTAATATACTCGAAATATGAAATAAGCCTCACCTTTATCTTCT

 CAACCAATATTTAATCGACTTTTTTAGTGAGTAATGAAGAAATGGTCATTTTTGTGGGAT
 13621 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 13680
 GTTGGTTATAAATTAGCTGAAAAATCACTCATTACTTCTTTAACCAGTAAAAACACCCTA

```

AAATTCTGCGAGTAGCGTCAATCGTATTTTCAACAATTAAAAACAGAAGGGGTAATTAC
13681 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 13740
TTTAAGACGCTCATCGCAGTTAGCATAAAAAAGTTGTTAATTTTGTCTTCCCATTAAATG

GATGCGTAATCGCTATATCATTATAAAAAAATTAGATGTTATCCAAGAAAAAGTTATTTT
13741 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 13800
CTACGCATTAGCGATATAGTAATATTTTTTAATCTACAATAGGTTCTTTTGAATAAAA

TTAATAGAATCCATTAGAAAAGCACTGCAAAAAGTTGACTGCAGTGCTTTTCTATCCTCTT
13801 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 13860
AATTATCTTAGGTAATCTTTTCGTGACGTTTCAACTGACGTCACGAAAAGATAGGAGAA

TTTTTAAACGAATAGCGGATTCTAAGTGAATTGTCCCAATAATGATTAACAATAAGCCA
13861 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 13920
AAAAATTTGCTTATCGCCTAAGATTCACATTAACAGGGTTATTACTAATTGTTATTCGGT

ACCATCAAGTTTTCTAAATCACTAAAAATCCCAGAAAATCGAAAATCCCAATGTTAGATAGT
13921 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 13980
TGGTAGTTCAAAAGATTTAGTGATTTTAGGGTCTTTTAGCTTTAGGGTTACAATCTATCA

CCTAAAAAAACAAAAACCAAGCCGACAACAAGCAAAACGATATATGCTGGTTTAGACATT
13981 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 14040
GGATTTTTTTGTTTTTGGTTCGGCTGTGTTTCGTTTTGCTATATACGACCAAATCTGTAA
13981 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 14040

TTCATAAGGACGCCTCACTTACTAATAATAATTTCCCATTTATTGTAACATAAGTTTCCT
14041 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 14100
AAGTATTCCTGCGGAGTGAATGATTATTATTAAAGGGTAATAACATTGTATTCAAAGGA

TTTCGACATTTTCGCTTGTATKGTTTTGA
14101 -----+-----+-----+-----+ 14130
AAAGCTGTAAAAGCGAACAATAMCAAACACT

```

8.1.2 Sequenz von *i-inlG* in verschiedenen *L. ivanovii*-Stämmen

Nachfolgend sind die sequenzierten Bereiche der kleinen Internaline *i-inlG* aus verschiedenen *L. ivanovii*-Stämmen abgebildet. Es wurde jedoch nur der intragenische Bereich um den möglichen Fusionspunkt der zwei kleinen Internaline *i-inlG1* und *i-inlG2* analysiert (Kap. 5.2.3). Es ist nur der codierende ($5' \rightarrow 3'$ -) Strang der Sequenz dargestellt, die Größe ist am linken Rand in Basenpaaren (bp) angegeben.

i-inlG von *L. ivanovii* ATCC19119 - Contig[0008]

```

1 CAAAATGTGT GAATGAACCA GTGGAATATA ACGCTAAATT GGTATTCCA
51 AATACTATCA AAGCCCCAAA TAAAAAATTG ATTGCCCAA GTTTTATTAG
101 TAATAATGGA ATGTATATAA ATGACCAAGT TACATGGGAC TTACCTGCTT
151 ATACAAGTGA AGTAAGCTAT CATTTTAGCA AAATTGTAAG GGTGGAGAA
201 ACGAAAGCAC TATTTGATGG CACAGTGATA CAGCCCTTAC TCTCTAAGAT
251 ATCTGATAGT GAAAACGAAA AAGATTTATC GGAGTCTAAT CAAGCAGAAA
301 GACGCAAGA AAGTCTAAGA AAAAGAATA GTACGGATGT TGGGTCAGAG
351 GATGAATTAG ATAAAGGAAA TGAATCTCAC GCTGTAAGTA TCTCAAACC
401 GCTTCCTATT AATGAAATTT TTCCGGATCC AGGTATAGCG AATGAAGTGA
451 AAAGAATTCT ATGCAAGAAG AGCGTGTGAG ATATTGTTAC GCAAAAAGGAA
501 CTAAATAGTA TAAGGAAATA CTTTAATTGC AATGAAAGCA AT

```

i-inlG von *L. ivanovii* subsp. *londoniensis* - Contig[0003]

```

1 AAATGTGTGA ATGAACCAAGT GGAATATAAC TCTAAATTGG TTATTCCAAA
51 CACTATCAAAA GCTCCAAATA AAAAAATAAT TTCCCAAGT TTTATTAGTA
101 ATAATGGAAT GTATATAAAT GGACAGGTTA CATGGGACTT ACCAACTTAT
151 ACAAGTGAAG TAAGCTATAA TTTTAGCCGA GTTGTAAAGAG TAGGACAAAC
201 GAAAGCTCTG TTTGATGGTA CAGTGATACA ACCATTACTT CCTAATAATG
251 AAGATGAAAA AGATTTTTTCG GAGTCCAATC AAACAAAAGG ACAAGATGAA
301 AGTCTAAGAA AAAAGAATAA TACGGATGTT GAGCCAAAGG GGGAAATTAGA
351 TGAATCTCGC ACTGTAAGAA TCTCAAACC GAGACCTATC AATGACATTT
401 TTCCGGATCC TAGCCTAGCA AATGAAAGTGA AGAGAGTTT AGGCAAAAAG
451 AGTGTGTCAG ATATTGTTAC GCAAAAAGAA CTAAATAAAA TAAAGAAATA
501 TTTGAATGC

```

***i-inlG* von *L. ivanovii* P-24 - Contig[0024]**

```

1   TTTTAAATTN TTTGGGCTTA NAAAATTGGG NNNCCCCCCT TTTCNNGAAA
51  AAANAANGGT TTTTCNGGTT NTATTCGAGC ATTTNTGGGN CATTTTTTAA
101 GCGTTNNTGA NGTANNCTGN CTAAGTFACT AATGGCTTGG ATACAAAATA
151 CTGAGATTTA GGTATCCNCT GTCATTGTCG CTTATGGTGA GATACGACTC
201 AGAGATCCGT TCGCTTGTC A TTTAAGCATC TAGAGACTTT ATCTATAAGT
251 AAAATTAACT AAAAAATATT GAAGGGCTCT CTCATTTATC CAAACTAAAA
301 TTATTGGATT TGAGTAGAAA TGAATTAAGA AATTTATCTG TATTA AAAAAG
351 ACTAAAAGAA ATAAGCTGGC TAGATTTGAC TTGTCAAAAA TGTGTGAATG
401 AACCAGTGG AATATAACGCT AAATTGGTTA TTCCAAATAC TATCAAAGCC
451 CCAAATAAAA AATTGATTGC CCCAAGTTT ATTAGTAATA ATGGAATGTA
501 TATAAATGAC CAAGTTACAT GGGACTTACC TGCTTATACA AGTGAAGTAA
551 GCTATCATTT TAGCAAAATT GTAAGGGTTG GAGAAACGAA AGCACTATTT
601 GATGGCACAG TGATACAGCC CTTACTCTCT AAGATATCTG ATAGTAAAA
651 CGAAAAAGAT TTATCGGAGT CTAATCAAGC AGAAAGACGC AAAGAAAAGTC
701 TAAGAAAAAA GAATAGTACG GATGTTGGGT CAGAGGATGA ATTAGATAAA
751 GGAAATGAAT CTCACGCTGT AAGTATCTCC AAACCGCTTC CTATTAATGA
801 AATTTTCCG GATCCAGGTA TAGCGAATGA AGTGA AAAAGA ATTCATGCA
851 AGAAGAGCGT GTCAGATATT GTTACGCAA AGGAACTAAA TAGTATAAGG
901 AAATACTTTA ATTGCAATGA AGCATG

```

***i-inlG* von *L. ivanovii* P-55 - Contig[0008]**

```

1   TAGAGGCAGT TTTGGGGCAT TTTATAAGNG GTTTTGANAA AGTTTTGCCT
51  AAAGTFACTA NTGGCTTGNT TACAAAATAC GGAGATTAAG GATTCCCCTG
101 CCCATAGTCG CTTATGNTGA GAACGACTCA NGATGCGTTC GCTGTTCTTT
151 AAAGATCTAG AACTTTNTCT TTAGTAAAAT TAACTAAAAA ATATTGAAGG
201 GCTCTCTCAT TTATCCAAAC TTAAAATTAT TGGATTTGAG TAGAAATGAA
251 TTAAGAAATT TATCTGTATT AAAAAGACTA AAGAAGATAA GCTGGCTAGA
301 TTTGACTTGT CAAAAATGTG TGAATGAACC AGTGAATAT AACGCTAAAT
351 TGGTTATTCC AAATACTATC AAAGCCCCAA ATAAAAAATT GATTGCCCCA
401 AGTTTTATTA GTAATAATGG AATGTATATA AATGACCAAG TTACATGGGA
451 CTTACCTGCT TATACAAGTG AAGTAAGCTA TCATTTTAGC AAAATGTAA
501 GGGTTGGAGA AACGAAAGCA CTATTTGATG GCACAGTGAT ACAGCCCTTA
551 CTCTCTAAGA TATCTGATAG TGAAAACGAA AAAGATTTAT CGGAGTCTAA
601 TCAAGCAGAA AGACGCAAAG AAAGCTAAG AAAAAAGAAT AGTACGGATG
651 TTGGGTCAGA GGATGAATTA GATAAAGGAA ATGAATCTCA CGCTGTAAGT
701 ATCTCCAAAC CGCTTCCTAT TAATGAAATT TTTCCGGATC CAGGTATAGC
751 GAATGAAGTG AAAAGAATTC TATGCAAGAA GAGCGTGTC GATATTGTTA
801 CGCAAAGGA ACTAAATAGT ATAAGGAAAT ACTTTAATTG CAATGA

```

8.1.3 *purH*-Sequenz von *L. ivanovii*

Als Contig [0031] ist die *LipurH*-Sequenz angegeben. Sie wurde zur Herstellung der *L. ivanovii*-spezifischen Integrationsplasmide benötigt. Es ist nur der codierende (5'→3'-) Strang der Sequenz dargestellt, die Größe in Basenpaaren (bp) kann anhand der links angegebenen Zahlen abgelesen werden.

Contig[0031]

```

1   CTTGATGGTC GCGTAAAAAC ACTTCATCCA GCTATTCATG GTGGTCTACT
51  TGCAAGACGT GATACAGAAG CACATATGGA TGCTATTGCA GCTCATCACA
101 TTCAACCCAT TGATTTAGTA GTAGTAAATT TATACCCTTT TCAAGAAACC
151 ATTCAAAAAC CAGGTGTTTC TTTAGAAGAA GCTATCGAAA ATATTGATAT
201 TGGTGGTCCT TCAATGTTAC GCTCTGCTGC CAAAAATTAT GCAGCCGTGA
251 CTGTAGTTGT TGATACTTCA GACTATGAAA CAGTACTTGT AGAGTTAAGT
301 GAACACGGTG CGACAACATT TGAAACACGC GAGCGTTTAG CTGCCAAAGT
351 TTTCCGACAT ACTGTGCTT ATGACGCATT AATTGCTGAA TACTTAAACAG
401 GCATAACGGG AGAAACTTTC CCAGAAAAAG TGACTTTAAC CTATAATCGA
451 AAACAAGTGC TTCGTACCG TGAAAATCCT CACCAAGATG CAGCTTTTAA
501 TACAGAACCA CAGGCAGTAA AAAACGCGAT AAGTACTGCA AAACAATTGC
551 ATGGAAAAGA GTTATCCTAT AATAATATAC GTGATACAGA TGCAGCACTG
601 AAAATCGCTA GTGAATTTAG TGAGCCAGTT GCAGTAGCTG TAAAACATAT
651 GAATCCATGC GGGGTTGGAG TAGGTACGAC AATTGAAGAG GCTTATTTAA
701 AAGCCTATGA AGCGGGATGA AAA

```

8.2 Abkürzungen

A	Adenosin
Abb.	Abbildung
ActA/ <i>actA</i>	Aktin-bindender Faktor A/-Gen
Amp	Ampicillin
Amp ^R	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
CIP	Calf Intestinal Phosphatase
Cm	Chloramphenicol
Cm ^R	Chloramphenicolresistenz
Csa	cell surface anchor
Da	Dalton
dco	"double crossover"
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 ^R	Erythromycinresistenz
et al.	und andere
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
evtl.	eventuell
F-Aktin	filamentöses Aktin
FCS	fötales Kälberserum
g	Gramm
G	Guanosin
G-Aktin	globuläres Aktin
GW	Genome Walking
h	Stunde
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinethansulfonsäure
HSPG	Heparansulfat-Proteoglykane
(i)	<i>ivanovii</i>
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- β -D-Thiogalaktosid
kb	Kilobase

kDa	Kilodalton
KE	Klett-Einheiten
Km	Kanamycin
Km ^R	Kanamycinresistenz
kV	Kilovolt
l	Liter
<i>L.</i>	<i>Listeria</i>
LB	Luria-Bertani
<i>ldh</i>	Lactatdehydrogenase-Gen
LIPI-1	<i>Listeria</i> Pathogenitätsinsel 1 (Virulenzgencluster)
LIPI-2	<i>Listeria ivanovii</i> Pathogenitätsinsel 2
LLO/ <i>hly</i>	Listeriolysin O/-Gen
log.	logarithmisch
LRRs	Leucin-reiche Repeats
Lsg.	Lösung
LZZ	Lebendzellzahl
μ	mikro (10 ⁻⁶)
m	milli (10 ⁻³)
M	Molar
MCS	Multiple Cloning Site
MEM	Minimum Essential Medium
MIC	minimale inhibitorische Konzentration
min.	Minute
MOI	Multiplizität der Infektion
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
Mpl/ <i>mpl</i>	Metalloprotease/-Gen
mRNA	Messenger RNA
MW	Molekulargewicht
n	nano (10 ⁻⁹)
N	Normal
OD...	optische Dichte bei ... nm
o.g.	oben genannt
ORF	Open Reading Frame
p	pico (10 ⁻¹²)
p60/ <i>iap</i>	60 kDa-Protein/-Gen
PAI	Pathogenitätsinsel
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PC-PLC/ <i>plcB</i>	Phosphatidylcholin-spezifische Phospholipase C/-Gen
PCR	Polymerase Chain Reaction
p.i.	post infection
PI-PLC/ <i>plcA</i>	Phosphatidylinositol-spezifische Phospholipase C/-Gen
PNK	Polynukleotidkinase
PrfA/ <i>prfA</i>	Positiver Regulationsfaktor A/-Gen
<i>prs</i>	Phosphoribosyl-Pyrophosphat-Synthetase-Gen
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur; Reverse Transkription
s	Sekunde
s.	siehe
sco	"single crossover"
SDS	Natriumdodecylsulfat
SLCC	Seeliger <i>Listeria</i> Culture Collection
Smase	Sphingomyelinase
s.o.	siehe oben
SOD/ <i>sod</i>	Superoxid-Dismutase/-Gen
sog.	sogenannt
ss	einzelsträngig
s.u.	siehe unten
Sv	Serovar
T	Thymidin
Tab.	Tabelle

TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
Tc	Tetracyclin
Tc ^R	Tetracyclinresistenz
T _m	Schmelztemperatur
Tris	Tetramethyl Rhodamine Isocyanat
U	Unit (Einheit)
u.a.	unter anderem
ÜN	über Nacht
ÜNK	Übernachtskultur
UV	Ultraviolett
VASP	Vasodilator-stimulierendes Protein
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

Publikationen

Altrock, S., and J. Kreft. 2002. The PrfA-dependent virulence gene cluster LIPI-1 of *L. ivanovii* is differentially transcribed in vitro and in infected cultured cells (zur Veröffentlichung eingereicht).

Kreft, J., J.-A. Vázquez-Boland, S. Altrock, G. Domínguez-Bernal, and W. Goebel. 2002. Pathogenicity islands and other virulence elements in *Listeria*. *Curr. Topics Microbiol. Immunol.* **264**:109-125.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Stefanie Altmock
Geburtstag: 11.01.1973
Geburtsort: Würzburg
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung

Sept. 1979 – Juli 1983 Grundschole Bechtolsheimer Hof, Würzburg
Sept. 1983 – Juli 1992 Mozart-Gymnasium, Würzburg

Akademische Ausbildung

Nov. 1992 – Dez. 1997 Studium der Biologie (Diplom) an der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg
Okt. 1994 Vordiplom in allgemeiner Zoologie,
allgemeiner Botanik,
Chemie und Physik
Okt. 1996 Diplomprüfung in Mikrobiologie (Hauptfach),
Tierphysiologie (Nebenfach) und
Humangenetik (Nebenfach)
Nov. 1996 – Dez. 1997 Diplomarbeit am Lehrstuhl für Mikrobiologie der Universität
Würzburg
Thema: Virulenzgenexpression *in vivo* und *in vitro* bei
Listeria ivanovii
Betreuer der Arbeit: Prof. Dr. Jürgen Kreft
Dez. 1997 Graduierung als Diplom-Biologin univ.
Febr. 1998 – Jan. 2002 Promotion am Lehrstuhl für Mikrobiologie der Universität
Würzburg
Betreuer der Arbeit: Prof. Dr. Jürgen Kreft
März 1998 – Febr. 2000 Promotionsstipendium nach dem Gesetz zur Förderung des
wissenschaftlichen und künstlerischen Nachwuchses

Würzburg, 30. Januar 2002

Stefanie Altmock