

---

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

---

**Entwicklung und Evaluierung neuer  
Methoden zur Analyse des Proteoms von  
*Listeria monocytogenes* in infizierten  
Wirtszellen**



**DISSERTATION**

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

**vorgelegt von  
Petra Herrmann  
aus Wertheim**

**Würzburg, 2009**



Eingereicht am: .....

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender: .....

1. Gutachter: Prof. Dr. Jürgen Kreft.....

2. Gutachter: Prof. Dr. Roland Benz.....

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, .....



# DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Dissertation beigetragen haben.

An erster Stelle gilt mein herzlicher Dank Herrn Prof. Dr. Jürgen Kreft für die Überlassung des Dissertationsthemas und die hervorragende Betreuung dieser Arbeit. Im Besonderen möchte ich Ihm für seine Geduld und Hilfsbereitschaft in der Endphase dieser Arbeit danken, die entscheidend zum Erfolg dieser Dissertation geführt haben. Vielen Dank auch an Herrn Prof. Dr. Roland Benz für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens.

Ein besonders herzliches Dankeschön an Frau Dr. Andrea Spory für die Einführung in die Geheimnisse der 2-D-Proteinanalyse, das ausgezeichnete Arbeitsklima, insbesondere durch Ihren unerschütterlichen Humor auch in den kritischen Phasen dieser Arbeit. Ebenso möchte ich allen Mitarbeitern des Lehrstuhls für die gute Zusammenarbeit und die angenehme Arbeitsatmosphäre danken. Besonders danke ich Dr. Daniela Loeffler und Dr. Sonja Mertins für Ihre moralische Unterstützung und die netten Stunden auch außerhalb des Laboralltags.

Die vorliegende Arbeit wurde vom BMBF-Verbundvorhaben „Neue Methoden zur Erfassung des Gesamtproteoms Gram-positiver Bakterien (Teilprojekt TP 2.2: Methodenentwicklung für die Analyse von Subproteomen von *Listeria monocytogenes*, Projektleiter Prof. Dr. Wehland; [www.bmbf.de](http://www.bmbf.de)) gefördert. Hierbei ein besonderes Dankeschön an die Kooperationspartner an der GBF Braunschweig, vor allem Herrn Dr. Uwe Kärst für die wertvollen Tipps zur Proteinanalyse bei *Listeria*. Ebenso möchte ich Herrn Prof. Dr. Martin Loessner für die freundliche Überlassung der Dynabeads® M-270 Epoxy – CBD Beads und die Einführung zu deren Anwendung danken. Für die Bereitstellung der Kieselgel + Magnetit Beads (MERCK, in Entwicklung) möchte ich Herrn Dr. Karl Holschuh danken. Ein Dankeschön geht an Herrn Armin Bosserhoff am ZMBH Heidelberg für die massenspektrometrische Analyse (MALDI-TOF) der Proteine.

Mein innigster Dank gilt meinem geliebten Fast-Ehemann Dr. Markus Bon für seine grenzenlose Zuversicht und sein sonniges Gemüt in allen Lebenslagen. Ich danke Dir von Herzen für Deine unermüdliche Unterstützung ! Auch möchte ich allen Freunden, die mich durch das Studium begleitet haben, für eine unvergessliche Zeit danken.

Ein ganz besonderer Dank geht an meine Eltern und Großeltern, insbesondere meine Mutter für Ihre liebevolle Unterstützung, Weisheit und Ihr Vertrauen.



# Inhaltsverzeichnis

<b>ZIELSETZUNG</b> .....	<b>1</b>
<b>1. ZUSAMMENFASSUNG/ SUMMARY</b> .....	<b>3</b>
<b>2. EINLEITUNG</b> .....	<b>11</b>
2.1 Analyse des mikrobiellen Proteoms.....	11
2.1.1 Methodik der Proteom Analyse:.....	12
Zwei-Dimensionale-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und	
Massenspektrometrie.....	12
2.1.2 Zwei-Dimensionale-(2-D)-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese bei <i>Listeria</i>	
<i>monocytogenes</i> EGDe .....	16
2.2 <i>Listeria</i> als Modellorganismus.....	19
2.2.1 Allgemeine Mikrobiologie der Listerien.....	19
2.2.2 Infektionszyklus und Virulenzfaktoren von <i>Listeria monocytogenes</i> .....	20
2.2.3 Organisation und Kontrolle der Virulenzgene von <i>L. monocytogenes</i> .....	22
2.2.4 Eindringen in die Wirtszelle.....	23
2.2.5 Überleben im Phagosom.....	24
2.2.6 Vermehrung und Verbreitung über die Zellgrenzen hinweg .....	25
2.3 Potentielle Virulenzgene und Virulenz-assoziierte Gene bei <i>Listeria</i>	
<i>monocytogenes</i> .....	27
2.3.1 Untersuchungen der intrazellulären Genregulation <i>Listeria monocytogenes</i>	
während Infektionen in Makrophagen .....	28
2.4 Ablauf der <i>Listeria monocytogenes</i> Infektion in Makrophagen .....	30
2.4.1 Reaktion der Makrophagen auf die Infektion mit <i>Listeria monocytogenes</i>	
	31
<b>3. MATERIAL</b> .....	<b>33</b>
3.1 Geräte .....	33
3.2 Verbrauchsmaterial .....	34
3.2.1 Medien und Agarplatten .....	34
3.2.2 Antibiotika.....	35
3.2.3 Medien und Zusätze für die Zellkultur .....	35
3.3 Bakterienstämme: .....	37
3.4 Eukaryontische Zelllinien.....	37
3.5 Beads .....	38
3.5.1 Dynabeads® anti <i>Listeria</i> .....	38

3.5.2	Dynabeads® M-270 Epoxy – CBD Beads (Beschichtung mit Phagenlysin Ply 118 von Martin Loessner) .....	38
3.5.3	Kieselgel + Magnetit Beads (MERCK in Entwicklung; zur Verfügung gestellt von Dr. Karl Holschuh, Merck) .....	38
3.5.4	Magnet zur Separation der Beads .....	39
3.6	Delta 2-D Software.....	39
3.7	Größen- und Molekulargewichtsstandard .....	40
3.8	Datenbanken und Internetadressen .....	41

#### **4. METHODEN ..... 43**

4.1	Proteinbiochemische Methoden .....	43
4.1.1	Eindimensionale-SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	43
4.1.2	Zweidimensionale-SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (2-D-SDS-PAGE) .....	45
4.1.2.1	Auftrennung von Proteinen in der ersten Dimension durch isoelektrische Fokussierung (IEF).....	45
4.1.2.2	Rehydrierung der immobilisierten pH-Gradientengele (IPG-Strips) .	46
4.1.2.3	Isoelektrische Fokussierung (IEF) in der Ettan IPGphor Isoelectric Focusing Unit (Amersham Biosciences).....	47
4.1.2.4	Auftrennung der Proteine in der Zweiten Dimension .....	48
4.1.2.5	Giessen der SDS-Polyacrylamidgele .....	49
4.1.2.6	Proteinfärbung mit Silbernitrat .....	50
4.1.2.7	Proteinfärbung mit kolloidalem Coomassie .....	51
4.1.2.8	Massenspektrometrische Proteinidentifizierung am ZMBH Heidelberg [165] (Herr Armin Bosserhoff/Dr. Thomas Ruppert) .....	52
4.1.2.9	Herstellung von Molekulargewichtsstandards für die zweite Dimension .....	53
4.2	Proteinisolierung .....	53
4.2.1	Isolierung von Gesamtzellproteinen aus <i>L. monocytogenes</i> .....	53
4.2.2	Isolierung von Proteinen aus Infektionen in J774-Makrophagen.....	54
4.2.3	Isolierung von Proteinen aus RPMI-Shifts .....	55
4.2.4	Methode der Isolierung von <i>Listeria</i> Proteinen aus infizierten Zellen .....	(→ 4.2.2) an in BHI gewachsenen Listerien .....
4.2.5	Isolierung von Überstandsproteinen aus <i>L. monocytogenes</i> .....	56
4.2.6	Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford .....	57
4.3	Zellkultur .....	57
4.3.1	Auftauen und Einfrieren von eukaryontischen Zellen (Freshney, 1987)...	58
4.3.2	Subkultivierung eukaryontischer Zellen .....	59
4.3.3	Bestimmung der Lebendzellzahl (LZZ) .....	59
4.4	Infektionsassays mit <i>Listeria monocytogenes</i> .....	60

4.4.1	Aussaat der Zellen für Infektionsassays .....	60
4.4.2	Herstellung des Infektionsmediums .....	60
4.4.3	Infektionsassay in Napfschalen .....	61
4.4.4	Infektion in Kulturflaschen.....	62
4.5	Western Blot.....	63
4.6	Isolierung von Listerien mit paramagnetischen Beads .....	65
4.6.1	Dynabeads .....	65
4.6.2	Dynabeads Standard Isolierung: .....	65
4.6.3	M270-Epoxy-CBD-Beads von M. Loessner.....	66
4.6.4	„Kieselgel“ Beads von Merck.....	67
<b>5.</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>69</b>
5.1	Vorversuche zur Isolierung von Listerien aus Zellkultur mit verschiedenen paramagnetischen Beads.....	71
5.1.1	Dynabeads® anti Listeria .....	71
5.1.2	Kieselgel + Magnetit Beads (MERCK in Entwicklung; zur Verfügung gestellt von Dr. Karl Holschuh, Merck) .....	72
5.1.3	Dynabeads® M-270 Epoxy – CBD Beads .....	
	(Beschichtung mit Phagenlysin Ply 118 von Martin Loessner) .....	73
5.2	Vorversuche zur Arretierung des Proteinmusters von <i>Listeria monocytogenes</i> bei Isolierung aus J774-Makrophagen .....	74
5.2.1	Inhibierung der Atmungskette mit Natriumazid (NaN <sub>3</sub> ).....	74
5.2.2	Inhibierung des Stoffwechsel durch Schockfrost in flüssigem Stickstoff (Na N <sub>3</sub> ) .....	76
5.2.3	Inhibierung der Proteinsynthese mittels Antibiotika .....	76
5.2.4	Optimierung der Infektionsbedingungen.....	77
5.3	Entwicklung einer neuen Methode zur Darstellung von listeriellen Proteinen in Zellkultur in J774-Makrophagen.....	78
5.3.1	Expressionsanalyse des Gesamtproteoms mittels der Delta-2-D Software.. .....	80
5.3.2	Kontrolle der Auswertbarkeit der neuen Methode: .....	80
5.4	Proteomische Analyse der Proteine von <i>Listeria monocytogenes</i> aus Infektionen von J774-Makrophagen .....	82
5.4.1	Vergleich des Proteinmusters von in RPMI subkultivierten Listerien mit in BHI kultivierten Listerien („RPMI-Kontrolle“) .....	83
5.4.2	Vergleich des Proteinmusters von in BHI kultivierten mit in J774-Makrophagen gewachsenen Listerien .....	86
5.4.3	Vergleich des Proteinmusters von <i>Listeria monocytogenes</i> aus Zwischenkultur in RPMI mit Listeria aus Infektionen in J774-Makrophagen („Infektionskontrolle“) .....	90

5.5	Übersicht der regulierten Proteine in den unterschiedlichen Versuchsansätzen .....	93
5.5.1	Übersicht der Funktionellen Klassen der identifizierten Proteine.....	96
<b>6</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>101</b>
6.1	Rationale zur Methode der Proteinanalyse durch 2-Dimensionale Gelelektrophorese .....	102
6.2	Entwicklung einer neuen Methode zur selektiven Darstellung listerieller Proteine aus Infektionen in J774-Makrophagen .....	103
6.2.1	Selektive Isolierung der Listerien aus Zellkultur mit verschiedenen paramagnetischen Beads.....	103
6.2.2	Arretierung des Proteinmusters aus Zellkultur.....	106
6.2.3	Aufreinigung der Listerien aus Zellkultur in J774-Makrophagen .....	107
6.3.	Proteomische Analyse der Proteine von <i>Listeria monocytogenes</i> aus Infektionen von J774-Makrophagen .....	108
6.3.1	Vergleich des Proteinmusters von in RPMI subkultivierten Listerien mit in BHI kultivierten Listerien („RPMI-Kontrolle“).....	108
6.3.2	Vergleich des Proteinmusters von in BHI kultivierten mit in J774- Makrophagen gewachsenen Listerien .....	116
6.3.3	Vergleich des Proteinmusters von <i>Listeria monocytogenes</i> aus Zwischenkultur in RPMI mit <i>Listeria</i> aus Infektionen in J774-Makrophagen („Infektionskontrolle“) .....	128
6.4	Bewertung der neu entwickelten Methode und deren Ergebnisse .....	131
<b>7.</b>	<b>LITERATUR.....</b>	<b>133</b>
<b>8.</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>145</b>
8.1	Abkürzungen.....	145
<b>LEBENS LAUF.....</b>		<b>149</b>
<b>PUBLIKATIONEN .....</b>		<b>151</b>

## Zielsetzung

Im Rahmen des BMBF-Verbundvorhabens „Neue Methoden zur Erfassung des Gesamtproteoms Gram-positiver Bakterien (Teilprojekt TP 2.2: Methodenentwicklung für die Analyse von Subproteomen von *Listeria monocytogenes*, Projektleiter Prof. Dr. Wehland) sollten neue Methoden zur Darstellung und Quantifizierung bakterieller Proteine in infizierten eukaryontischen Zellen entwickelt werden ([www.bmbf.de](http://www.bmbf.de)).

Hierbei mussten zunächst die Methoden mit Schwerpunkt auf die Aufbereitung der Proben für die Anwendung bei immobilisierten pH Gradienten für das Ettan IPGphor Isoelectric Focussing System von Amersham Biosciences für Listerien unter Zusammenarbeit mit Frau Dr. Andrea Spory und Frau Eva Rotenberg optimiert werden.

Zusätzlich zur umfassenden Untersuchung bakterieller Genexpression unter definierten Wachstums- und Umweltbedingungen, ist bei fakultativ intrazellulären Bakterien die Analyse ihrer differentiellen Genaktivität innerhalb einer eukaryontischen Wirtszelle von besonderem Interesse. Da die Transkriptanalyse nur begrenzte Aussagen über die jeweiligen Mengen der Genprodukte im Bakterium zulässt, weil hierauf neben der m-RNA-Konzentration auch Translations- und Abbaurate einen entscheidenden Einfluss haben, sollen Methoden zur direkten Darstellung und Quantifizierung des bakteriellen Proteinmusters innerhalb der Wirtszelle entwickelt werden.

Die Analyse des Proteoms in Zellkultur soll die Erkenntnisse aus den Transkriptomanalysen ergänzen und vervollständigen, wobei im besten Falle neue Virulenzfaktoren identifiziert werden könnten.



# 1. Zusammenfassung

Transkriptionsanalysen liefern, obwohl sie prinzipiell das komplette Genom erfassen können, nur einen Teilaspekt der Genexpression eines Organismus, da Parameter wie mRNA-Translationseffizienz und Proteinstabilität unberücksichtigt bleiben müssen. Proteomische Analysen hingegen können durch Erfassung von Proteinmengen und eventuell auch postrationalen Modifikationen, sowie von Abbauprozessen ein genaueres Abbild des Funktionszustands einer Zelle unter unterschiedlichen Umweltbedingungen darstellen.

Das Hauptproblem bei proteomischen Untersuchungen an in eukaryontischen Wirtszellen gewachsenen Bakterien, nämlich die Überlagerung des bakteriellen Proteinmusters durch die im Überschuss vorhandenen Wirtszellproteine, könnte im Prinzip durch eine selektive Markierung der bakteriellen Proteine überwunden werden. Bei *Salmonella typhimurium* wurde eine radioaktiv markierte Aminosäurevorstufe verwandt, welche von Eukaryontenzellen nicht metabolisiert werden kann, in diesem Falle meso-Diaminopimelat (m-DAP). Dieser mögliche Ansatz wurde nicht weiter verfolgt, da die Einbaurate nicht Erfolg versprechend erschien. Stattdessen wurde eine Methode etabliert, intrazellulär gewachsene Bakterien über Bindung an paramagnetische Partikel („Beads“) und anschließende Magnetseparation selektiv von Wirtszellkomponenten abzutrennen. Dabei wurden drei Beads-Varianten mit unterschiedlicher Beschichtung gewählt: Dynabeads® anti Listeria (DynaL, Oslo), Kieselgel + Magnetit Beads (MERCK in Entwicklung), Dynabeads® M-270 Epoxy – CBD Beads (Beschichtung mit Phagenlysin Ply 118). Hierbei konnte nur für die Kieselgel + Magnetit Beads eine hinreichende Isolierungsrate für die Methode der 2-D-Gelelektrophorese von  $6-7 \times 10^7$  Listerien/Zellkulturflasche erreicht werden. Bedauerlicherweise zeigte sich im 2-D-Proteingel eine starke Streifenbildung, wodurch auch dieser Ansatz sich als nicht auswertbar erwies.

Erfreulicherweise gelang es in einem alternativen Ansatz von Infektionen an J774-Makrophagen die Listerien mittels konsekutiver Waschschriffe von Wirtszellproteinen aufzureinigen. Um eine Veränderung des Proteinmusters bei der Isolierung auszuschließen wurden die Zellen noch in der Zellkulturflasche in 1\*PBS supplementiert mit (10mM  $\text{NaN}_3$ , 5 $\mu\text{g/ml}$  Tc, 50  $\mu\text{g/ml}$  Cm) in flüssigem Stickstoff schockgefrosten. Nach paralleler Infektion von 8 Zellkulturflaschen konnten je Infektion 30-50  $\mu\text{g}$  Protein isoliert und zweidimensional aufgetrennt werden, wobei

das Proteinpattern qualitativ eindeutig dem von in vitro gewachsenen *Listeria monocytogenes* entsprach. Auf diese Weise konnten 38 Proteine, welche von Listerien während der Infektion in Makrophagen induziert oder reprimiert werden anhand der Deta-2-D Software quantifiziert und statistisch ausgewertet werden.

Eine eingeführte RPMI-Kontrolle (Vergleich BHI- zu RPMI-Subkultur) konnte solche Proteine erfassen, welche bereits im RPMI-Zellkulturmedium in ihrer Expression verändert werden, ohne dass dieser Effekt tatsächlich auf die Bedingungen in der Wirtszelle zurückgeht.

Bei dem Hauptversuch, dem Vergleich von in BHI gewachsenen Listerien mit Listerien aus Infektionen, treten im Gegensatz zu der RPMI-Kontrolle auch Induktionen von Oberflächenproteinen auf. Hier konnte eine Induktion von GgaB (Lmo 1080; homolog zu einem Teichonsäure Biosynthese Protein von *Bacillus subtilis*) festgestellt werden. Für Teichonsäuren war bereits eine maßgebliche Beteiligung an der Virulenz bekannt, welche durch einen 4log-fachen Anstieg der LD<sub>50</sub> einer *dltA* Deletionsmutante im Mausmodell untermauert wird. Als weiteres Protein der Zelloberfläche war Lmo2754 (Penicillin-bindendes Protein 5) induziert. Für Mutanten von Lmo2754 konnte ein ca. 1log-facher Defekt bei Infektionen im Mausmodell festgestellt werden. Im Gegensatz zur RPMI-Kontrolle sind die Clp Proteasen ClpP (Lmo2468) und Lmo1138 induziert, welche durch Stress aktiviert werden. Für ClpB, ClpC, Clp E und ClpP konnte in *Listeria monocytogenes* bereits eine Beteiligung an der Virulenz nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass die Listerien in Infektionen eine Art Stressantwort durchlaufen, wobei die Clps vermutlich noch regulatorische Funktionen übernehmen. Ein weiterer Unterschied zur RPMI-Kontrolle stellt die Induktion der Proteine AckA (Lmo1581), FabG (Lmo1807) und BirA (Lmo1904) dar, welche am Acetyl-CoA Stoffwechsel beteiligt sind. Interessanterweise ist auch PdhD, eine Untereinheit der Pyruvatdehydrogenase (PDH) induziert, welche ein Schlüsselenzym des Pyruvatstoffwechsels darstellt. Für einen Defekt der Pdh E2 Untereinheit konnte eine verminderte intrazelluläre Replikation festgestellt werden. Als Besonderheit wurden für PdhA, einer weiteren Untereinheit der Pyruvat Dehydrogenase, drei Isoformen mit unterschiedlichen Regulationen identifiziert werden, wobei hier für eine Isoform eine statistisch signifikante Reprimierung nachgewiesen werden konnte. Erstaunlicherweise wurde das *pdhABC* Operon in Transkriptionsanalysen intrazellulär reprimiert vorgefunden. Auffällig ist die hier stark erhöhte Menge der Polynucleotid-Phosphorylase PnpA, welche RNA abbaut und vor allem an der transkriptionellen Regulation von mRNAs beteiligt zu sein scheint. Ebenso wie bei der RPMI-Kontrolle waren hier PurH und Cmk als Enzyme der Purinbiosynthese mengenmäßig erhöht. In Übereinstimmung mit den transkriptomischen Analysen findet sich hier ein ABC

Transporters (Lmo2372) induziert, dessen Substrat nicht bekannt ist. Die Phosphoglyceromutase Lmo2205, zeigt sich als Sonderfall da sie sowohl hier, in der RPMI Kontrolle und in der Infektionskontrolle induziert erscheint. Dies könnte eine Anpassung an wechselnde Glucosekonzentrationen widerspiegeln. Ebenso wie in der RPMI-Kontrolle finden sich hier die Enzyme des Glycinmetabolismus (Lmo1349, Lmo1350 und GlyA) induziert. Dies weist darauf hin, dass Glycin Abbau wichtig ist. Als stark reprimierte Proteine zeigen sich hier die ribosomale Untereinheit RpsB (Lmo1658) und der Elongationsfaktor EF-Tu (Lmo2653, Tuf). Beide sind in den Infektionen kaum noch nachzuweisen. Dies ist erstaunlich, da *L. monocytogenes* intrazellulär mit einer Rate repliziert, welche der in BHI vergleichbar ist. Möglicherweise handelt es sich um einen speziellen Artefakt. Ebenso wie in den Transkriptionsanalysen zeigen sich hier PfkA (Lmo1571), Pgi (Lmo2367) und FruB (Lmo2336) als Enzyme der Glukolyse reprimiert. Einen weiteren Hinweis auf die zentrale Rolle des Pyruvatstoffwechsels bei der Anpassung von *Listeria* an das intrazelluläre Milieu stellt die Reprimierung der Acetyl-CoA Synthese von Lmo2720 dar. Des Weiteren weist eine Reprimierung von GpsA (Lmo1936) auf eine Inhibierung der Synthese von Glycerophospholipiden. Die Reprimierung der Cystein Synthase CysK (Lmo0223) ist deshalb erstaunlich, weil *Listeria* aufgrund des Fehlens einer Sulfatreduktase Cystein sowieso nicht synthetisieren kann. Einen Hinweis auf eine Anpassung der Zellwand liefert die Reprimierung der Murein Ligase MurC (Lmo1605). Entsprechend der RPMI-Kontrolle ist die Dipeptidyl-Prolyl-Isomerase Lmo2376 induziert. Hierbei handelt es sich um ein allgemeines Stressprotein, welches an der Reparatur und der Faltung der Proteine beteiligt ist.

Insgesamt fällt auf, dass ca. ein Viertel (9/38) der in der RPMI-Kontrolle und dem Hauptversuch regulierten Proteine von anderer Seite im Überstand von *Listeria monocytogenes* nachwiesen wurden. Darunter PurH und PurK, TufA, CysK, PfkA, EF-Tu, Lmo 1080 (beteiligt an der Teichonsäure-Biosynthese, Lmo2754 (penicillin binding protein 5). Auch PdhD konnte im Überstand von *Listeria innocua* gefunden werden. In diesem Zusammenhang gibt es Vermutungen, dass diese Proteine auch ohne Signalpeptid über den SecA2-Sekretionsmechanismus sekretiert werden.

Die Infektionskontrolle (Vergleich RPMI Subkultur zu Infektionen) bestätigt die Mehrheit der im Hauptversuch gefundenen Regulationen. Diese Kontrolle kann vermutlich durch den Vergleich mit *Listeria* aus einer Zwischenkultur in RPMI feinere Unterschiede nachweisen als dies im Vergleich mit BHI-Kultur möglich ist. So konnten hier als statistisch gesicherte neu induzierte Proteine die unbekannt Proteine Lmo0592 und Lmo0774 nachgewiesen werden. Ergänzend zu dem Hauptversuch konnte hier neben ClpP und Lmo1138 auch noch für ClpB eine statistisch gesicherte positive Regulation nachgewiesen werden. Auffällig ist, dass hier einige positive Regulationen, welche sowohl in der RPMI-Kontrolle als auch im

Hauptversuch gefunden wurden, nicht mehr nachweisbar waren. Somit erscheinen diese Proteine vor allem durch den großen Unterschied in der Nährstoffdichte als induziert.

Erfreulicherweise konnte für einige der hier mittels der neu entwickelten Methode identifizierten Proteine anhand der der vorliegenden Literatur (zu Transkriptom, Sekretom, Virulenz von *Listeria*) bereits eine Beteiligung am Virulenzgeschehen nachgewiesen werden. Zum jetzigen Zeitpunkt unterliegt die proteomische Analyse einigen Limitierungen, z.B. beim Nachweis von schwach exprimierten, stark alkalischen, stark hydrophoben, hochmolekularen und niedermolekularen Proteinen, so dass die derzeitige Methodik noch nicht das gesamte Proteom abdecken kann. Dass die „klassischen“ Virulenzfaktoren pathogener Listerien, Listeriolysin O (LLO), die Phospholipasen PlcA und PlcB, sowie ActA hier nicht erfasst wurden, ist darin begründet, dass es sich um sekretierte Proteine handelt. Besondere Bedeutung kommt der Beobachtung zu, dass nur in ganz wenigen Fällen (z.B.. Pgm, ClpP, Pgi, TrxB, MurC) die nachgewiesenen intrazellulären Veränderungen der Proteinmenge mit den von anderen publizierten Transkriptionsdaten übereinstimmen. Diese Diskrepanzen stellen keine Artefakte dar, sondern sind durch intrazelluläre posttranskriptionelle Mechanismen begründet. Insgesamt zeigte auch diese Proteinanalyse, dass bei Replikation von *Listeria monocytogenes* im Cytosol eukaryontischer Wirtszellen zahlreiche komplexe Anpassungen von teils zentralen aber auch peripheren Stoffwechselwegen und Biosynthesen der Bakterien an dieses spezielle Milieu ablaufen.

## SUMMARY

Although transcription analysis basically can cover the whole genome, this method yields only a partial picture of the organism's gene expression profile since it does not comprise effects of translation efficiency and protein stability. Proteomic analyses, however, by their capacity to detect actual protein amounts and eventually post translational modifications as well as degradation processes are able to give a more precise picture of the functional status of a cell under diverse environmental conditions.

The main problem of proteomic analyses, with bacteria grown inside eukaryotic host cells, the superimposition of the bacterial protein pattern by the exceedingly present host cell proteins, could in principle be circumvented by e.g. selective labeling of the bacterial proteins. With *Salmonella typhimurium* a radioactive labeled amino acids precursor which can not be metabolized by eukaryotic cells, meso-diaminopimelate (m-DAP), has been successfully utilized. This approach was not pursued since the detection method seemed to be unsatisfactory. Instead methods have been established to selectively isolate intracellularly grown bacteria by binding to paramagnetic beads and subsequent magnetic separation from the host cell components. At this three differently coated types of beads [Dynabeads® anti Listeria (DynaL, Oslo), Kieselgel + Magnetit Beads (MERCK in Entwicklung), Dynabeads® M-270 Epoxy - CBD Beads (Beschichtung mit Phagenlysin Ply 118)] have been used. At this it was only possible for the "Kieselgel + Magnetit Beads" to reach a sufficient isolation rate for the method of 2-D-electrophoresis of  $6-7 \times 10^7$  Listeria/ cell culture flask. Regrettably there showed up a bad streaking on the 2-D-proteingel whereby this approach also proved to be not evaluable.

Fortunately an alternative approach succeeded at infections of J774-macrophages to purify the listeria of host cell proteins by means of consecutive wash steps. To avoid a change in the protein pattern during the course of isolation the cells were shock frosted still in their cell culture flask in 1\*PBS supplemented with (10mM  $\text{NaN}_3$ , 5µg/ml Tc, 50 µg/ml Cm). Subsequent to a parallel infection of 8 cell culture flasks 30-50 µg protein were successfully isolated and two-dimensionally separated whereby the protein pattern qualitatively clearly matched that of in vitro grown *Listeria monocytogenes*. In such way it was possible to identify 38 proteins, which have been induced or suppressed, respectively and statistical quantified with the Delta-2-D software.

The introduced RPMI-control (comparison of BHI- to RPMI-subculture) managed to detect such proteins which were already changed in their expression in the RPMI cell culture medium without this effect actually to be traced back to the conditions in the host cell.

In the main experiment, in contrast to the RPMI-control, surface proteins appear at the comparison of *Listeria* grown in BHI to those harvested out of infections. Here an induction of GgaB (Lmo 1080, homologous to a teichoic acid biosynthesis protein of *B. subtilis*), could be identified as induced. For teichoic acids there is already evidence for a major role in infection of listeria, which is confirmed by a 4log-fold increase of the LD<sub>50</sub> of a *dltA* deletion mutant in the mouse model. As a further protein of the cell surface Lmo2754 (penicillin binding protein 5) was found upregulated. For mutants of Lmo2754 an approximately 1log defect of infectivity in the mouse model was observed by others. In contrast to the RPMI-control the Clp proteases ClpP (Lmo2468) and Lmo1138 have been found induced both of which are known to be activated by stress. For ClpB, ClpC, ClpE and ClpP a participation in the virulence of *Listeria monocytogenes* could already be demonstrated. These results imply that listeria pass through a kind of stress response during infection, whereby the Clps presumably take over a regulatory function. A further contrast to the RPMI-control represents the induction of the proteins AckA (Lmo1581), FabG (Lmo1807) and BirA (Lmo1904) which are involved in the Acetyl-CoA metabolism. Interestingly here is as well PdhD, a subunit of the pyruvate dehydrogenase (PDH) induced, which is a key enzyme of the pyruvate metabolism. For a defect of the Pdh E2 subunit a reduced intracellular replication could be observed. As a specific characteristic for PdhA, a further subunit of the pyruvate dehydrogenase, three isoforms with distinctive regulations could be identified. Hereby for one isoform a statistically relevant reduction of the protein could be proved. Astonishingly in transcriptomic analyses the *pdhABC* operon was found intracellularly reduced in amount. Noticeable is the strongly elevated amount of PnpA, which degrades RNA and seems to be mainly involved in the transcriptional regulation of mRNAs. As at the RPMI-control there were PurH and Cmk as enzymes of the purinbiosynthesis quantitatively elevated. In consistency with the transcriptomic analysis here a ABC transporter (Lmo2376) was found induced whose substrate is not known. The phosphoglyceromutase Lmo2205 appears as a special case since it turns out to be induced both here, in the RPMI-control and in the infection control. This might reflect an adaptation to the changing glucose concentrations. Like in the RPMI-control here the enzymes of the glycin metabolism have been proven as induced (Lmo1349, Lmo1350 and GlyA). This finding suggests that the glycin degradation is crucial. As strongly suppressed proteins appear the ribosomal subunit rpsB (Lmo1658) and the elongation factor EF-Tu (Lmo2653). Both are hardly detectable in the infections.

This is amazing since *L. monocytogenes* replicates intracellularly with a rate which is comparable to that in BHI. Possibly this is about a special artefact. As well as in the transcription analysis there show up suppressed PfkA (Lmo1571), Pgi (Lmo2367) and FruB (Lmo2336) as enzymes of the glycolysis. A further hint to the central role of the pyruvate metabolism in the adaptation of listeria to the intracellular milieu constitutes the suppression of the acetyl-CoA synthase, Lmo2720. In addition the inhibition of GpsA (Lmo1936) point to an inhibition of the synthesis of glycerophospholipids. The suppression of the cysteine synthase CysK (Lmo0223) is astonishing since listeria is due to a lack of a sulfate reductase not capable to synthesize cystein at all. A clue to an adaptation of the cell wall gives the suppression of the murein ligase MurC (Lmo1605). According to RPMI-control there is the dipeptyl-prolyl-isomerae Lmo2376 induced. This protein resembles a common stress protein, which is involved in the repair and folding of proteins.

As conclusion it is striking that about a quarter (9/38) of the proteins that have been identified in the RPMI-control and main experiment as regulated were detected by others in the supernatant of *Listeria monocytogenes*. Among them PurH and PurK, TufA, CysK, PfkA, EF-Tu, Lmo1080 (participating at the teichoic acid biosynthesis), Lmo2754 (penicillin binding protein 5). In this connection there exists some evidence that these proteins might be secreted without signal peptide via the Sec A2 secretion mechanism.

The infection control (comparison of RPMI subculture to infections) confirmed the majority of the regulations found in the main experiment. By the comparison with listeria out of a RPMI subculture this control probably enables a more precise detection of differences than the comparison to BHI allows. Thus it was possible to detect statistically firm the newly induced proteins Lmo0592 and Lmo0774. supplementary to the main experiment besides for ClpP and Lmo1138 there could be verified a statistically firm positive regulation for ClpB as well. Strikingly some of the positive regulations which have been found both in the RPMI-control and the main experiment were not detectable. Hence these proteins seem to be mainly induced by the big difference in the nutrient concentration.

Fortunately there was already evidence for some of the proteins that have been identified by the newly established method, on the basis of the present literature (on transcriptome, secretome, virulence of *Listeria*), for a participation in the course of infection. Up to now the proteomic analysis is subject to some restrictions for example in the detection of weakly expressed, strong alkaline, strong hydrophobic, high-molecular weight and low-molecular weight proteins so that the current methodology can not cover the whole proteome. That the "classic" virulence factors of pathogenic listeria, listeriolysin O (LLO), the phospholipases PlcA and PlcB, as well

as ActA are not captured is caused by the fact that these proteins are secreted. Of particular importance is the observation that in very little cases (e.g. Pgm, ClpP, Pgi, TrxB, MurC) the detected intracellular changes in protein amount are consistent with the published transcription data. These discrepancies constitute no artefacts but are caused by intracellular posttranscriptional mechanisms. Altogether also this protein analysis reveals that during replication of *Listeria monocytogenes* in the eucaryotic host cell cytosol numerous complex adaptations of partly central but also peripheral metabolic pathways and biosyntheses to that specific milieu take place.

## 2. Einleitung

### 2.1 Analyse des mikrobiellen Proteoms

Die Veröffentlichung der ersten kompletten Genomsequenz 1995 läutete eine neue Ära der Biologie ein. Nachdem in der Zwischenzeit die DNA-Sequenzierungen von mehr als 632 Genomen zum Abschluss gekommen sind (<http://www.genomesonline.org>) und 2863 Genomprojekte in Bearbeitung sind (Stand: 05-August-2007) ebenso wie ein Entwurf des menschlichen Genoms, ist es nun eine der Hauptaufgaben der modernen Biologie die Expression, Funktion und Regulation der Proteine eines Organismus zu verstehen – die Ziele der Proteomforschung [168].

Während das Genom eines Organismus eine gut definierte, statische Größe ist, ist das Proteom ein dynamisches, sich ständig veränderndes Gebilde. Obwohl Prokaryonten viele der grundlegenden regulatorischen Mechanismen mit den Eukaryonten teilen, gibt es doch einige Unterschiede. Wegen der fehlenden Kompartimentierung finden die Mechanismen der Transkription und Translation gekoppelt statt. Ebenso ist die Messenger-RNA von Prokaryonten häufig polycistronisch mit mehr als einem Protein kodiert. Zudem kommen postranslationelle Modifikationen nur selten bei Prokaryonten vor.

Es gibt zwei Mechanismen der Regulation der Genexpression bei Prokaryonten. Zum einen wird die Aktivität eines Enzyms durch Feedback Hemmung, allosterische Hemmung oder kovalente Modifikationen (AMP, ADP, Phosphatgruppen, Methylierungen) reguliert. Zum anderen wird das Vorhandensein oder die Menge eines Enzyms auf transkriptioneller Ebene reguliert. Dies kann durch regulatorische Proteine, Induktion, Repression und Attenuierung der Transkription, globale Kontrolle mehrerer Regulone (Katabolit Repression, alternative Sigma Faktoren) sowie Zwei-Komponenten-Systeme (Response Regulatoren) gesteuert werden.

Transkriptionsanalysen liefern, obwohl sie das komplette Genom erfassen, nur ein teilweise Bild der Genexpression eines Organismus. Proteomische Analysen hingegen können durch Erfassung von postrationalen Modifikationen, sowie von Abbauprozessen ein genaueres Abbild des Status quo der Proteinexpression unter unterschiedlichen Umweltbedingungen darstellen [22].

Das exponentielle Wachstum der Informationen aus Genomsequenzierungen führte zu neuen Herausforderungen für die Bioinformatik und die Forschung, welche durch umfassende Experimente die Funktionen dieser neuen Gene erforschte. Hierbei wurden viele Gene und Proteine unbekannter Funktion identifiziert, darunter neue globale Regulatoren wie alternative Sigma Faktoren, Response-Regulatoren und andere Aktivatoren. Es scheint als ob selbst für die Modellorganismen wie *Escherichia coli* und *Bacillus subtilis* viele Kapitel Ihrer Zellphysiologie leer bleiben. Die Kombination von Transkriptionsanalysen, welche das komplette Genom erfassen zusammen mit den zusätzlichen Informationen aus dem Proteom über Konzentration, Modifikation und Lokalisation dieser Proteine zusammen mit bioinformatischen Werkzeugen kann das Bild der lebenden Zelle in Zukunft vervollständigen [71]

### **2.1.1 Methodik der Proteom Analyse:**

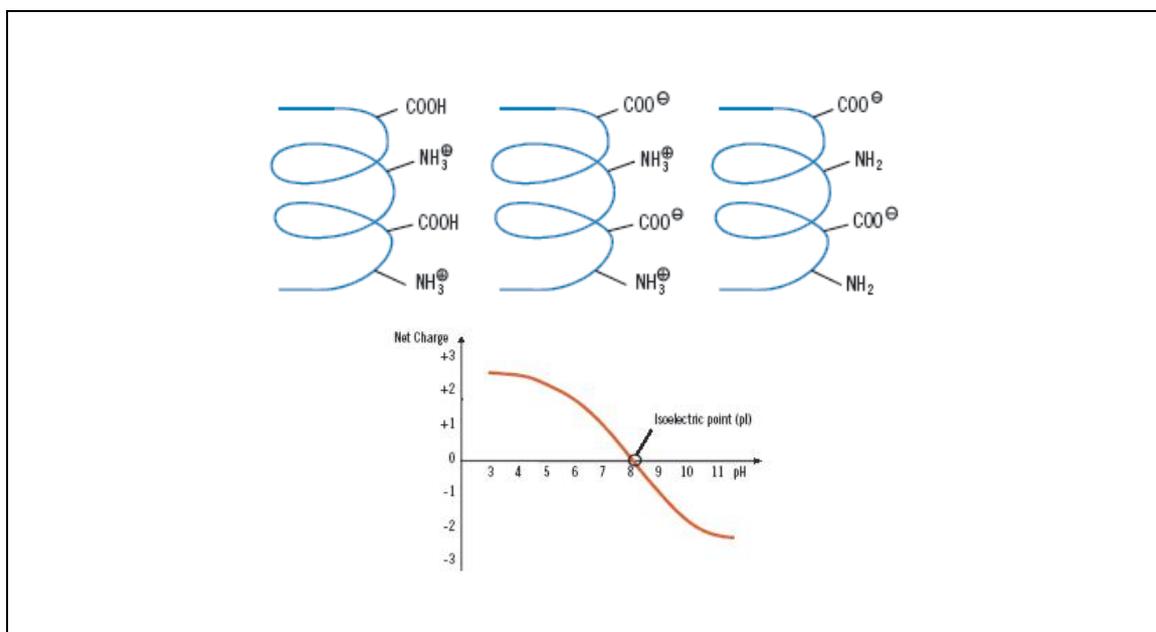
#### **Zwei-Dimensionale-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Massenspektrometrie**

Die 2-D- Elektrophorese ist momentan die einzige Technik welche es erlaubt, parallel und quantitativ das Expressionspattern von komplexen Proteingemischen, wie z.B.. aus Lysaten aus kompletten Zellen zu profilieren. Hierbei stellt die Elektrophorese zusammen mit der anschließenden massenspektrometrische Identifizierung das Werkzeug für die – proteomischen Analysen dar.

Die Zwei-Dimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese (2-D-PAGE) kann das Expressionsmuster eines Proteoms unter unterschiedlichen Bedingungen darstellen, wobei auf einem Gel unter optimalen Bedingungen bis zu 5000 (unter Routinebedingungen ca. 1500) Proteine detektiert werden können. Bei dieser Methode werden die Proteine zunächst in eine Richtung (1. Dimension) durch isoelektrische Fokussierung (IEF) nach ihrer Nettoladung und dann in dazu orthogonaler Richtung im Polyacrylamidgel (2. Dimension) nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Einen großen Schritt zur besseren Reproduzierbarkeit

brachte die Einführung immobilisierter PH-Gradienten für die 1. Dimension durch Görg [58].

Der PH-Gradient wird bei diesem System kovalent in einem 0,5 mm dicken IEF-Gel auf Plastikfolie verankert. Durch die kovalente Bindung und durch die geringe Leitfähigkeit der Gele kann die Fokussierung bis zur Einstellung des Gleichgewichtes bei hohen Spannungen durchgeführt werden. Hierdurch wird die Auflösung stark verbessert. Es sind sowohl sehr breite (IPG pH 3-12), mittlere (IPG pH4-7) als auch enge PH-Gradienten (IPG pH 4,5-4,5) und äußerst enge (IPG4,9-5,3) kommerziell erhältlich [59] [163].



**Abb. 1:** Auftragung der Nettoladung eines Proteins gegen den pH Wert der Umgebung. Der Punkt der Überschneidung auf der x-Achse entspricht dem isoelektrischen Punkt des Proteins.

In den letzten Jahren haben Methoden zur Proteinauftrennung in Kombination mit verschiedenen Massenspektrometrie (MS) Methoden sich als Schlüsselwerkzeuge bei der Proteinidentifizierung erwiesen. Moderne Massenspektrometer können heute Proteine bis zu mehreren 100 kD darstellen und das Molekulargewicht im fmol-Bereich mit Genauigkeit von einigen ppm darstellen. MALDI-MS beruht auf der Übertragung von Energie auf die Probe durch Laserbeschuss. Die zugeführte Energie bewirkt die Desorption und Ionisierung der festen Probe. Die sehr hohe Empfindlichkeit der MALDI-Geräte wird durch einen Flugzeitmassenspektrometer (TOF= time of flight) bedingt. Das in der Gasphase befindliche Ion wird durch eine angelegte Spannung (20-30 kV) beschleunigt und die Flugzeit bis zum Detektor gemessen. Da die MALDI-Massenspektrometrie von Peptiden vor allem einfach

geladene Ionen erzeugt kann aus einem MALDI-Spektrum meist direkt die Masse des protonierten Peptids abgelesen werden.

Durch die Fragmentierung von Peptiden im Massenspektrometer können wichtige Informationen über die Sequenz und posttranslationale Modifizierungen gewonnen werden (Sonderdruck aus Biospektrum, Ausgabe 5, M. Blüggel 1988) [74]. Die Identifizierung der Proteine erfolgt anschließend anhand einer Datenbankanalyse der erhaltenen Sequenzen.

Trotz des großen Potentials der 2-D-Gelelektrophorese gibt es einige Limitierungen der Methode. Es hat sich gezeigt, dass die Mehrheit der identifizierten Proteine häufig vorkommende Haushaltsgene sind, welche in etwa  $10^5$  bis  $10^6$  Kopien je Zelle vorkommen wohingegen Proteine wie Rezeptormoleküle, welche in weit geringeren Konzentrationen vorliegen (typischerweise  $< 100$  Moleküle je Zelle) normalerweise nicht nachgewiesen werden [59].

Außerdem ist es kaum möglich sehr alkalische und hydrophobische Proteine zu identifizieren. Um eine hohe Auflösung für stark alkalische Proteine, welche ca. 30% aller Proteine umfassen, zu erreichen sind einige Optimierungsschritte in Bezug auf die Gelzusammensetzung (Ersetzung von Dimethylacylamid durch Acrylamid), Zugabe von DTT über einen Papierstreifen an der Kathode direkt [55] [2] sowie die Zugabe von Isopropanol zu der IPG Rehydrierungslösung um elektroendosmotische Flüsse zu verhindern welche eine starke Streifenbildung in engen PH-Bereichen verursachen (IPG 9-12, IPG 10-12) [56] .

Ein weiteres Problem stellt die Darstellung der stark hydrophoben Proteine, wie integralen Membranproteinen dar, welche Schlüsselfunktionen bei vielen wichtigen zellulären Prozessen spielen, wie , Zell-Adhäsion, Signaltransduktion, Ionen oder Metaboliten-Transport und sind daher Hauptziele der Erforschung der Entstehung von Virulenzen. Die Darstellung von stark hydrophoben Proteinen wird erschwert durch Ihre geringe Löslichkeit, die Tendenz zu aggregieren und in wässrigem Medium auszufallen und Ihren häufig stark alkalischen isoelektrischen Punkten und Ihrer geringen Menge [23] [164]. Momentan stellt die Analyse von Membranfraktionen mittels Flüssigchromatographie und anschließender MS-Identifizierung eine Möglichkeit der Identifizierung von Membranproteinen dar, wobei nur noch durch Markierung durch Isotope eine Quantifizierung möglich wäre [59] [16].

Ebenso lassen sich Proteine mit einem Molekulargewicht von  $M_r (<15 \text{ KD})$  und  $M_r (>150 \text{ kD})$  darzustellen. Abgesehen von der Gelmatrix behindert die starke Hydrophobizität und schlechte Löslichkeit in Harnstoffpuffern, sowie ein erschwerte Übertragung der gelösten Proteine von der 1. in die 2. Dimension erschwert.

Obwohl neue Entwicklungen wie das „Cuploading-System von Amersham Biosciences“ als auch niedervoltige Rehydrierung bei 30-50 V , sowie verlängerte Equilibrierungen eingeführt wurden konnten nur einige der Hindernisse überwunden werden [57].

Ein weiteres Problem besteht in der Sensitivität der Visualisierungsmethoden der 2-D-Proteindarstellung. Standardmethoden wie Färbungen mit Coomassie-Blue und Silbernitrat erlauben jeweils die Darstellung von Spots mit 200-500 ng Protein/ Spot und 0,1 ng Protein /Spot. Bessere und verlässlichere Ergebnisse in Bezug auf Sensitivität und der linearen dynamischen Erfassung erlauben Fluoreszenzfarbstoffe wie die kommerziell erhältlichen CyDyes (Amersham Biosciences), welche sogar die Auftrennung von zwei unterschiedlich markierten Proben in einem Proteingel erlauben. Hierbei wird aber für die visuelle Darstellung ein Phosphorimager-Scanner benötigt [59].

Alternativ können Proteine nach der elektrophoretischen Auftrennung mit dem SYPRO Ruby-Fluoreszenzfarbstoff innerhalb ein paar Stunden markiert werden, wobei die Nachweisgrenze je Spot bei 1-2 ng Protein liegt.

Eine weitere Möglichkeit besteht in der radioaktiven Markierung der Proteine (z.B..  $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{33}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{125}\text{I}$ , oder  $^{131}\text{I}$ ) in Proteine, wobei für ( $^{35}\text{S}$ )-Methionine, ( $^{14}\text{C}$ )-Leucin, ( $^{32}\text{P}$ )-Phosphotyrosine ( $^3\text{H}$ )-Leucin auch in vivo Experimente möglich sind. Trotz der großen Sensitivität und der Möglichkeit der in vivo Anwendung gibt erschweren lange Expositionszeiten von Wochen bis Monaten für  $^{14}\text{C}$  und  $^3\text{H}$ , jeweils die Auswertung der Experimente. Ein weiteres Hindernis der radioaktiven Markierungen ist das Problem der Spotidentifizierung auf dem Analysegel, da sich unterschiedliche Gele nicht eindeutig vergleichen lassen. Dennoch ist ein erster Ansatz des direkten Vergleichs in demselben Gel von  $^{35}\text{S}$ -pulsmarkierten Proteinen in vivo mit einem Silbergel bereits gelungen [6].

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es keine universelle Methode zur Darstellung aller Proteine gibt aber dennoch die 2-D Elektrophorese, wenn auch keineswegs perfekt, gekoppelt mit anschließender MS-Identifizierung die wichtigste Methode der proteomischen Analysen in nächster Zeit sein wird [59].

### **2.1.2 Zwei-Dimensionale-(2-D)-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese bei *Listeria monocytogenes* EGDe**

Bislang zielten 2-D-Proteinanalysen bei *L.m.* EGDe auf Stressantworten, darunter Reaktionen auf antimikrobielle Substanzen [39] [132] [61], PH-Stress [27] [122] [123], hohe Salzkonzentrationen [42] oder Kälteschock [5] [70].

Bislang gelang es erst einmalig das intrazelluläre Proteom von *Listeria monocytogenes* während der Infektion in eukaryontischen Wirtszellen darzustellen. T. Hanawa gelang 1995 durch selektive radioaktive Markierung der Listerien mit [<sup>32</sup>S]-Methionin in J77-Makrophagen und unter Verwendung von Cycloheximid welches die Proteinsynthese in den Makrophagen unterbindet eine zweidimensionale Darstellung des listeriellen Proteinprofils in Makrophagen. Diese Proteine wurden nicht identifiziert aber Hanawa konnte durch vergleichende Experimente feststellen, dass es sich dabei nicht um Stressproteine handelte. [67]

Einen großen Aufschwung erlebte die 2-D-Analyse bei *L.m.* EGDe durch die Veröffentlichung der Genomsequenz von *L.m.* EGDe in 2001 [52], welche zum einen unser Wissen über die molekularen Bausteine bereicherte und zum anderen den Weg für umfangreiche Datenbankanalysen, darunter auch die Analyse von Proteinsequenzen, nach erfolgter massenspektrometischen Analyse (MALDI-TOF), ebnete. Dies ermöglichte die Erstellung einer partiellen Proteom- Referenzkarte von stark exprimierten cytosolischen und Zellwand-assoziierten Proteine von *Listeria monocytogenes* EGDe [133].

Ein weiterer Ansatz war das Überleben von *Listeria monocytogenes* ohne Kohlenstoff-Quelle sowohl in Flüssigkultur als auch in Biofilmen [72]. Des Weiteren wurde eine Kulturvariante von *L.monocytogenes* welche größere Mengen an Biofilm produzierte mittels der zweidimensionalen Proteinanalyse untersucht und hierbei Reprimierung des 50 S ribosomalen Proteins L10 und Induktion eines Zucker-Bindenden-Proteins Dpr (Lmo0181 sowie Induktion eines unbekanntes Proteins (Lmo1888) festgestellt [44]. Auch wurde das Proteinmuster von *Listeria monocytogenes* in exponentieller Wachstumsphase mit dem in stationärem Wachstum verglichen, welches als Modellzustand für ein Verhungern (an Nährstoffen, Sauerstoff, Aminosäuren etc.) gelten kann, durchgeführt [43]. Analog dazu konnte eine umfassende Veränderung der Expression von mehr als 50% der Proteine von *L. monocytogenes* (ScottA) in stationärer Wachstumsphase nachgewiesen werden. Hierbei begannen die Veränderungen, anders als erwartet, bereits ab einer OD<sub>600</sub> = 0,75 auf [161].

Weiterhin galt den Proteinen der Zellwand als potentiellen Virulenzfaktoren großes Interesse, wobei erstmals durch einen nicht-elektrophoretischen, sondern einen zweidimensionalen Nano-Flüssigchromatographie- Ansatz, kovalent an die Zellwand gebundene Proteine identifiziert werden konnten. Hierbei wurden mehrere ein LPXTG -Motiv tragende Proteine welche unter anderem durch Sortasen (SrtA, SrtB) bei *L. mon.* an die Zellwand verankert werden, einige peptidoglykanolytische, ein Penicillin-bindendes und Proteine, welche ein NXZTN-Motiv tragen identifiziert [16].

Da viele Proteine welche an der Virulenz beteiligt sind zum Oberflächen-Subproteom von *Listeria* gehören, wurden durch differentielle Salzextraktion 55 Oberflächen Proteine identifiziert. Diese Proteine hatten weder vorhergesagte noch nachweisbare Signalpeptide noch konnten irgendwelche Modifikationen festgestellt werden. Diese werden als „moonlighting“-Proteine bezeichnet, da sich die Frage stellt, wie diese sekretiert werden und welche Funktion sie erfüllen. Hierzu gehörten die Proteine Enolase (Lmo2455), der Hitzeschockfaktor DnaK (Lmo1473), der Elongationsfaktor EF-TU (Lmo2653, Tuf), und die Glyceraldehyd-3-Phosphat-dehydrogenase (Lmo2459) [140].

Ebenfalls ein potentielles Target für neue Virulenzfaktoren war das Sekretom von *Listeria monocytogenes*. Hierbei wurden neben cytosolischen auch überraschenderweise Transkriptions-Regulatoren gefunden. Ein Vergleich mit dem Sekretom von *L. innocua* lieferte eine Auswahl von 16 Proteinen, die ebenso wie die klassischen Virulenzfaktoren keine Orthologe in *L. innocua* haben. Darunter Lmo1666, welches eine Cadherin-Domäne trägt, welche bei der Adhäsion an die Wirtszelle bekanntermaßen eine große Rolle spielt, daneben das kleinere Teichonsäure-Biosynthese-Protein GgaB (Lmo1080) und zwei kleinere unbekannte Proteine (Lmo1125 und Lmo2410) [155].

Da eine Deletion des Prolipoprotein Diacylglyceryl Transferase Gens *lgt* eine Attenuierung der Virulenz von *Listeria monocytogenes* in verschiedenen Zelllinien vermittelt wurde diese Mutante mit dem Wildtyp verglichen. Zusätzlich wurde die Regulation der identifizierten Lipoproteine durch PrfA untersucht, wobei drei Proteine identifiziert werden konnten. Ein Ortholog des Posttranslokations Chaperons *prsa* von *B. subtilis*, Lmo2219, Lmo0366 ein Protein unbekannte Funktion und Lmo2595 [4].

Die Veröffentlichung der Genomsequenzen des Pathogens *Listeria monocytogenes* und der nicht-pathogene Art *Listeria innocua* veranlasste zahlreiche vergleichende Studien und Anstrengungen alle Arten dieses Genus zu veröffentlichen. Dies führte zur Einführung der LEGER Datenbank (<http://leger2.gbf.de/cgi-bin/expLeger.pl>) um die funktionelle Genomanalyse zu unterstützen.

Hierbei bietet LEGER drei Optionen: (I) Es ist das erste Bioinformatische System, welches auf die funktionale Zuordnung von Genen und Proteinen zielt ; (II) Integrierte Visualisierungs-Werkzeuge, KEGG pathway und Genome Viewer erlauben die funktionale Untersuchung von komplexen Daten; (III) LEGER präsentiert die Ergebnisse von postgenomischen Studien. Dabei bietet LEGER eine nicht veröffentlichte Membran-Proteom Analyse von *Listeria innocua* und visualisiert die Information von experimentell validierten Informationen der subzellulären Lokalisierungen von 789 verschiedenen listeriellen Proteinen [29].

Eine umfassende aktuelle Zusammenfassung der Pathogenomik, einschließlich der Proteomanalysen bei *Listeria monocytogenes* steht durch das aktuelle Review (Hain et.al, März 2007) zur Verfügung [64].

## 2.2 Listeria als Modellorganismus

### 2.2.1 Allgemeine Mikrobiologie der Listerien

Listerien sind Gram-positive, nicht sporulierende Bakterien mit fakultativ anaerober Lebensweise. Als in der Natur ubiquitär vorkommende kurze Stäbchen (0,5 x 1-2 µm) können Listerien nicht nur aus Pflanzenmaterial, Wasser- und Bodenproben isoliert werden, sondern sind auch im Gastrointestinaltrakt des Menschen und verschiedener Tiere (Schaf, Ziege) zu finden. Etwa 10 % der Bevölkerung tragen *Listeria monocytogenes* als Bestandteil ihrer Darmflora, ohne dass dies zu einer Beeinträchtigung ihrer Gesundheit führt [62]. Die Bakterien sind peritrich begeißelt und zeichnen sich durch eine charakteristische Beweglichkeit bei Wachstum im Temperaturbereich von 20 - 25°C aus. Bei optimalen Wachstumstemperaturen von 30 - 37°C lässt sich jedoch keine Bewegung mehr feststellen, und die Flagellinproduktion ist stark reduziert [121] [141].

Derzeit umfasst die Gattung *Listeria* sechs Arten: *Listeria monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri* und *L. grayi*. Die früher eigenständige Art *L. murrayi* wurde als Subspezies von *L. grayi* neu eingeordnet [78]. Die Gattung *Listeria* ist eng verwandt mit den Gattungen *Brochothrix* und *Bacillus* und lässt sich durch ihre unterschiedlichen biochemischen (Fermentation verschiedener Zucker, Säurebildung) und hämolysischen Eigenschaften klassifizieren [144] [152].

Listerien tolerieren einen weiten Temperaturbereich und können bei -0,4 - 50°C (Walker und Stringer, 1987) wachsen, ihr Temperaturoptimum liegt bei 30 - 37°C.

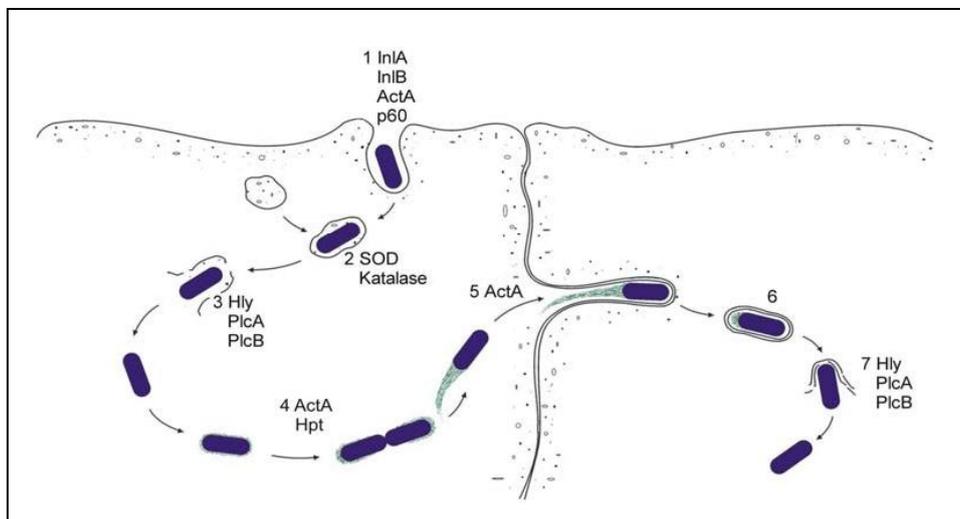
Zudem vermehren sie sich noch bei Salzkonzentrationen von 10 % NaCl und pH-Werten im Bereich von pH 5,5 - 9,6. Die Bakterien können selbst NaCl-Konzentrationen bis zu 20 % und längere Perioden des Trocknens und Gefrierens mit anschließendem Auftauen überleben [76] [144] [77].

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 über 16S rRNA-Analyse, DNA/DNA-Hybridisierung mit Listerien spezifischen Sonden, Antikörperdetektion oder DNA-Amplifikation mittels PCR nachweisen [11] [12] [142] [90].

## 2.2.2 Infektionszyklus und Virulenzfaktoren von *Listeria monocytogenes*

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 [17] [24] [90].



**Abb. 2:** Der Infektionszyklus von *L. monocytogenes* (modifiziert nach Tilney und Portnoy, 1990; Kreft, 1995; entliehen Dissertation S. Altmann, 2002) [91] [153] [3].

Der Infektionszyklus von *L. monocytogenes* ist bisher am detailliertesten untersucht und beschrieben worden (s. Abb.:2):

*L. monocytogenes* bevorzugt Makrophagen als Wirtszellen, wurde jedoch auch in etlichen anderen eukaryontischen Zelltypen wie Epithelzellen, Fibroblasten, Enterozyten, Hepatozyten und dendritischen Zellen beobachtet. 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 wie Epithelzellen oder Hepatozyten aufgenommen werden. Bei nicht-phagozytischen Zellen wird die Phagozytose durch bakterielle Faktoren induziert.

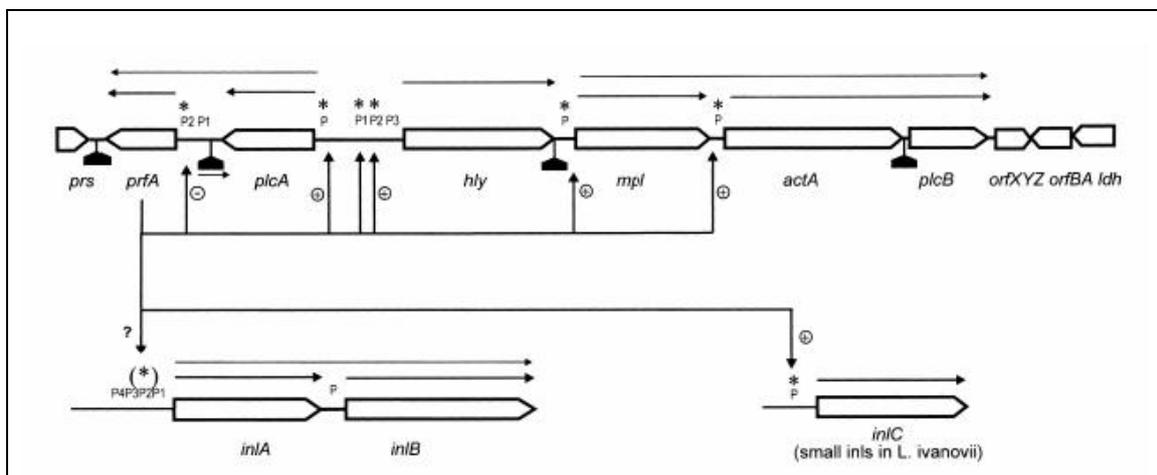
Im Phagosom müssen die Bakterien zunächst die antibakteriellen Abwehrmechanismen der Wirtszelle („oxidativer burst“, evtl. Verschmelzung mit Lysosomen zum Phagolysosom) überstehen, bevor es nach ca. 30 min. durch die Sekretion von Listeriolysin O, einem porenbildenden Zytolysin, zur Auflösung der phagolysosomalen Membran kommt. Nach Entkommen in das Zytoplasma der Wirtszelle kann sich *L. monocytogenes* mit einer Verdopplungszeit von ca. 1 h vermehren [46].

Im Zytoplasma sind die Bakterienzellen zunächst von diffusem Wirtszellaktin umgeben, bis es nach 2 h zur Reorganisation der Aktinfilamente in einen kometenähnlichen Schweif an einem Zellpol kommt [86, 88] [145]. Mit Hilfe dieses Aktinschweifs können sich die Listerien intrazellulär mit einer Geschwindigkeit von ca. 1  $\mu\text{m/s}$  fortbewegen [26]. 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 jedoch wieder und entkommt so 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 [154].

Beim Menschen verläuft die Infektionsroute normalerweise über den Gastrointestinaltrakt. Nach oraler Aufnahme kontaminierter Lebensmittel gelangt *L. monocytogenes* in den Darm und dringt dort vermutlich in verschiedene Darmzelltypen wie die M-Zellen der Peyer'schen Platten und Darmepithelzellen ein [130] [103]. Anschließend überschreiten die pathogenen Bakterien die Darmbarriere und werden in der darunterliegenden Lamina propria von phagozytischen Zellen aufgenommen. Über die Blutbahn erfolgt eine Ausbreitung im ganzen Körper, wobei Leber und Milz bevorzugte Orte der Primärinfektion sind. Schließlich können die Listerien die Placenta oder die Blut-Hirn-Schranke passieren und die für eine Meningitis typischen Symptome auslösen.

### 2.2.3 Organisation und Kontrolle der Virulenzgene von *L. monocytogenes*

Für die erfolgreiche Invasion, das Überleben innerhalb der eukaryontischen Wirtszelle und die Ausbreitung im infizierten Organismus benötigt *L. monocytogenes* eine Reihe von Virulenzfaktoren (Abb.2 ), die größtenteils in einem Virulenzgenkluster (Abb.3 ) angeordnet sind [126-128]. Die koordinierte Expression dieser Virulenz-assoziierten Gene wird durch den positiven Regulationsfaktor PrfA kontrolliert, der selbst Bestandteil des Klusters ist [18].



**Abb. 3:** Das Virulenzgenkluster von *Listeria monocytogenes* **P**=Promotor; **(\*)**= Promotor enthält prfA-Box; die Pfeile zeigen die verschiedenen Transkripte; **(+)** bzw. **(-)**= Transkriptionsinduktion bzw. -repression. Entliehen: Kreft, J. and J.A. Vazquez-Boland, *Regulation of Virulence Genes in Listeria*, J Med Microbiol, 2001 [92]

Die meisten Virulenzgene von *L. monocytogenes* befinden sich in einer 9,6 kb großen, chromosomalen Region, dem sog. Virulenzgenkluster [126-128]. 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 drei weitere offene Leseraster (ORFX, -Y und -Z) mit unbekannter Funktion enthält [105].

Dieser gesamte Bereich wird von zwei Haushaltsgenen flankiert: stromaufwärts von *prfA* liegt das Gen *prs*, das für eine Phosphoribosyl-Pyrophosphat-Synthetase kodiert [60], stromabwärts vom Lecithinase-Operon wird eine Lactatdehydrogenase vom Gen *ldh* kodiert. Neben den im Virulenzgenkluster befindlichen Genen werden noch weitere listerielle Gene durch PrfA reguliert. Hierzu zählen unter anderem diverse Internalin-Gene, die sich jedoch in anderen Bereichen des Chromosoms befinden.

## 2.2.4 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.

### Internaline

An der Invasion von *Listeria monocytogenes* in nicht-professionell phagozytierende Zellen wie Darmepithelzellen sind verschiedene Internaline beteiligt. Bisher zählen zu der Internalin-Multigenfamilie neun Internaline: Internalin A und B [45], Internalin C [41] [31] sowie die erst vor kurzem identifizierten Internaline C2, D, E, F, G und H [41] [34] [131].

Die Hauptmerkmale dieser Proteine sind eine N-terminale Signalsequenz, zwei Repeatregionen (A und B), von denen die erste Leucin-reiche Repeats (LLR) enthält, und ein C-terminaler Membrananker mit LPXTG-Motiv. Die C-terminale Region besitzt strukturelle Homologien zu verschiedenen Oberflächenproteinen Gram-positiver Kokken, die zur Gruppe der Adhäsine gerechnet werden [33, 35] [45].

Über die Expression verschiedener Internaline scheint *L. monocytogenes* in unterschiedliche Zelltypen eindringen zu können [94]

### 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*) kodiert wird. Spontan auftretende Rauh-Mutanten sind gekennzeichnet durch eine rauhe Kolonieoberfläche und stark verminderte p60-Produktion. Sie besitzen verringerte Adhärenz und Invasivität in verschiedene Zelltypen. Die sog. R-Mutanten bilden während ihres Wachstums lange Zellketten, in denen die Bakterien durch Doppelsepten getrennt sind. Der Grund dafür ist, dass p60 eine Mureinhydrolaseaktivität besitzt, welche für normale Septum-Formation und Lebensfähigkeit der Zelle notwendig ist [166].

### Vip

Das Oberflächenprotein Vip, welches ein LPXTG-Motiv trägt und von PrfA positiv reguliert wird, wird durch die Sortase A an die Zellwand verankert und wird für das Eindringen in einige Säugerzellen benötigt. Als Rezeptor wurde Gp96 identifiziert, wobei Interaktionen mit dem Wirt einen neuen Virulenzfaktor vermuten lassen [15]

### 2.2.5 Überleben im 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) auch die Verschmelzung des Phagosoms mit Lysosomen und können schließlich aus dem Phagolysosom entkommen.

#### **Superoxid-Dismutase, Katalase**

Nach der Aufnahme ins Phagosom, insbesondere aber nach der lysosomalen Fusion, 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  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{O}_2^-$ ,  $\text{OH}^\bullet$  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 [10] [90]. Da diese Enzyme an der bakteriellen Verteidigung gegen die Abwehrmechanismen der eukaryontischen Wirtszelle beteiligt sind, können sie als mögliche Virulenzfaktoren von *Listeria* angesehen werden [17].

#### **Listeriolysin O**

Listeriolysin O (LLO) ist ein extrazelluläres, porenbildendes Hämolyisin, welches *L. monocytogenes* ermöglicht, aus dem Phagolysosom der eukaryontischen Wirtszelle zu entkommen. LLO gehört zur Familie der SH-aktivierbaren Zytolysine, von denen Streptolysin O (SLO) aus *Streptococcus pyogenes* der Prototyp ist [49, 50].

#### **Phosphatidylinositol-spezifische Phospholipase C**

Die Phosphatidylinositol-spezifische Phospholipase C (PI-PLC) ist ein weiteres listeriell Protein, das vermutlich am Entkommen aus dem Phagolysosom beteiligt ist. PI-PLC ist ein 36,3 kDa schweres, sekretiertes Protein, das eine hohe Substratspezifität für Phosphatidylinositol aufweist. Es wird vom Gen *p/cA* kodiert und ist PrfA-reguliert.

Man nimmt an, dass PI-PLC zusammen mit LLO die Zerstörung des Phagosoms bewirkt. So könnte diese Phospholipase durch die Hydrolyse membranständiger Proteine den Zugang zur phagosomalen Membran und damit die Lyse des Phagosoms durch LLO erleichtern [145].

## 2.2.6 Vermehrung und Verbreitung über die Zellgrenzen hinweg

Nach Verlassen des Phagolysosoms kommt es im Zytoplasma der Wirtszelle zu einer Vermehrung der Bakterien mit einer Verdopplungszeit von ca. 1 h [46]. Während des Wachstums sind die Listerien zunächst von einer diffusen Wolke aus Wirtszellaktin umgeben, das sie nach 2 h in eine kometschweifähnliche Struktur an einem Zellpol umlagern. Mit Hilfe dieses Aktinschweifs können sich die Bakterien intrazellulär fortbewegen und benachbarte Zellen infizieren.

### ActA

Das listerielle Oberflächenprotein ActA trägt entscheidend zur Fortbewegungsfähigkeit der Listerien im Zytoplasma der Wirtszelle bei und vermittelt somit auch die Ausbreitung der Bakterien von Zelle zu Zelle.

Sobald die Listerien aus dem Phagolysosom entkommen sind, werden sie von einem Saum aus zellulären Aktinfilamenten umgeben, die nach 2 h zu einem kometenartigen Aktinschweif („comet tail“) reorganisiert werden [154]. Das Oberflächenprotein ActA scheint der einzige listerielle Faktor zu sein, der für die Rekrutierung von Aktinfilamenten der Wirtszelle benötigt wird [124]. 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 Mikrokolonien. Zudem sind diese Listerien in ihrer Virulenz verringert, da auch keine Zell-zu-Zell-Ausbreitung stattfinden kann [30] [87].

Mit Hilfe des Aktinschweifs können sich die Listerien nun im Zytoplasma fortbewegen. Dabei findet eine kontinuierliche Einlagerung von Aktinmonomeren in den Schweif statt, wodurch das Bakterium in Richtung des ActA-freien Zellpols vorwärtsgedrückt wird. Die intrazelluläre Fortbewegungsgeschwindigkeit ist dabei proportional zur Rate der Aktinpolymerisation bzw. zur Länge des Aktinschweifs und kann Werte bis 1,5 µm/s erreichen [109] [139] [148-151].

### Lecithinase

Die Lecithinase stellt neben der Phospholipase C (→2.3.2) eine weitere Phospholipase C von *L. monocytogenes* dar. Das *plcB*-Gen kodiert 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.

Die PC-PLC von *L. monocytogenes* hydrolysiert nicht nur Phosphatidylcholin (Lecithin), sondern auch Phosphatidylserin, Phosphatidylethanolamin und in geringem Maße Sphingomyelin. In-frame-Deletionsmutanten zeigen auch hier eine abgeschwächte Virulenz und sind nicht mehr in der Lage sich in benachbarte Zellen auszubreiten. Es lässt sich eine Anhäufung von Bakterien in Doppelmembran-Vesikeln beobachten, wohingegen sich beim Entkommen aus dem primären Phagolysosom keine Unterschiede zum Wildtyp erkennen lassen. Die Fähigkeit der Listerien sich nach der Zell-zu-Zell-Ausbreitung aus Doppelmembran-Vesikeln befreien zu können, um einen neuen Vermehrungs- und Verbreitungszyklus zu starten, scheint teilweise auf der Lecithinase-Aktivität zu beruhen [146] [157] [116].

### **Metalloprotease**

Das *mpl*-Gen von *Listeria monocytogenes* kodiert die Zn-abhängige Metalloprotease. Bei Untersuchungen von Transposoninsertions-Mutanten im *mpl*-Gen konnte gezeigt werden, dass diese sowohl eine verringerte Virulenz als auch eine geringere Lecithinaseproduktion aufweisen. Auch lässt sich im Kulturüberstand dieser Mutanten nur noch die 33 kDa-schwere Form des Lecithinasepolypeptids finden. Dies legt die Vermutung nahe, dass die Metalloprotease für die Reifung der PC-PLC benötigt wird [106] [134] [129].

## 2.3 Potentielle Virulenzgene und Virulenz-assoziierte Gene bei *Listeria monocytogenes*

Neben diesen Virulenzfaktoren (→2.2), welche die unterschiedlichen Phasen des Infektionszyklus gewährleisten und welche *Listeria*-spezifisch sind, gibt es noch eine Reihe weiterer Proteine, welche für das Überleben und die Replikation in der eukaryontischen Wirtszelle notwendig sind. Diese sind zum einen Proteine, welche mehr oder weniger *housekeeping* Funktionen innehaben und den Stoffwechsel während des intrazellulären, saprophytischen Lebensstils aufrechterhalten.

Dazu gehören das zur Familie der Ferritin-ähnlichen Dps-Proteine gehörende Protein Fri [118], die Proteine Fur und PerR, welche die Aufnahme von Eisen katalysieren [135], die Glucose-6-P-Translokase Hpt, welche intrazellulär Hexose-Phosphate in die Bakterienzelle transportiert und somit die Energievorräte des Wirts nutzbar macht [21].

Andererseits zählen hierzu Proteine, welche Stress-Mediatoren sind und welche die Adaptation an die Abwehrmechanismen des Wirts vermitteln – darunter der alternative Sigma Faktor  $\sigma^B$ , welcher außer der Regulation von Genen, welche für das Überleben unter Stressbedingungen notwendig sind auch zur Genexpression während der Infektion beiträgt [162] [48, 81, 111], sowie die *clp* Gene, welche ubiquitär unter Prokaryonten und Eukaryonten vorkommen und welche als Proteasen und Chaperone fungieren. In *Listeria* wurden drei *clp* Gene nachgewiesen, welche einen Einfluss auf die Virulenz haben. ClpC vermittelt das frühe Entkommen aus dem Phagosom [136] [137] und ist ebenso notwendig für die Zelladhäsion und Invasion [113]. Die ClpE ATPase spielt ebenso eine Rolle bei der Virulenz von *Listeria monocytogenes* [112] und eine ClpP Mutante präsentiert einen Defekt bei der intrazellulären Replikation [47]. Des Weiteren konnte ein Einfluss auf die Virulenz festgestellt werden für das Zwei-Komponenten-Signal-Transduktions-System *lisRK* [25], sowie der Gallensalz-Hydrolase *bsh* auf die intestinale und hepatische Kolonisation [40]. Als weiteres Chaperon, welches an der Virulenz beteiligt ist, wurde ein cytosolisches-Ribosom assoziiertes Chaperon *tig* identifiziert, welches außer einer Beteiligung an unterschiedlichen Stressbedingungen auch in Mäusen eine Reduktion der *Listeria*-Kolonisation von Leber und Milz zeigte [8].

Natürlich vermitteln auch Zelloberflächenproteine von *Listeria* den Kontakt zum eukaryontischen Wirt und damit Mechanismen, wie Adhäsion, Invasion oder das Überleben der *Listeria*.

Zu dieser Gruppe gehört die Transamidase Sortase Srt, welche die kovalente Verankerung von Oberflächenproteinen, welche ein LPXTG- Motiv tragen, wozu auch die Internaline gehören, an das Peptidoglykan der Zellwand vermittelt [7], des weiteren das über GW-Module verankerte Autolysin Auto [14], sowie das zu dem Atl-Autolysin von *Staphylococcus aureus* homologe Protein Ami, welches ebenfalls über GW-Module verankert ist [13, 107, 108], außerdem das zu Fibronectin-Bindungsproteinen aus *S. pneumoniae*, *S. pyogenes* und *S. gordonii* homologe Fbpa, welches als Chaperone oder Escort-Protein für Listeriolysin O und Internalin B dient [32]. Als weites essentielles Protein für die Virulenz wurde Lmo2537 identifiziert, welches zu 62 % homolog zu der Kognat-Epimerase von *Bacillus subtilis* ist und bei *Listeria* an der Synthese von Lipoteichonsäure beteiligt ist – die Knockout Mutanten stellten sich in vivo in Mäusen als vollständig avirulent dar [36].

### **2.3.1 Untersuchungen der intrazellulären Genregulation *Listeria monocytogenes* während Infektionen in Makrophagen**

Obwohl die klassischen Virulenzfaktoren (→ 2.2) und ihr Regulator PrfA für die erfolgreiche Infektion von eukaryontischen Wirtszellen von *Listeria monocytogenes* bekannt sind, ist dennoch nur wenig bekannt über die Gene welche das intrazelluläre Überleben und Vermehren vermitteln.

Bislang gelang es erst einmalig das intrazelluläre Proteom von *Listeria monocytogenes* während der Infektion in eukaryontischen Wirtszellen darzustellen. T. Hanawa gelang 1995 durch selektive radioaktive Markierung der Listerien mit [<sup>32</sup>S]-Methionin in J77-Makrophagen und unter Verwendung von Cycloheximid welches die Proteinsynthese in den Makrophagen unterbindet eine zweidimensionale Darstellung des listeriellen Proteinprofils in Makrophagen. Diese Proteine wurden nicht identifiziert aber Hanawa konnte durch vergleichende Experimente feststellen, dass es sich dabei nicht um Stressproteine handelte. [67]

Durch Screening einer Tn917-lac Insertions-Mutanten-Bank konnte die spezifische Induktion von Genen der Purin- und Pyrimidin-Synthese als auch der Argininaufnahme in J774-Makrophagen festgestellt werden [82]. Weiterhin lieferten die Untersuchung einiger Aminosäuren auxotrophen Mutanten Hinweise darauf, dass alle drei aromatischen Aminosäuren und Adenin essentiell für effiziente cytosolische Replikation in J774-Makrophagen sind [104].

Eine reduzierte intrazelluläre Replikation im eukaryontischen Zytosol wurde ebenso für eine *oppA* Mutante festgestellt, welches den Transport von Oligopeptiden vermittelt [9].

Eine Mutante des Transporters für phosphorylierte Hexosen, *hpt*, in *Listeria monocytogenes* zeigte signifikant reduzierte Replikation im Zytosol. Dieser Transporter zeigte sich strikt von PrfA abhängig. [21].

Weiterhin zeigte eine *Listeria monocytogenes* Mutante für eine Lipoat Protein Ligase LplA1 ein vermindertes intrazelluläres Wachstum. Weitere Untersuchungen zeigten dass dies durch einen Verlust der Funktion der Pyruvat Dehydrogenase verursacht wird, deren E2 Untereinheit das Ziel von LplA1 ist [119].

Umfassendere Informationen zu dem intrazellulären Überleben von *Listeria monocytogenes* in Makrophagen konnten DNA-microarray und Real-Time-PCR Untersuchungen liefern. Ergänzende Ergebnisse wurden in dieser Veröffentlichung durch das Screening einer Mutagenese-Bank welche nach Replikations-defizienten Mutanten gescreent wurden gewonnen [80]. Hier wurden Hinweise darauf gewonnen, dass *Listeria monocytogenes* alternative Glucosequellen wie phosphorylierte Glukose und Glycerin sowie Stickstoffquellen wie Ethanolamin intrazellulär nutzen kann. Weiterhin konnten Hinweise darauf gefunden werden dass der Pentosephosphat Zyklus und nicht die Glukolyse den Hauptstoffwechselweg in der Wirtszelle darstellt. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Synthese von Arginin, Isoleucin, Leucin, und Valin, sowie eine Reihe von artspezifischen Phosphoenolpyrat abhängigen Phosphotransferasesystemen eine Rolle spielen.

Eine ähnliche Untersuchung von *Listeria monocytogenes* anhand der Makrophagen-Zelllinie P388D1 mittels Microarray und Mutantenuntersuchungen lieferte entsprechende Ergebnisse [20]. Diese Arbeit lieferte ebenso Hinweise auf Limitierung von intrazellulärer Glucose, eine Abnahme der mRNA kodierenden Enzyme, Induktion alternativer Kohlenstoff Stoffwechselwege und deren Regulation. Die Expressionen umfassten Gene, welche Virulenz-assoziert sind, allgemeine Stressantworten vermittelten, Zellteilung und Veränderungen des Aufbaus der Zellwand betrafen einschließlich vieler Gene unbekannter Herkunft.

Auch für andere intrazelluläre Pathogene sind spezifische metabolische Anpassungen, welche für die erfolgreiche intrazelluläre Replikation in Makrophagen notwendig sind, bekannt. Beispiele hierfür sind *Salmonella typhimurium* [85], *Mycobacterium tuberculosis* [156] und *Shigella flexneri* [102].

## 2.4 Ablauf der *Listeria monocytogenes* Infektion in Makrophagen

Mikroorganismen haben die Fähigkeit, ihre Umgebung wahrzunehmen und auf Veränderungen in ihr mit einer Änderung der Gen-Expression und folglich der Protein-Synthese zu antworten. Eine der komplexesten Umgebungen, auf den das Pathogen stoßen kann ist das Innere der Wirtszelle. Dabei gibt es zwei Hürden, die das intrazelluläre Pathogen zu überwinden hat um in ihrem eukaryontischen Wirt zu überleben. Erstens muss das Pathogen sich die Nahrungs-Reserven der Wirtszelle erschließen. Zweitens muss es sich an die komplexe intrazelluläre Nische anpassen und dabei die natürlichen Abwehrreaktionen der Wirtszelle, wie z.B.. die Fusion der Phagosomen mit den Lysosomen zu überleben [95].

Nach Kontaktaufnahme über Mikrovilli auf der Plasmamembran werden die Listerien von den Makrophagen als professionellen Phagocyten aktiv aufgenommen und befinden sich danach in einem membranbegrenzten Endosom. Dieses Endosom wird angesäuert und verschmilzt mit den Lysosomen. In aktivierten Makrophagen werden Sauerstoffradikale und Stickstoffoxid, sowie antimikrobielle Peptide gebildet. Die Sauerstoffradikale und das reaktive Stickstoffoxid verhindern gemeinsam das Entkommen von *Listeria monocytogenes* aus Vakuolen in aktivierten Makrophagen [110]. Der nächste Schritt das Entkommen aus dem Phagosom oder Phagolysosom. Nach 90 min befinden sich noch 31% der Listerien in einem Endosom, während 69% sich frei im Cytoplasma befinden. Die Listerien sind von einer Wolke aus Aktinfilamenten umgeben. Nach 210 min befinden sich die meisten Listerien in Teilung, wobei die Verdopplungszeit ca. 1h beträgt, d.h. ca. dreimal langsamer als in BHI. Die Aktinfilamente organisieren sich, wobei der „Kometenschweif“ stets zum Zellinneren orientiert ist, wodurch sich die Listerien zur Zelloberfläche bewegen und von dem infizierten Makrophagen in eine nicht infizierte Zelle transferiert werden, wobei sich beim Transfer über die Zellgrenzen beide Zellmembranen als eine Doppelmembran um die Listerien hüllen. Hier beginnt der Infektionszyklus von Neuem [154].

Die mittlerweile sehr umfangreichen Erkenntnisse der molekularen Interaktionen zwischen Wirt und Pathogen von *Listeria monocytogenes* wurden in aktuellen „Review\_Artikeln“ zusammengefasst [125] [66].

### 2.4.1 Reaktion der Makrophagen auf die Infektion mit *Listeria monocytogenes*

Makrophagen bilden eine erste Abwehrfront gegen viele bakterielle Infektionen, wobei Sie infektiöse Organismen nicht immer vollständig beseitigen können und es viele Krankheitserreger gibt, die sie nicht erkennen können. Sie haben die Fähigkeit die Bausteine von bakteriellen Oberflächen zu erkennen und an sie zu binden. Wenn das geschieht, beginnen diese Phagozyten die Bakterien aufzunehmen und chemische Mediatoren, darunter die Cytokine freizusetzen und über diese Botenstoffe und durch Stimulierung der Lymphocyten die adaptive Immunantwort zu steuern.

Schon die Adhäsion der Makrophagen an *Listeria monocytogenes* vermittelt eine erste vorübergehende Induktion des Cytokins NF- $\kappa$ B. Diese Induktion wird von keinem der bekannten Virulenzfaktoren ausgelöst, sondern von Lipoteichonsäuren eines Bestandteils der Oberfläche von *Listeria monocytogenes*. Eine zweite, permanente Induktion von NF- $\kappa$ B ist nach der Freisetzung von *L. monocytogenes* ins Cytoplasma nachweisbar. Diese wird nur von virulenten Listerien ausgelöst und erfordert die Synthese der bakteriellen Phospholipide PlcA und PlcB in der Wirtszelle [68] [69].

Schon nach 10 min Infektion von J774-Makrophagen ist eine IP3 Erhöhung in der Wirtszelle nachzuweisen. IP3 ist ein Produkt der Hydrolyse von Pi-4,5-P2 (PIP2) durch eukaryontisches, Calcium aktiviertes PIC und stellt einen wichtiger Mediator der Ca<sup>2+</sup> Freisetzung aus dem Endoplasmatischen Retikulum dar. Diese Aktivierung wird vom Wildtyp, nicht aber einer LLO-Mutante ausgelöst. Auch bei einer PI-PLC-Mutante ist eine etwas verringerte IP3 Aktivierung festzustellen [54].

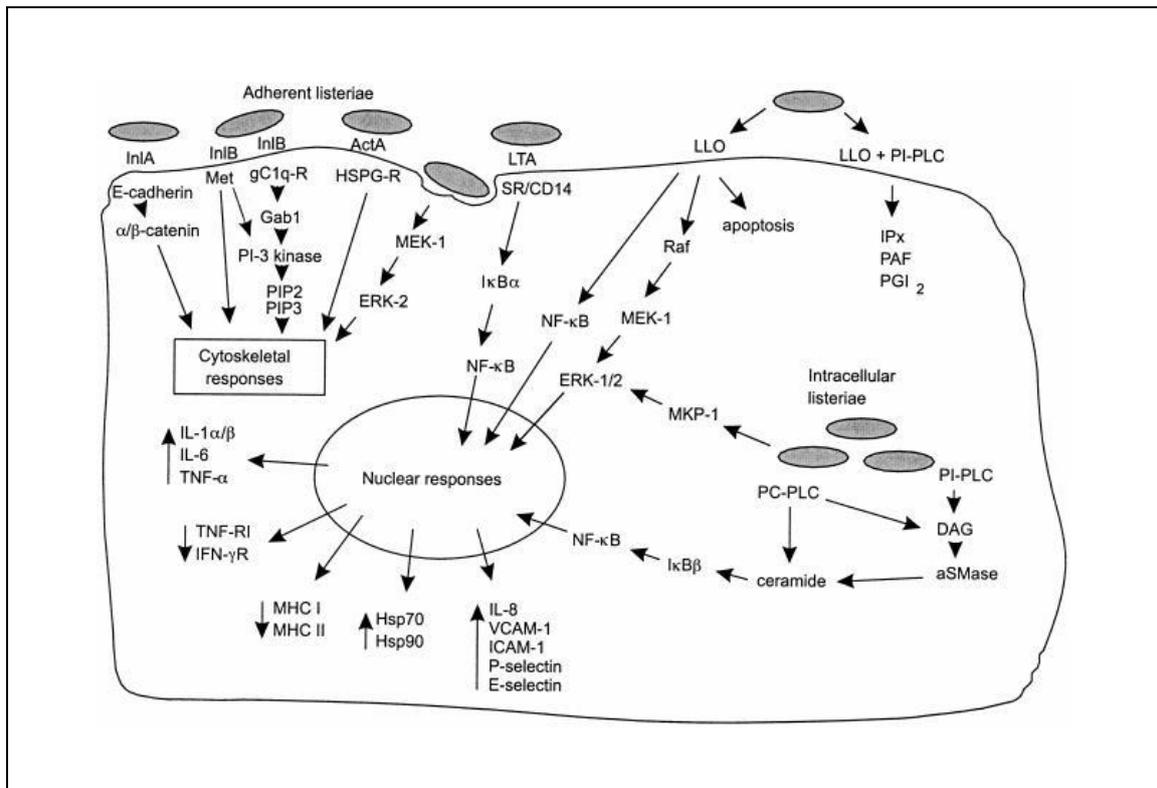
Da die Hydrolyse von PI (Phosphatidyl-Inositol) durch bakterielles PI-PLC in Diacylglycerol (DAG) resultiert und sowohl DAG , als auch Calcium bekannte Aktivatoren von Protein Kinase C (PKC) sind, wird eine Aktivierung von PKC in Wirtszellen angenommen [159].

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass vitale Listerien in der Maus-Makrophagen ähnlichen Zelllinie P338D1 die m-RNAs der Interleukine IL1- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 und von TNF- $\alpha$  rasch induzieren, wohingegen abgetötete Bakterien nur IL-1 $\beta$  induzieren [93]. Des Weiteren löst die Phagozytose von *L. monocytogenes* die Transkription des Hitzeschockproteins 70 (hsp70) in Makrophagen aus. Im Gegensatz dazu wird das Gen, welches das MHC-Klasse II Antigen I-Ab kodiert herunterreguliert noch während die Listerien sich im phagosomalen Kompartement befinden, wobei LLO eine Rolle zu spielen scheint.

## Einleitung

Ebenso wird das Antigen H-2K ein Hauptbestandteil des MHC-KlasseI Moleküls herunterreguliert, wobei hierbei nicht nur LLO eine Rolle spielt, sondern auch mehrere Gene des *Listeria Lecithinase-Operons* [143] [158]

Es erscheint wahrscheinlich, dass *Listeria monocytogenes* die intrazelluläre Signaltransduktion in Makrophagen in allen Phase der Infektion manipuliert und dadurch noch weitere Einsichten in die Säuger- Zellbiologie vermitteln wird [53].



**Abb. 4:** Entliehen: Vazquez Boland et al., *Listeria Pathogenesis and Molecular Virulence Determinants*, *Clinical Microbiological Reviews*, 2001) [158]  
 Abkürzungen: aSMase, Acidic Sphingomyelinase; gC1q-R, Komplement C1q Rezeptor; Hsp70, heat shock protein 70; Hsp90, heat shock protein 90; HSPG-R, HSPG Rezeptor; ICAM-1, Intercellular Adhesion Molekül 1; IFN-γR, IFN-γ Rezeptor; IPx, Inositolphosphate; LTA, Lipoteichonsäure; MEK-1, Mitogen-aktivierte Protein Kinase 1; Met, Rezeptor Tyrosine Kinase für HGF; MKP-1, Mitogen-aktivierte Protein Kinase Phosphatase 1; PAF, Platelet aktivierender Faktor; PGI<sub>2</sub>, Prostaglandin I<sub>2</sub>; PIP2, Phosphatidylinositol-(3,4)-bisphosphate; PIP3, Phosphatidylinositol-(3,4,5)-trisphosphate; PI-PLC, Phosphatidylinositol-spezifische Phospholipase C; SR, scavenger receptor; TNF-R1, TNF Receptor Type1; VCAM-1, Vasculäres Zell Adhäsions Molekül-1 [158].

## 3. Material

### 3.1 Geräte

Autoklaven	Webeco
Begasungsbrutschrank	Heraeus
Brutschränke	Heraeus, Memmert
Elektrophoresekammern	Institutswerkstatt
Elektrophoresekammern (Proteinauftrennung auf Minigelen)	Biorad
Ettan DALT Twelve Format Vertical System	Amersham Biosciences
Ettan DALT Gel Caster	Amersham Biosciences
Ettan™ IPGphor™ Isoelectric Focusing System	Amersham Biosciences
Feinwaage	Sartorius
Grobwaage	Sartorius
Heizblock	Liebisch
Immobiline Dra Strip Reswelling Tray	Amersham Biosciences
Klettphotometer	Summerson
Kühlzentrifuge	Beckmann; J 2-21
Magnetrührer	Hartenstein, Heidolph
Mikroskope	Zeiss, Leitz
Mikrowellengerät	Siemens
Minizentrifuge	Eppendorf Centrifuge 5415C
Netzgerät	Bio Rad Model 1000/500
PCR-Gerät	Techne Progene
pH-Meter	Metrohm, Herisau E 512
Photometer	Pharmacia LKB, Ultrospec III
Schüttelinkubatoren	Heidolph, REAX 2000
Sterilbänke	Heraeus
Ultraschallgerät	Sonifier® B-12;
Branson-Sonic-Power-Company	
UV-Fotoanlage	MitsubishiVortex
Heidolph REAX 2000	
Wasserbad	Memmert
Zählkammer	Fuchs-Rosenthal
Zentrifugationsrotoren	Beckmann JA 20

## 3.2 Verbrauchsmaterial

### Chemikalien

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

### Zellkulturmaterial

Die Zellkulturmedien wurden von der Firma Gibco-BRL bezogen.

Steriles Einwegmaterial stammte von den Firmen Falcon, Greiner, Millipore, Sarstedt. Trypsin aus Rinderpankreas lieferte die Firma Gibco.

### 3.2.1 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 steril zugesetzt und die Agarplatten gegossen.

LB-Medium:

Bacto-Pepton	10,0 g
Yeast-Extrakt	5,0 g
NaCl	10,0 g
ad 1000 ml H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	

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

BHI (brain heart infusion broth medium): BHI 37,0 g  
ad 1000 ml H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub>

### BHI Chargen

Für Proteomische Analysen wurde eine einzige Charge verwendet, welche speziell für Proteomische und Transkriptomische Analysen bevorratet wurde. Vergleichsstudien wurden mit einer weiteren BHI-Charge (BHI/lot.: 2056002) der Firma Difco durchgeführt.

### 3.2.2 Antibiotika

Antibiotika werden entweder in Ethanol oder Aqua<sub>dest</sub> gelöst Die Antibiotikalösungen werden bei -20°C gelagert oder in Aqua<sub>dest</sub> steril filtriert.

Antibiotikum	Stammlösung	Endkonz.	Anwendung
Chloramphenicol	10 mg/ml in 50% EtOH;	5 µg/ml 50 µg/ml	Proteinsyntheseinhibitor Bei <i>Listeria monocytogenes</i> in BHI-Medium und Zellkultur
Tetracyclin	10 mg/ml in 100% EtOH	5 µg/ml	Zellkultur (Medium zum Einfrieren der infizierten Zellkulturflaschen)

### 3.2.3 Medien und Zusätze für die Zellkultur

#### RPMI 1640 mit L-Glutamin (Gibco):

Rezeptur (mg/l)

Inorganic Salts

Calcium Nitrate • 4H <sub>2</sub> O	100.00
Potassium Chloride	400.00
Magnesium Sulphate	48.80
Sodium Chloride	6000.00
Di-Sodium Hydrogen Phosphate anhydrous	800.00
Sodium Hydrogen Carbonate	2000.00

Amino Acids

L-Alanyl-L-Glutamine in E15-885	445.90
L-Arginine • HCl	241.86
L-Asparagine • H <sub>2</sub> O	50.00
L-Aspartic Acid	20.00
L-Cystine	50.00
L-Glutamic Acid	20.00
L-Glutamine in E15-840, E15-842, E15-848	300.00
Glycine	10.00
L-Histidine Base	15.00
L-Hydroxyproline	20.00
L-Isoleucine	50.00
L-Leucine	50.00
L-Lysine • HCl	40.00

## Material

---

L-Methionine	15.00
L-Phenylalanine	15.00
L-Proline	20.00
L-Serine	30.00
L-Threonine	20.00
L-Tryptophan	5.00
L-Tyrosine	20.00
L-Valine	20.00
Vitamins	
P-Aminobenzoic Acid	1.00
D(+)-Biotin	0.20
Cholin Chloride	3.00
Folic Acid	1.00
Myo-Inositol	35.00
Nicotinamide	1.00
D-Pantothenic Acid (hemicalcium)	0.25
Pyridoxine • HCl	1.00
Riboflavin	0.20
Thiamine • HCl	1.00
Vitamin B12	0.005
Other Components	
D-Glucose anhydrous	2000.00
Glutathione (red.)	1.00
HEPES in E15-041 and E15-842	5957.50
Phenol Red in E15-039, E15-840, E15-041, E15-842, E15-885	5.00

### Zusätze:

FCS	Fetales Kälberserum (Biochrom KG)
iFCS	Durch 35 Minuten bei 65 °C inkubiertes, inaktiviertes FCS
Trypsin/EDTA	Gibco
Gentamicin	10 mg/ml (Sigma)
DMSO	(Sigma)

### 3.3 Bakterienstämme:

*L. monocytogenes* Sv 1/2a EGDe: Acc. No. ATCC BAA-679

schwach hämolytisch (Hly+/-); pathogen

Herkunft: Hahn, Berlin

für das „Listeria genome sequencing project“ verwendeter

Ausgangsstamm

Genomsequenz verfügbar unter: <http://genolist.pasteur.fr/ListiList>

### 3.4 Eukaryontische Zelllinien

Alle Zelllinien wurden von der *American Type Culture Collection* ATCC bezogen und wie folgt charakterisiert:

#### **J774 (ATCC TIB-67)**

Zelltyp: Monozyten-Makrophagen aus der Maus

Herkunft: wurden ursprünglich 1968 aus einem Tumor der BALB/c Maus (Haplotyp H-2<sup>d</sup>) isoliert.

Kulturmedium: 1640 RPMI + L-Glutamin/ 10 % (v/v) FKS ohne Zusätze.

## **3.5 Beads**

### **3.5.1 Dynabeads® anti Listeria**

Dynabeads® anti-Listeria ( $\varnothing$  2,8  $\mu$ m) sind Latex-Beads (Dynal, Oslo, Norwegen), an deren Oberfläche polyklonale Antikörper kovalent gebunden sind. Visköse oder fettige Proben sollten vor Gebrauch verdünnt werden. Die Probe wird in 1ml Aliquots mit 20 $\mu$ l Beads für 10 Minuten unter Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert, wobei die spezifischen Antikörper mit Listeria einen Komplex bilden. Anschließend wird der Bead-Bakterien-Komplex durch einen Magneten von der Suspension getrennt, für 10 min in 500 $\mu$ l PBST (pH 7,4) unter Schütteln gewaschen, in 100  $\mu$ l PBST resuspendiert und ausplattiert.

### **3.5.2 Dynabeads® M-270 Epoxy – CBD Beads (Beschichtung mit Phagenlysin Ply 118 von Martin Loessner)**

Dynabeads® M-270 Epoxy ( $\varnothing$  2,8  $\mu$ m) bestehen aus stark vernetztem Latex. In dessen Poren magnetische Partikel eingebettet sind. Die Beads sind von einer hydrophilen Schicht aus Epoxy-Gruppen umschlossen, die eine kovalente Bindung zu Proteinen über primäre Aminogruppen ermöglichen. Hierbei kann die Orientierung der Anordnung der „cell wall binding domain“ (CBD) des Phagen-Endolysins Ply 118 bei der Beschichtung nicht kontrolliert werden [98-101]. (Anwendung siehe unter → 3.5.1).

### **3.5.3 Kieselgel + Magnetit Beads (MERCK in Entwicklung; zur Verfügung gestellt von Dr. Karl Holschuh, Merck)**

Die Bindung der Kieselgel-Beads findet unspezifisch statt, wobei die Bindung vermutlich über Phosphatgruppen vermittelt wird. Die Bedingungen für die Bindung sind ein saurer pH-Wert von 2,5, wobei die Bindung nach 0,5 - 3min Invertieren der Proben erfolgt. Die Beads werden in einem MES-Puffer mit einem pH-Wert von 5,5 mit einem Breitbandantibiotikum (0,5 %) aufbewahrt. Ein Milligramm der Beads (Konzentration 50mg/ml) soll  $10^8$  Bakterien binden (= 20  $\mu$ l Beads).

### 3.5.4 Magnet zur Separation der Beads

Die magnetische Separation der Beads wurde mit dem Magnet MPC<sup>®</sup>-S von Dynal Biotech durchgeführt. Er besteht aus einem Permanentmagneten und 6 Halterungen für 1,5 ml Eppendorf-Gefäße. Mit dem Magneten werden die paramagnetischen Beads, welche sich homogen in der Lösung verteilt finden an einen Bereich der Gefäßwand konzentriert, so dass die Restflüssigkeit abgezogen werden kann.

### 3.6 Delta 2-D Software

Zur Auswertung der 2-Dimensionalen Proteingele wurde die Delta 2D Software Version 3.2 der DECODON GmbH in Deutschland verwendet. Diese Software legt 2 eingescannte Gelabbildungen anhand von mit der Hand gesetzten Vektoren übereinander und kann die Unterschiede der Intensität der einzelnen Spots in Farbmarkierungen umwandeln, wodurch eine Visualisierung der Unterschiede möglich ist. Hierbei werden gleich starke Spots gelb dargestellt, stärkere rot und schwächere grün. Die Unterschiede können auch quantifiziert und in den Quotienten der Unterschiede angegeben werden, wobei bei einem Vergleich von drei Gelen ein statistisch gesicherter Wert, der so genannte „student's t-test“ ermittelt werden kann, wobei die Wahrscheinlichkeit (Signifikanz) des ermittelten Wertes in Prozentwerten angegeben wird.

#### **Definition t-test**

Der t-Test ist eine Entscheidungsregel auf einer mathematischen Grundlage, mit deren Hilfe ein Unterschied zwischen den empirisch gefundenen Mittelwerten zweier Gruppen näher analysiert werden kann. Er liefert nur für intervallskalierte Daten zuverlässige Informationen. Deshalb gehört er zur Gruppe der parametrischen Verfahren.

Der t-Test arbeitet mit den Populationsparametern der Streuung und des arithmetischen Mittels, die mit Hilfe der Stichprobe geschätzt werden. Er liefert eine Entscheidungshilfe dafür, ob ein gefundener Mittelwertsunterschied rein zufällig entstanden ist, oder ob es wirklich bedeutsame Unterschiede zwischen den zwei untersuchten Gruppen gibt. Mathematisch gesprochen beurteilt dieses Verfahren, ob sich zwei untersuchte Gruppen systematisch in ihren Mittelwerten unterscheiden oder nicht. Der wichtigste Wert für die Durchführung eines t-Tests ist die Differenz der Gruppenmittelwerte. Diese Differenz bildet den Stichprobenkennwert des t-Tests.

(<http://www.quantitative-methoden.de/Dateien/leseprobe.pdf>)

### Definition Signifikanz

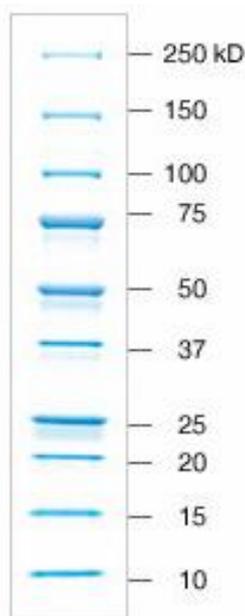
Es hat sich eingebürgert, die *obere Grenze für die Irrtumswahrscheinlichkeit*, die man noch zu akzeptieren bereit ist, auf 5 Prozent festzulegen. Diese Obergrenze heißt *Signifikanzniveau*.

Die Wahl des Wertes 5% ist wie folgt motiviert: eine *normalverteilte Zufallsgröße* nimmt nur mit einer Wahrscheinlichkeit von weniger als 5% einen Wert an, der sich vom Erwartungswert um mehr als die *zweifache Standardabweichung* unterscheidet. Bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von kleiner oder gleich 5% spricht man von *Signifikanz*. Das bedeutet aber in der Praxis, dass eine von 20 Untersuchungen, bei denen die Nullhypothese richtig ist, zu dem Schluss kommt, sie sei falsch. Wählt man als Grenze für die Irrtumswahrscheinlichkeit den Wert 0,3%, so spricht man von einem *hochsignifikanten* Ergebnis; die Motivation für den Wert 0,3% ist ähnlich: Eine normalverteilte Zufallsgröße nimmt nur mit einer Wahrscheinlichkeit von weniger als 0,3% einen Wert an, der sich vom Erwartungswert um mehr als die *dreifache Standardabweichung* unterscheidet.

([http://de.wikipedia.org/wiki/Statistische\\_Signifikanz](http://de.wikipedia.org/wiki/Statistische_Signifikanz))

## 3.7 Größen- und Molekulargewichtsstandard

Precision Plus Protein™ Standard (Bio-Rad Laboratories, Germany)



### **3.8 Datenbanken und Internetadressen**

<http://www.genolist.pasteur.fr/ListiList/>

<http://www.genome.ad.jp/kegg/>

<http://ncbi.nlm.nih.gov/>

<http://.genome.wustl.edu/>

<http://sanger.ac.uk>



## 4. Methoden

### 4.1 Proteinbiochemische Methoden

#### 4.1.1 Eindimensionale-SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung von Proteinen entsprechend ihrer molekularen Masse in einem elektrischen Feld wird mittels der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese durchgeführt. Grundlage hierfür ist die denaturierende Behandlung der Proteine mit Natriumdodecylsulfat (SDS) und  $\beta$ -Mercaptoethanol. Das stark negativ geladene SDS bindet an die hydrophoben Regionen des Proteins und führt zur Ausbildung eines SDS-Protein-Komplex, dessen negative Ladung in etwa proportional zum Molekulargewicht des Proteins ist.  $\beta$ -Mercaptoethanol löst als reduzierende Substanz alle Disulfid-Bindungen im Protein. Auf diese Weise können Proteine unabhängig von ihrer ursprünglichen Ladung und Konformation, ihrer Größe nach im Spannungsfeld aufgetrennt werden.

Zwei 12%ige Mini-Polyacrylamidgele:

	<u>12% Trenngel (20ml)</u>	<u>5% Sammelgel (6ml)</u>
H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	6,6 ml	4,1 ml
30% Acrylamidlösung	8,0 ml	1,0 ml
1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)	5,0 ml	-
1,5 M Tris-HCl (pH 6,8)	-	0,75 ml
10% SDS	200 $\mu$ l	60 $\mu$ l
10% APS	200 $\mu$ l	60 $\mu$ l
TEMED	8 $\mu$ l	6 $\mu$ l

Nach Zugabe des Radikalbildners TEMED wird die Trenngellösung sofort zwischen zwei – durch Spacer getrennte – Glasplatten bis ca. 3 cm unterhalb des Glasplattenrandes gegossen und zur Ausbildung einer geraden Front mit H<sub>2</sub>Odest überschichtet.

## Methoden

---

Ist das Trenngel auspolymerisiert, kann das Sammelgel gegossen werden und ein Teflonkamm eingesetzt werden. Das fertige Gel wird in die mit 1x-SDS-Laufpuffer gefüllte Elektrophoresekammer eingesetzt.

Die Proteinproben bzw. Ganzzell-Lysate werden mit 2x Laemmli-Puffer versetzt, 10 Min. gekocht und in die Geltaschen pipettiert. Als Molekulargewichtsstandard werden zudem 10 µl des „Broad Range Markers“ aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgt bei 150 Volt und wird beendet, nachdem die Farbstofffront aus dem Gel gelaufen ist.

### 10x SDS-Laufpuffer:

250 mM Tris

2 M Glycin

1% SDS

### 5x Laemmli-Puffer:

62,5 mM Tris-HCl (pH 8,0)

10% Glycin

2% SDS

5% β-Mercaptoethanol

0,05% Bromphenolblau

Im Anschluss an die Elektrophorese ist es möglich die aufgetrennten Proteine im Polyacrylamid-Gel durch Coomassie-Blau anzufärben. Das Gel wird hierzu 15-60 Min. in einer Färbelösung geschwenkt und anschließend in 10% Essigsäure oder Aqua<sub>dest</sub> so lange entfärbt, bis sich die blau gefärbten Proteinbanden deutlich vom Hintergrund absetzen.

### Coomassie-Färbelösung:

45% Ethanol

10% Eisessig

0,25% Coomassie Brilliant Blue R250

### **4.1.2 Zweidimensionale-SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (2-D-SDS-PAGE)**

Die zweidimensionale (2D-) Gelelektrophorese, die erstmals von O'Farrell und Klose 1975 [83, 84] [117] beschrieben wurde, ist eine Kombination aus zwei unabhängigen Elektrophoreseschritten, die der Auftrennung von komplexen Proteingemischen dient. Durch die isoelektrische Fokussierung (IEF) erfolgt zunächst eine Auftrennung der Proteine in der ersten Dimension nach ihrem isoelektrischen Punkt. Die sich anschließende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese gewährleistet eine Auftrennung der Proteine in der zweiten Dimension nach ihrem relativen Molekulargewicht. Dies wird durch SDS (Natriumdodecylsulfat), ein anionisches Detergenz ermöglicht, durch welches die Eigenladung der Proteine überdeckt wird. Es entstehen anionische Mizellen mit konstanter Nettoladung pro Masse-Einheit.

Da durch SDS die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Molekülen aufgespalten werden, sind die Tertiär- und Sekundärstrukturen aufgelöst. Durch den Zusatz von reduzierenden Thiolverbindungen wie z.B.. Dithiothreitol (DTT) werden außerdem vorhandene Disulfidbrücken der Proteine getrennt. Bei der Elektrophorese ergibt sich eine lineare Beziehung zwischen dem Logarithmus des Molekulargewichtes und den relativen Wanderungsstrecken des SDS-Polypeptid-Komplexes. Markerproteine ermöglichen die Ermittlung der Molekulargewichte unbekannter Proteine.

Nach Visualisierung der Proteine im Gel entspricht jeder Spot auf dem 2D-Gel einem einzelnen Protein aus der Gesamtproteinprobe. Auf diese Weise können über 10.000 Proteine pro Gel aufgetrennt werden.

#### **4.1.2.1 Auftrennung von Proteinen in der ersten Dimension durch isoelektrische Fokussierung (IEF)**

Bei der IEF werden Proteine, die amphotere Moleküle darstellen, im elektrischen Feld anhand ihres isoelektrischen Punktes ( $pI$ ) voneinander getrennt. Ein Protein wandert hierbei in einem pH-Gradientengel bis zu dem spezifischen pH-Wert, an dem seine Nettoladung, die durch die positiven und negativen Ladungen der Aminosäureseitenketten bestimmt wird, gleich Null ist. Liegt der umgebende pH-Wert eines Proteins unter dem  $pI$ -Wert, so ist es positiv geladen und wandert im elektrischen Feld in Richtung Kathode.

Liegt der pH-Wert über dem pI-Wert, ist es negativ geladen und wandert in Richtung Anode, bis es seinen pI-Wert erreicht.

Bei den in dieser Arbeit verwendeten pH-Gradientengelen handelt es sich um so genannte immobilisierte pH-Gradienten (IPG-Strips), wobei die dehydrierte Gelmatrix auf einem Kunststoffstreifen fixiert ist, welche von Amersham Biosciences bezogen wurden. Die zur Herstellung der pH-Gradienten verwendeten Immobiline bestehen aus definierten sauren bzw. basischen Gruppen, die jeweils mit Acrylamidmonomeren verknüpft sind. Der pH-Gradient wird durch kontinuierliche Mischung zweier unterschiedlicher Immobilin-Lösungen erreicht, die mit dem Acrylamid kopolymerisieren. Auf diese Weise ist das individuelle Mischen eines Gradienten möglich, der an die Gelmatrix gebunden ist und daher sehr stabil und gut reproduzierbar ist. Die „Immobilin<sup>TM</sup> DryStrip gels“ von Amersham Biosciences sind in unterschiedlichen Längen und in unterschiedlichen pH-Gradienten erhältlich.

#### **4.1.2.2 Rehydrierung der immobilisierten pH-Gradientengele (IPG-Strips)**

Da die Gelmatrix auf den immobilisierten pH-Gradientengelen (IPG-Strips) dehydriert ist, muss sie vor der Isoelektrischen Fokussierung rehydriert werden.

##### Rehydrierungslösung:

7 M Harnstoff

2 M Thioharnstoff

4 % CHAPS

etwas Bromphenolblau (BPB)

Die Rehydrierung erfolgt in einer Apparatur, welche dem „Reswelling tray“ von Amersham Biosciences entspricht (Werkstattanfertigung). Pro Strip werden 340 µl Rehydrierungslösung mit 0,5 % IPG-Puffer (entsprechend dem pH-Bereich des IPG-Strips) versetzt. Des Weiteren gibt man frisch abgewogen 18 mM DTT zu der Rehydrierungslösung. Die supplementierte Rehydrierungslösung wird in einen „Channel“ des Reswelling-Trays pipettiert und der Strip vorsichtig mit der Gelseite nach unten auf die Rehydrierungslösung gelegt, so dass sich die Rehydrierungslösung möglichst gleichmäßig unter dem Strip verteilt. Der IPG-Strip wird noch mit 2 ml Mineralöl überschichtet, um ein Austrocknen des Gels zu verhindern. Die Rehydrierung erfolgt für 10-20 h bei RT.

#### **4.1.2.3 Isoelektrische Fokussierung (IEF) in der Ettan IPGphor Isoelectric Focusing Unit (Amersham Biosciences)**

Die IEF erfolgt in der „Ettan IPGphor IEF-Unit“ von Amersham Biosciences, wobei eine Keramikplatte, das so genannte „Ettan IPGphor Manifold ceramic tray“, aufgesetzt wird, in der bis zu 12 IPG-Strips in einzelne „Channels“ parallel eingelegt werden können. Anschließend werden 108 ml Mineralöl gleichmäßig in die 12 Channels verteilt. Die rehydrierten IPG-Strips werden nun mit der Gelseite nach oben in den Channels platziert, so dass der saure Bereich des IPG-Strips über der Anode und der basische Bereich über der Kathode liegt. Die „Sample-Cups“, die dem Aufbringen der Proteinprobe auf das Gel dienen, werden positioniert und mit Hilfe des „Insertion-Tools“ auf der Manifold fixiert. Etwa 0,5 cm lange und 0,5 cm breite Whatman-Papierstreifen werden mit 60 µl H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> befeuchtet und jeweils an den Enden der IPG-Strips positioniert, so dass sie zu etwa 0,5 cm auf den Gelenen liegen. Dann werden die Elektroden auf den Whatman-Papieren positioniert.

Die Proteinproben werden mindestens 3 min abzentrifugiert und die entsprechende Proteinmenge nach der Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford in die Sample-Cups pipettiert (max. 150 µl). Werden die Proteine nach der 2D-Gelelektrophorese mittels Silbernitratfärbung sichtbar gemacht, reichen schon 25-50 µg Gesamtzellprotein, da diese Färbemethode so sensitiv ist, dass bereits 1 ng Protein sichtbar wird. Werden die Proteine allerdings anschließend mit kolloidalem Coomassie gefärbt, um die differentiell exprimierten Proteine massenspektrometrisch analysieren zu können, sollte man etwa die 100-fache Menge an Gesamtzellprotein einsetzen, da diese Färbemethode deutlich weniger sensitiv im Vergleich zur Silbernitratfärbung ist. Geeignete Mengen liegen zwischen 500 und 1000 µg Proteinprobe.

Die Apparatur wird geschlossen und die IEF unter folgenden Standardbedingungen durchgeführt:

3 h 300 V Step and Hold

6 h 1000 V Gradient

3 h 8000 V Gradient

8000 V „Step and Hold“ bis zur gewünschten Voltstundenzahl (Vhr)

Bei einer Auftrennung von 50-100 µg Protein erfolgt die IEF der Proteine, bis etwa 60.000 Vhrs erreicht sind. Hat man allerdings sehr große Mengen an Proteinprobe aufgetragen (z.B.. 500-1000 µg für Coomassie-Gele) sollte man die Elektrophorese bis mindestens 100.000 bis zu maximal 200.000 Vhrs durchführen.

Während der Elektrophorese werden etwa alle 20.000 bis 30.000 Voltstunden (Vhrs) die Whatman-Papierstreifen ausgewechselt. Diese dienen der Aufnahme von Salzen und Puffer-Ionen sowie von Proteinen, deren pI außerhalb des pH-Bereiches der verwendeten IPG-Strips liegt. Des Weiteren wird hierdurch das System mit H<sub>2</sub>Odest versorgt, welches das Gel während langer Elektrophoresen vor Austrocknung schützt. Nach Beendigung der IEF werden die IPG-Strips aus der Manifold genommen und mit der Gelseite nach unten in Alufolie verpackt, auf Trockeneis schockgefrostet und können anschließend bis zu 3 Monaten bei -20 °C gelagert werden.

#### **4.1.2.4 Auftrennung der Proteine in der Zweiten Dimension**

Die IPG-Strips werden ca. 5 min bei RT aufgetaut, anschließend in jeweils 10 ml Äquibrierungslösung, die mit 100 mg DTT versetzt wurde, überführt und 15 min auf dem Schüttler äquilibriert. Das DTT reduziert vorhandene Disulfidbrücken in den Proteinen.

Anschließend werden die Strips in jeweils 10 ml Äquibrierungslösung, die mit 250 mg Iodoacetamid (IAA) versetzt wurde, überführt und nochmals für 15 min auf dem Schüttler äquilibriert. Das IAA alkyliert die zuvor durch DTT reduzierten Schwefelgruppen in den Proteinen, um ihre Reoxidation während der Elektrophorese zu verhindern. Die SDS-Gele werden mit 1x SDS-Laufpuffer überschichtet und der Strip nach Abstreifen überschüssiger Äquibrierungslösung auf einem mit H<sub>2</sub>Odest getränkten Whatman-Papier in den Zwischenraum der Gelkassette positioniert. Nach dem Absinken des IPG-Strips im 1 x SDS-Laufpuffer auf die Geloberfläche wird der 1 x SDS-Laufpuffer vorsichtig abgeschüttet, der IPG-Strip so in der Mitte der Gelkassette ausgerichtet, dass die Plastikseite des IPG-Strips Kontakt zur hinteren Glasplatte der Gelkassette aufweist, und neben dem Strip noch der vorpräparierte Marker positioniert. Um den IPG-Strip zu fixieren und den Kontakt zwischen IPG-Strip und Geloberfläche zu gewährleisten, wird dieser mit 0,5 % M-Agarose in 1 x SDS-Laufpuffer überschichtet. Die Gelkassetten werden anschließend mit den flexiblen Silikon-Gelenken nach oben in den mit etwa 20 l 1 x SDS-Laufpuffer gefüllten Elektrophorese-Tank des „Hoefer DALT“-Systems von Amersham Biosciences positioniert. Die Menge des Laufpuffers richtet sich nach der Anzahl der Gele und sollte mindestens bis zu den oberen Spacern der Gelkassetten, jedoch nicht über die Silikonrücken hinaus reichen. Nach Inbetriebnahme der Zirkulationspumpe und Kühlung des Systems auf 15°C erfolgt die Elektrophorese bei 90-110 V für etwa 18-20 h (über Nacht), bis die BPB-Lauffront das untere Ende der Gele erreicht.

Äquibrierungslösung:

50 mM 1,5 M Tris-HCl pH 8,8  
 6 M Harnstoff  
 30 % Glycerin  
 2 % SDS  
 etwas Bromphenolblau (BPB)

Substitution von je 10 ml pro Strip mit 100 mg DTT für den ersten Äquibrierungsschritt und für den zweiten Äquibrierungsschritt von je 10 ml mit 250 mg Iodoacetamid.

**4.1.2.5 Giessen der SDS-Polyacrylamidgele**

Das Giessen der SDS-Polyacrylamidgele erfolgt im „Ettan DALT Gel Caster“ des „Hoefer DALT“-Systems von Amersham Biosciences. Der Caster wird auf die Rückseite in eine Plastikwanne gelegt und die Frontplatte abgeschraubt. Zwei Dreieckschwämme werden in die dafür vorgesehene Öffnung eingesetzt. Der Aufbau der Platten in der Apparatur wird nach folgendem Schema durchgeführt: Abwechselnd werden „Separator-Sheets“ und Gelkassetten in den Caster geschichtet, wobei die flexiblen Silikon-Gelenke der Gelkassetten immer abwechselnd nach links bzw. nach rechts ausgerichtet werden. Der restliche Freiraum im Caster, der nicht von Gelkassetten eingenommen wird, wird mit entsprechend dicken „Filler-Blocks“ oder zusätzlich mit Separator-Sheets aufgefüllt. Zwischen den Caster und die Frontplatte wird eine mit Silikon eingefettete Gummi-Dichtung in die dafür vorgesehene Rille eingebracht. Die Frontplatte wird aufgesetzt und vorsichtig zugeschraubt. Der Caster wird anschließend aufgestellt, so dass die Öffnung nach oben ausgerichtet ist. Ein Plastikröhrchen wird in den Gummiring der „Balance-Kammer“ eingeführt und ein Trichter aufgesteckt. Nach Befüllung der Apparatur mit der Gellösung wird diese nach Entfernen des Trichters durch die Displacing Solution, welche sich in der „Balance-Kammer befindet in die Gelkassetten gedrückt. Die Gele werden sofort mit jeweils 2ml Aqua<sub>dest</sub> überschichtet und polymerisieren in ca. 2-3 h aus. Die Gele werden in Klarsichtfolie verpackt und in Aqua dest. bei 4°C gelagert.

Displacing-Solution:

1,5 M Tris-HCl pH8,8	50 ml
Glycerin	100 ml
Bromphenolblau	2 mg
H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	50 ml

## Methoden

---

### SDS-Polyacrylamid-Lösung für 22 Gele, 12 % Acrylamid\*:

H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	512,9 ml
30 % Acrylamid-	
0,8 % Bisacrylamid-Fertiglösung	624 ml
1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)	390 ml
10 % (w/v) SDS	15,6 ml
10 % (w/v) APS	15,6 ml
TEMED	156 µl

### Gellösung für 12 Gele, 10% Acrylamid\*:

H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	316 ml
30 % Acrylamid-	
0,8 % Bisacrylamid-Fertiglösung:	267 ml
1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)	200 ml
10 % (w/v) SDS	8 ml
10 % (w/v) APS	8 ml
TEMED	38,9 µl

\*APS und TEMED werden erst kurz vor dem Giessen der Gele zugegeben, um ein vorzeitiges Polymerisieren zu verhindern

#### **4.1.2.6 Proteinfärbung mit Silbernitrat**

Nach Beendigung der Elektrophorese werden die Glasplatten der Gelkassetten aufgehebelt, die Strips von den Gelen entfernt und die Gele für mindestens eine Stunde oder über Nacht unter leichtem Schwenken im Fixierer fixiert. Für die anschließende Färbung werden Oxidierer, Silbernitratlösung und Entwickler immer frisch angesetzt, wobei jeweils 125 ml pro Gel benötigt werden. Nach dem Fixieren werden die Gele 2 x 30 min mit 30 %-igem Ethanol gewaschen. Anschließend werden die Gele genau 1 min unter starkem Schwenken oxidiert und nach einem weiteren Waschschrift (3 x 1 min mit H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub>) für 1 h mit der Silbernitratlösung gefärbt. Vor der Entwicklung werden die Gele zuerst 2 x 30 sec mit H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> gespült und solange in der Entwicklerlösung geschwenkt, bis die Proteine gut sichtbar sind (ca. 3-5min). Die Entwicklung wird durch EDTA-Lösung abgestoppt. Alle Färbeschritte sollten bei allen Gelen möglichst identisch sein, um eine gute Vergleichbarkeit der Gele zu gewährleisten. Die Gele werden eingescannt und anschließend in Plastikfolie eingeschweißt.

Fixierer (ca. 250 ml pro Gel):

50 %	Ethanol
12 %	Essigsäure
38 %	H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>

Oxidierer (125 ml pro Gel):

H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	125 ml
37 % Formaldehyd	83 µl
43 % Na-Thiosulfat	63 µl

Silbernitratlösung (125 ml pro Gel):

H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	125 ml
AgNO <sub>3</sub>	0,25 g
37 % Formaldehyd	83 µl

Entwickler (125 ml pro Gel):

H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	125 ml
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	7,5 g
37 % Formaldehyd	63 µl
43 % Na-Thiosulfat	2,3 µl

EDTA-Lösung (125 ml pro Gel):

H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	250 ml
EDTA	3,6 g (40mM)

**4.1.2.7 Proteinfärbung mit kolloidalem Coomassie**

Die SDS-Polyacrylamidgele werden vor der Färbung 2 h mit ca. 250 ml 12 % TCA fixiert. Anschließend werden sie 2-3 Tage mit 200 ml kolloidalem Coomassie (Gebrauchslösung) unter vorsichtigem Schwenken gefärbt. Für die Färbung sollte man nur speziell dafür vorgesehene Behälter verwenden und die Gele nur vorsichtig am Rand mit sauberen Handschuhen anfassen, da Kontaminationen die anschließende Proteinanalyse mittels der MALDI-TOF stören könnten. Die Gele werden mindestens 7 h mit H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> entfärbt, wobei das H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> mehrmals gewechselt wird. Die gefärbten Gele werden eingescannt und können bis zu drei Tage in H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> und für längere Zeit in 20% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> Lösung bei 4°C aufbewahrt werden.

## Methoden

---

Stocklösung A: 1 %-ige Coomassie Blau (G250)-Lösung in H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub>

Stocklösung B:

10 ml	Stocklösung A
10 g	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
2 %	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>
<hr/>	
ad 100 ml H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	

Gebrauchslösung :

160 ml	Stocklösung B
40 ml	MeOH

### **4.1.2.8 Massenspektrometrische Proteinidentifizierung am ZMBH Heidelberg [165] (Herr Armin Bosserhoff/Dr. Thomas Ruppert)**

Zur Proteinanalyse wurden 2-D-Proteingele mit 500-1000 µg Protein mit kolloidalem Coomassie Blau angefärbt. Die entsprechenden Gelstücke je Spot werden in kleine Würfel geschnitten, jeweils mehrfach für 15-30 min in 100 µl Wasser gewaschen. Dann wird drei mal 10-20 min mit 100 µl 50% (v/v) Acetonitril das Gel dehydriert. Um restliches Wasser zu entfernen noch reines Acetonitril für weitere 10 min dazugetropt. Nach Entfernen des Acetonitrils werden 30-50 µl Verdauungspuffer mit (50 mM N-methylmorpholine (pH 8,1) und 0,5 µg Trypsin zugegeben. Der Trypsinverdau der Proteine wird bei 37°C für 6-12 h inkubiert. Der Überstand mit den Peptiden wird gewonnen und die Gelstücke zweimal für 20-30 min mit 0,1 % Trifluoroacetosäure extrahiert. Das Volumen der kombinierten Extrakte wird auf 5µl in einem Speedvac Exsiccator reduziert. Liquid Chromatography-mass-spectrometry (LC-MS) und Collisin induzierte Fragmentations (CID) Spektren werden auf einem Finnigan LCQ Ionenfallen-Massenspektrometer, ausgerüstet mit einer Elektronenspray-Ionisierungsquelle, aufgezeichnet. Die Gruppierung der Spektren der Ionenfragmente (CID) wird mit dem Sequest Programm [167] durchgeführt. Der Sequest Algorithmus vergleicht die gemessenen Fragment-Ionen-Spektren aller ausgewählten Peptide mit den vorhergesagten Spektren von trypsinisierten Peptiden welche in Proteindatenbanken (NCBI, OWL, und NRDB) enthalten sind. Identifizierungen von multiplen Peptiden, welche aus demselben Protein stammen und die Bewertung Ihrer korrelierenden Scores resultieren in der eindeutigen Identifizierung des Proteins [165].

#### **4.1.2.9 Herstellung von Molekulargewichtsstandards für die zweite Dimension**

1,5 µl Broad Range Molecular Weight Proteinstandard (BioRad) werden mit 28,5 µl Laemmli-Puffer verdünnt und 3 min bei 100 °C erhitzt. Hierzu werden 230 µl 0,5 % M-Agarose in 1x SDS-Laufpuffer pipettiert und gut vermischt. Das Gemisch wird sofort mit Hilfe eines Spritzenaufsatz luftblasenfrei in ein Glasröhrchen aufgezogen.

Nach dem Erstarren des Gemisches wird es vorsichtig mit Hilfe einer mit Wasser gefüllten Spritze auf einen Parafilm herausgedrückt und mit einem sauberen Skalpell in 0,5 cm große Stücke geschnitten. Die Marker-Stückchen werden in einem Eppendorf-Cap bei -20°C eingefroren.

## **4.2 Proteinisolierung**

### **4.2.1 Isolierung von Gesamtzellproteinen aus *L. monocytogenes***

- Es werden 30-50 ml BHI 1:20 mit frischer ÜNK angeimpft und bis zu einer OD=1,00 kultiviert
- Dann wird die Bakterienkultur auf 50 µg/ml Chloramphenicol eingestellt und weitere 5 min bei 37°C inkubiert.
- Die Bakterienkulturen werden in 50ml-Greiner Röhrchen überführt und 15 min bei 4°C, 6000rpm abzentrifugiert
- Das Bakterienpellet wurde 2x mit 5ml 1xPBS (mit 50 µg/ml Chloramphenicol) gewaschen.
- Das Pellet wurde in 800µl Tris-Puffer (10mM Tris/HCl, 5mM MgCl<sub>2</sub>, pH7, 2) und 20µl Protease-Inhibitoren-Mix (jeweils 2mg/ml Pefabloc, Pepstatin, Leupeptin im Verhältnis 1:1:1) aufgenommen und in Fast RNA-Tubes-Blue überführt.
- Diese Mischung wurde im FastPrep<sup>®</sup> FP120 Instrument 6 x 30 s auf Stufe 6,5 durch die Glaskügelchen in 2 ml Fast RNA-Tubes-Blue+Lysing Matrix A mechanisch zerkleinert.
- Danach wurden 5µl DNase/RNase-Mix (Benzonase/Rnase-it-RNase Cocktail, 1:1) zugegeben und 10 min bei RT inkubiert.
- 10 Min., 4°C, 14000rpm abzentrifugieren
- 610 µl des Überstandes in Feststoff (240mg=5M) Harnstoff + 91mg

- Thioharnstoff in 1,5 ml Eppendorff-Caps überführen. Endvolumen ~ 800µl.
- 30 Min. bei RT inkubieren, mehrmals kräftig vortexen bis Harnstoff gelöst ist
- 1h in 12% TCA auf Eis fällen
- 20 Min., 4°C, 14000rpm abzentrifugieren
- Überstand abnehmen und das Proteinpellet 3x mit 200 µl eiskaltem absolutem Aceton waschen
- Das Pellet 5 min bei 30°C trocknen
- Das trockene Pellet in 10-100 µl Harnstoffpuffer lösen (7M Harnstoff, 2M Thioharnstoff, 70mM DTT) einschließlich CHAPS (Endkonz. 40mg/ml = 4%) aufnehmen
- Proteine über Nacht bei 4°C vollständig lösen
- Proteinextrakte bei -20°C oder -80°C lagern

### **4.2.2 Isolierung von Proteinen aus Infektionen in J774-Makrophagen**

- 1\* Waschen jeder Zellkulturflasche nach Infektion mit je 20 ml 1\*PBS +Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>
- dann Zugabe von 20 ml 1\*PBS+10mM NaN<sub>3</sub>/ 5µg/ml Tc/ 50µg/ml Cm
- danach 10 min Schockfrost in flüssigem N<sub>2</sub> ( komplette Zellkulturflasche)
- ca. 30 min bei Raumtemperatur auftauen lassen
- Zellen aus der Zellkulturflasche schaben und je 40ml Zellsuspension in 50ml Greinerröhrchen aufnehmen
- 5 min bei 1000rpm; 4°C abzentrifugieren (grober Zelldebris setzt sich ab)
- Überstand abnehmen und diesen 10 min bei 6000rpm; 4°C abzentrifugieren
- Pellets in 25 ml RIPA-Puffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris-Puffer (pH 8,0)+1%NP-40; 0,5% Deoxycholic acid; 0,1% SDS)
- aufnehmen und 1min vortexen
- 10 min bei 6000rpm; 4°C abzentrifugieren
- Überstand abnehmen und Pellets in 850µl Tris-Puffer (10mM Tris; 5mM MgCl<sub>2</sub> ) und 10µl Proteinase Inhibitor-Mix ( Leupeptin, Pepstatin und Pefabloc jeweils 2mg/ml, 1:1:1gemischt) vereinigen
- bei -80°C einfrieren.
- Die Proteine werden nach (→ 4.2.1 Isolierung von Gesamtzellproteinen) isoliert.

RIPA-Puffer:

NaCl (150mM)	8,76 g
Tris (50mM)	6,06 g
NP-40 (1%)	10 ml
Deoxycholic acid (0,5%)	5,00 g
SDS (0,1%)	1,00 g
<hr/>	
	ad 1000 ml H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>

**4.2.3 Isolierung von Proteinen aus RPMI-Shifts**

Der RPMI-Shift wurde als RPMI-Kontrolle durchgeführt, wobei man das RPMI als Minimalmedium betrachten kann, welches eine nährstoffarme Umgebung, wie sie auch im Zellinneren der Makrophagen herrscht, simuliert.

Des Weiteren können Einflüsse auf Proteine, welche durch die Isolierungsmethode ausgelöst wurden ausgeschlossen werden. Insgesamt können Gene ausgeschlossen werden, welche nicht unmittelbar an dem Virulenzgeschehen beteiligt sind. Hierbei wurden die Infektionsaliquots zum Animpfen des RPMI-Zellkulturmediums verwandt, wobei die Bakterienzahl *L. monocytogenes* pro Flasche (20 ml) auf ca.  $2 \cdot 10^9$  eingestellt wurde.

- 20 ml RPMI-Medium mit  $2 \cdot 10^9$  *L. monocytogenes* aus Infektionsaliquots wurde 1h im Zellkulturschrank unter Zellkulturbedingungen in jeweils 4 Zellkulturflaschen inkubiert.
- Das Medium jeweils in 50 ml Greinerröhrchen überführen und 5 min, 4°C, 6000 rpm abzentrifugieren.
- Den Überstand vorsichtig abnehmen und das Pellet in 1ml PBS supplementiert mit (10mM NaN<sub>3</sub>, 5µg/ml Tc, 50µg/ml Cm) aufnehmen.
- 10 min in Zellkulturröhrchen in flüssigem N<sub>2</sub> tieffrosten.
- 30 min auf Eis auftauen lassen
- In jeweils 25 ml RIPA-Puffer (150mM NaCl, 50 mM Tris-Puffer (pH 8,0)+1%NP-40; 0,5% Deoxycholic acid; 0,1% SDS) (→ 4.2.2) 1min unter vortexen waschen.
- In 850 µl Tris-Puffer + 10 µl Protease-Inhibitoren (Leupeptin, Pepstatin und Pefabloc jeweils 2mg/ml, 1:1:1gemischt) aufnehmen.
- Bei - 80 °C einfrieren.
- Die Proteine werden nach (→ 4.2.1 Isolierung von Gesamtzellproteinen) isoliert.

#### **4.2.4 Methode der Isolierung von *Listeria* Proteinen aus infizierten Zellen (→ 4.2.2) an in BHI gewachsenen Listerien**

- Die Listerien werden in BHI bis zu einer OD=1,0 kultiviert.
- Die Listerien werden bei RT, 6000 rpm, 5 min abzentrifugiert und 1\* in PBS supplementiert mit (10mM Na<sub>3</sub>N, 5µg/ml Tc, 50µg/ml Cm) gewaschen.
- Das Pellet wird in 1ml PBS RT supplementiert mit (10mM NaN<sub>3</sub>, 5µg/ml Tc, 50µg/ml Cm) aufgenommen.
- 10 min in Zellkulturröhrchen in flüssigem N<sub>2</sub> tieffrosten.
- 30 min auf Eis auftauen lassen
- In jeweils 25 ml RIPA-Puffer (150mM NaCl, 50 mM Tris-Puffer (pH 8,0)+1%NP-40; 0,5% Deoxycholic acid; 0,1% SDS) (→ 4.2.2) 1min unter vortexen waschen.
- In 850 µl Tris-Puffer + 10 µl Protease-Inhibitoren (Leupeptin, Pepstatin und Pefabloc jeweils 2mg/ml, 1:1:1gemischt) aufnehmen.
- Bei – 80 °C einfrieren.
- Die Proteine werden nach (→ 4.3.1 Isolierung von Gesamtzellproteinen) isoliert.

#### **4.2.5 Isolierung von Überstandsproteinen aus *L. monocytogenes***

- Es werden 30-50 ml BHI im Verhältnis 1:20 mit ÜNK angeimpft und bis zu einer optischen Dichte von OD<sub>600</sub>=1,0 inkubiert
- Dann wird die Bakterienkultur auf 20 µg/ml Chloramphenicol eingestellt und weitere 5 min bei 37°C inkubiert.
- Die Bakterienkulturen werden in 50ml-Greinerröhrchen überführt und 15 min bei 4°C, 6000rpm abzentrifugiert.
- Der Überstand wird in ein neues Greinerröhrchen überführt und mit 12% des Volumens 100 %-iger TCA (Trichloracid) versetzt und 1h auf Eis inkubiert.
- Das Präzipitat wurde 30 min bis zu1h abzentrifugiert und der Überstand verworfen.
- Das Pellet wurde in 5ml absolutem Aceton suspendiert und in ein 15 ml Greinerröhrchen überführt.
- Diese Lösung wurde 15 min bei 4°C, 6000rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Dieser Waschvorgang wurde noch 2\* wiederholt, wobei der letzte Waschschrift in einem 2ml Eppendorf- Gefäß erfolgt.

- Das Pellet wird im 30°C-Heizblock für ca. 5-8 min getrocknet.
- Das trockene Pellet wurde in 100µl Harnstoff + 10µl CHAPS aufgenommen.
- Die Proteinkonzentration wurde nach der Bradford-Methode bestimmt.
- Die Proteinproben wurden bei -80°C gelagert.

#### 4.2.6 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wird der Bradford-Assay der Firma BioRad verwendet. Dieses Messverfahren beruht darauf, dass der Farbstoff Coomassie Brilliant Blau G250 mit Proteinen in saurer Lösung Komplexe bildet, deren Absorptionsmaximum bei 595 nm liegt.

Zur Aufstellung einer Eichgeraden werden verschiedene Mengen BSA (1-10 µg) mit Wasser auf ein Endvolumen von 800 µl gebracht und mit 200 µl Farbstofflösung versetzt. Mit den zu messenden Proteinlösungen wird auf die gleiche Weise verfahren. Nach gründlichem Mischen aller Proben werden deren Adsorptionswerte mit Hilfe eines Photometers bei 595 nm Wellenlänge gemessen. Die Proteinkonzentration kann dann anhand der mit BSA erstellten Eichgeraden ermittelt werden.

### 4.3 Zellkultur

Richtlinien für den Umgang mit Eukaryontenzellen und deren Kultur finden sich in „Zell -und Gewebekultur“, Lindel/Bauer, 1994.

Eukaryontische Zellen werden in humider Atmosphäre in CO<sub>2</sub>-Begasungsbrutschränken bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> in speziellen Napfschalen oder Kulturflaschen kultiviert. J-774-Makrophagen werden in Glutaminhaltigem RPMI 1640 Medium (Gibco) mit 10% hitzeinaktiviertem FCS komplettiert. Die verwendeten Puffer und Medien werden stets auf 37°C vorgewärmt. Je nach Wachstum werden die Zellen alle 3-5 Tage gesplittet und passagiert. J-774 Makrophagen werden nach dem Waschen mit PBS mit einem Glasspatel abgeschabt, in Medium aufgenommen und 1:4-1:10 in eine frische Kulturflasche ausgesät.

Infektionen mit *L. monocytogenes* fanden in 250 ml Zellkulturflaschen (175 cm<sup>2</sup>) oder 12-Napfschalen statt.

## Methoden

---

### 10 x PBS:

NaCl	80,0 g
KCl	2,0 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	11,5 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,0 g
<hr/>	
	ad 1000 ml H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>

### 10 x Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>:

MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	1,0 g
CaCl <sub>2</sub>	1,0 g
<hr/>	
	ad 1000 ml H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>

### PBS + Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>∗:

10 x PBS	100 ml
10 x Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup>	100 ml
<hr/>	
	ad 1000 ml H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>

\* nicht autoklavieren

### Trypsin/EDTA-Lösung:

Trypsin	0,5 %
EDTA	0,2 %

## **4.3.1 Auftauen und Einfrieren von eukaryontischen Zellen (Freshney, 1987)**

### **Auftauen eukaryontischer Zellen**

Man lagert eukaryotische Zellen in flüssigem Stickstoff (-196°C), in welchem eine Lagerung über Jahre ohne Verlust der Lebensfähigkeit möglich ist. Um eine Kristallbildung innerhalb und außerhalb des Cytoplasmas sowie eine partielle Dehydratation zu vermeiden, setzt man üblicherweise 10 %DMSO (Dimethylsulfoxid) zu. 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 eukaryontischer Zellen**

zunächst werden die Zellen durch Trypsinisieren oder Abschaben (Makrophagen) abgelöst

dann wird die Zellzahl bestimmt und auf  $2-4 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt auf Eis werden jeweils 900  $\mu$ l Zellsuspension in einem Kryoröhrchen mit 100  $\mu$ l DMSO versetzt und ÜN bei -70°C eingefroren, bevor sie in flüssigem Stickstoff aufbewahrt werden.

### **4.3.2 Subkultivierung eukaryontischer Zellen**

Eukaryontische Zellen bilden nach ca. 3-4 Tagen einen Monolayer und müssen auf neue Kulturflaschen gesplittet werden.

#### **J774-Makrohagen**

- Das Medium wird aus der Kulturflasche abgesaugt und die Zellen 1× mit 10ml 1× PBS gewaschen.
- Die Makrophagen werden mit einem Glasspatel abgeschabt, in 10 ml Zellkulturmedium resuspendiert und dann im Verhältnis 1:4-1:10 in das vorgelegte Zellkulturmedium in neue Zellkulturflaschen ausgesät.
- Die Flaschen werden kurz geschwenkt um die Zellen gleichmäßig zu verteilen und im Brutschrank (37°C; 5%CO<sub>2</sub>) inkubiert.

### **4.3.3 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 Fuchs-Rosenthal-Zählkammer:

- 20 µl der abtrypsinisierten Zellen werden mit 20 µl Trypanblau gemischt und in der Zählkammer ausgezählt
- es werden 4 Großquadrate mit je 16 Kleinquadraten ausgezählt und das arithmetische Mittel bestimmt.
- um die Zellzahl/ml zu erhalten, multipliziert man den erhaltenen Wert mit dem Kammerfaktor  $5 \times 10^3$ :

$$\text{Lebendzellzahl/ml}^* = [\text{Mittelwert Großquadrate}] \times [5 \times 10^3]$$

\*Bei der 1:1 Anfärbung mit Trypanblau muss der entsprechenden Verdünnungsfaktor noch berücksichtigt werden.

## 4.4 Infektionsassays mit *Listeria monocytogenes*

### 4.4.1 Aussaat der Zellen für Infektionsassays

- J774-Makrophagen werden wie bereits beschrieben (→ 4.3.2) abgeschabt oder trypsinisiert und eine Zellzahl von  $2 \times 10^5$  Zellen/ ml Zellkulturmedium eingestellt
- je 1ml Zellsuspension wird pro Napf in einer 24-Napfschale ausgesät.
- die Zellen werden 2-3 Tage im Brutschrank inkubiert, bis unter dem Mikroskop ein semikonfluenten Monolayer zu erkennen ist

### 4.4.2 Herstellung des Infektionsmediums

- es werden die Übernachtskulturen der zu untersuchenden Bakterien 1:25 verdünnt und bis zur logarithmischen Wachstumsphase ( ca. 180 Klett-Einheiten) angezogen

- 20 ml der Kultur werden abzentrifugiert (6000 rpm, 4°C, 10 min)
- das Pellet wird 1× mit 20 ml 1×-PBS gewaschen
- das gewaschene Pellet wird in 20 ml 1×-PBS/Glycerin (1:5) resuspendiert und in Aliquots zu 1 ml bei -80°C eingefroren
- von jeweils dem ersten und dem letzten der aliquotierten Eppendorf-caps werden die Verdünnungsstufen  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  und  $10^{-7}$  auf BHI-Platten ausplattiert und diese ÜN im 37°C-Brutschrank inkubiert
- am nächsten Tag werden die Lebendzellzahlen aus den Kolonien bestimmt und jeweils der Durchschnittswert aus den Verdünnungen des ersten und des letzten caps ermittelt und dann noch der Durchschnitt dieser beiden Werte gebildet, um mögliche Fehler etwa durch ein Absetzen der Bakterien während des Aliquotierens für alle Aliquots heraus zu mitteln
- mit den erhaltenen Bakterienzellzahlen/ml wird am Tag der Infektion das Infektionsmedium mit RPMI 1640-Zellkulturmedium ohne FCS auf eine MOI von 50, respektive der ermittelten Zellzahl/Napf oder Zellkulturflasche eingestellt
- dabei wird die entsprechende Konzentration auf ein Volumen an Infektionsmedium/Napf von 0,5 ml berechnet um zu gewährleisten, dass die Bakterien in räumlicher Nähe zu den Zellen appliziert werden

#### 4.4.3 Infektionsassay in Napfschalen

- die Nöpfe werden zunächst 2× mit je 0,5 ml 1×PBS +Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup> gewaschen
- dann wird 0,5 ml des Infektionsmediums in die jeweiligen Nöpfe gegeben und 1,5 h im Begasungsbrutschrank bei 37°C inkubiert (=Infektion mit einer MOI=20\*)
- danach wird der Monolayer 2× mit 1×PBS +Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup> gewaschen um noch nicht eingedrungene Bakterien zu entfernen
- zusätzlich wird nun 0,5 ml RPMI 1640 Zellkulturmedium mit 100 µg/ml Gentamycin auf die Zellen gegeben und 1h im 37°C-Begasungsbrutschrank inkubiert, um die restlichen Bakterien, die sich noch in Nischen befinden können abzutöten
- nach der 1h Inkubation wird der erste Messwert t=0 genommen, indem von diesem Ansatz das Medium abgenommen, 2× mit 1×PBS +Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup> gewaschen wird und die Zellen mit jeweils 1 ml eiskaltem H<sub>2</sub>O steril lysiert und ca. 30 min auf Eis inkubiert werden; dann werden die Zellen mit dem Ultraschallgerät 3× pro Napf beschallt, gut suspendiert, in Eppendorf-caps aufgenommen und in geeigneten Verdünnungsstufen ausplattiert

- da Gentamycin in dieser Konzentration nach längerer Inkubation , obwohl es an sich nicht in eukaryotische Zellen eindringen kann, diese doch schädigen könnte wird nach den 20 min von den restlichen Zellen das Medium abgezogen, 2× mit 1×PBS +Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup> gewaschen und mit RPMI 1640 Zellkulturmedium mit 10 µg/ml Gentamycin weiterinkubiert.
- ausgehend von dem Messpunkt t=0 werden dann die weiteren Messwerte, wie oben beschrieben genommen und die BHI-Platten ÜN bei 37°C inkubiert
- am nächsten Tag werden die Lebendzellzahlen (CFU\*= colony forming units) durch Auszählen der Platten bestimmt:

\*CFU/ml = gezählte Kolonien × Verdünnungsstufe × 10

\*MOI = 20× [Bakterien/0,5 ml Infektionsmedium] : [eukaryotische Zellen/Napf]

### 4.4.4 Infektion in Kulturflaschen

- J774-Makrophagen wurden zwei bis drei Tage lang in RPMI1640 Zellkulturmedium mit 10% hitzeinaktiviertem Fötalem Kälberserum (FCS) in 250 ml (175 cm<sup>2</sup>) Zellkulturflaschen bis zur Konfluenz kultiviert. Je Experiment wurden 8 Flaschen verwandt.
- Die Zellkulturflaschen mit den J774-Makrophagen wurden 45 min mit einer MOI von 50 mit L.monocytogenes aus den bei -80 °C eingefrorenen Infektionsmedien infiziert.
- Nach diese Initialinfektion (t=0) wurden die Zellen 1\* mit 20 ml PBS gewaschen und danach 1h in Zellkulturmedium ohne FCS mit 50 µg/ml Gentamicin inkubiert.
- Danach wurden die Zellen wieder 1\* mit 20 ml PBS gewaschen und weitere 3 h in Zellkulturmedium supplementiert mit 5µg/ml Gentamicin inkubiert um alle extrazellulären Bakterien abzutöten.
- Nach insgesamt 4h Infektionszeit wurde das gentamicinhaltige Zellkulturmedium abgezogen, der Zellrasen mit 1\* mit 20 ml PBS gewaschen und die Zellkulturflaschen mit jeweils 20 ml PBS supplementiert mit (10mM NaN<sub>3</sub>, 5µg/ml Tc, 50µg/ml Cm) befüllt und die Zellkulturflaschen unmittelbar danach in flüssigem Stickstoff (N<sub>2</sub>) schockgefrostet.
- Die tiefgefrorenen Flächen wurde bei Raumtemperatur in ca. 30 min aufgetaut und die Zellsuspension auf Eis inkubiert.
- Die Zellsuspension wurde dann bei 1000 rpm 5 min abzentrifugiert um groben Zelldebris abzutrennen, wobei jeweils die Zellsuspension aus zwei Zellkulturflaschen in einem 50 ml Greinerröhrchen vereinigt wurde.

- Der Überstand wurde großzügig abgezogen und in ein frisches 50 ml Greinergefäß überführt und 10 min bei 6000 rpm abzentrifugiert.
- Das Pellet wurde in jeweils dem gleichem Volumen (20 ml) RIPA-Puffer (1M Tris-Puffer, 1% NP-40, 0,5% Deoxycholic Acid, 0,1% SDS) 1 min lang gevortext.
- Die Suspension wurde wieder bei 6000 rpm abzentrifugiert und die Pellets aus den 8 Zellkulturflaschen in 850µl Tris-Puffer (10mM Tris, 5mM MgCl) und 10µl Proteinaseinhibitoren-Mix (Leupeptin, Pepstatin und Pefabloc, jeweils 2mg/ml, im Verhältnis 1:1:1 gemischt)
- Die Proben wurden bis zur Proteinisolierung bei -80°C aufbewahrt.
- Die Proteine werden nach (→4.2.2 Isolierung Proteinen aus Infektionen mit J774-Makrophagen) isoliert.

## 4.5 Western Blot

Als Western Blot wird eine Methode bezeichnet, bei der elektrophoretisch aufgetrennte Proteine aus einem Trenngel auf geeignete Trägermembranen ihrer Größe nach transferiert werden.

Hierbei wird eine Kopie des Gels produziert, wobei die Proteine auf den Filtern immobilisiert werden und dann mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen werden können. Dabei wird der Antikörper-Antigen-Komplex durch Zugabe eines sekundären Antikörpers sichtbar gemacht, der an ein Enzym, meistens Peroxidase gekoppelt ist, welches ein luminogenes Substrat zur Lichtemission anregt und dies dann auf einen Röntgenfilm sichtbar macht. Das Blotting kann „semi-dry“ in einer Blottingkammer zwischen zwei Graphitplatten oder in Flüssigkeit in einem Tank stattfinden. Die 2-D Gele wurden auf die vorbefeuchtete Nitrozellulosemembran in den Haltevorrichtungen eines Blotting-Tankes zwischen Whattmanpapieren fixiert und über Nacht bei 250 mA die negativ geladenen Proteine elektrophoretisch auf die Nitrozellulosemembran transferiert. Im Anschluss wird die Nitrozellulosemembran aus der Blotkammer entfernt und für 1h bei Raumtemperatur in 5% Magermilch in 1xPBS unter leichtem Schütteln inkubiert. Dies dient zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen auf der Membran.

- Die Membran wird anschließend mit dem primären Antikörper, der gegen das Zielprotein gerichtet ist, über Nacht inkubiert.
- Es folgen drei Waschschrte mit 1xT-PBS für je 15 min
- Inkubation mit dem sekundären Antikörper für 1-2h.

## Methoden

---

- 4 weitere Waschschritten in 1x T-PBS
- Detektion der spezifischen Proteine mit Hilfe des „ECL western blotting and labelling Kit“ (Amersham Biosciences), wobei die Reagenzien kurz vor dem Auftragen auf die Membran 1:1 gemischt werden und diese in einer Folie inkubiert wird.
- Die Membran wird zusammen mit einem Röntgenfilm in eine Filmkassette gelegt und dieser nach einigen Minuten in der Dunkelkammer mittels des Röntgenfilm-Entwicklers entwickelt.

### Antikörper:

Phosphotyrosine Ab, BD Biosciences, Mouse IgG2b, Clone PY20 (catalogue Number 610000)

### Blocking-Reagenz:

5% (w/v) Magermilchpulver in H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub>

### Transferpuffer Tankblot:

25 mM Tris

192 mM Glycin

0,1 % SDS

20% Methanol

PBS-T:

0.05 % (v/v) Tween 20 in 1×PBS

## 4.6 Isolierung von Listerien mit paramagnetischen Beads

Für die Versuche wurde die Konzentration der 1ml Proben auf  $1 \cdot 10^7$  eingestellt, da bei einer Infektion in der Kulturflasche maximal  $1 \cdot 10^8$  Bakterien geerntet werden können und dies der Konzentration der Bakterien im Zellysat entspricht. Um 75 µg für ein Standard Silbergel nach der Standard-Proteinisolierung zu gewinnen, wären  $1 \cdot 10^9$  Bakterien notwendig.

### 4.6.1 Dynabeads

Bei der Isolierung mit den Dynabeads wurden folgende Parameter getestet:

- Beadsmenge: 20/ 40 µl Beads
- Inkubationszeiten: 15 min, 25 min, 45 min
- Isolierungsmedien: Natrium-Phosphat-Puffer, Zellysat

### 4.6.2 Dynabeads Standard Isolierung:

- 1,5 ml Eppendorff-Caps werden in einen magnetischen Bead Retriever (DynaL Biotech, Oslo, Norwegen) gegeben, in den die Eppendorff-Caps eingespannt werden und die paramagnetischen Beads sich vor einer magnetischen Platte ansammeln, wodurch die Beads von der Trägerflüssigkeit abgetrennt werden können.
- Die Dynabeads werden resuspendiert und jeweils 20 µl Dynabeads in 1,5 ml Eppendorf-Cap vorgelegt.
- 1 ml der Probe wird jeweils in die 1,5 ml Eppendorff-Caps gegeben und die Caps werden fünfmal invertiert.
- Die Proben werden 10 min auf einem Schüttler unter Schütteln inkubiert, so dass die Beads sich nicht absetzen können.
- Die Eppendorff-Caps werden in den Beads Retriever eingespannt, fünf mal invertiert und drei Minuten stehen gelassen, so dass die Beads sich an der Magnetplatte sammeln können.
- Der Überstand wird jeweils abgezogen, sowie die zurückgebliebene Flüssigkeit im Deckel des Caps entfernt. Waschpuffer (PBS-Tween zugegeben).

## Methoden

---

- Es wird 1 ml Waschpuffer (PBS-Tween zugegeben) und 10 min unter Schütteln inkubiert.
- Die Caps werden wieder in dem Beads Retriever eingespannt und drei Minuten stehen gelassen.
- Der Überstand wird abgenommen und die Beads in dem Waschpuffer unter Vortexen resuspendiert, verdünnt und auf BHI-Agarplatten ausplattiert, so dass die Zellzahlen der isolierten Listerien festgestellt werden können.

### PBS-Tween (pH 7,0):

NaCl	8,0 g
KCL	0,2 g
Na <sub>2</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,15 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,2 g
Tween-20	0,5 ml
<hr/>	
	ad 1000 ml H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>

### PBS-Tween (pH 7,4)Tween\*:

NaCl	7,2 g (0,15 M)
Na <sub>2</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,0021 M
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,0078 M
Tween-20	0,5 ml
<hr/>	
	ad 1000 ml H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>

\* berechnet nach <http://.bi.umist.ac.uk/users/mjfbn/buffers/makebuf.asp>)

### **4.6.3 M270-Epoxy-CBD-Beads von M. Loessner**

- Die Listerien werden in BHI-Kulturmedium bis zu einer OD=0,7-0,75 angezogen und dann 1:100 in PBST verdünnt. Dabei befinden sich 10<sup>4</sup> Bakterien in 200 µl (10<sup>5</sup> / ml).
- Die Beads werden 30 s in 1,5 ml Eppendorff-Caps durch Invertieren beladen
- Dann wird die Lösung 30 sec bei 14000 rpm abzentrifugiert um einen schnelleren Kontakt zwischen Bakterien und Beads herzustellen.
- Die Lösung wird 40 min unter Schütteln auf dem Inkubator inkubiert.
- Die Beads werden mit Hilfe des Bead Retrievers von Dynal 3 min lang magnetisch von der Lösung abgetrennt.

- Die Beads werden 10 min in 500 µl PBST auf dem Schüttler unter Schütteln gewaschen und dann in 100 µl PBST aufgenommen.
- Die angemessenen Verdünnungen dieser Suspension wurden ausplattiert und die Keimzahlen bestimmt.

PBST-Puffer (pH 8,0):

NaCl	35,00 g 120 mM)
Na <sub>2</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	35,49 g (50 mM)
Tween-20	0,5 ml (0,1%)
	ad 500 ml H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>

#### 4.6.4 „Kieselgel“ Beads von Merck

- Die Listerien Übernachtskultur wird 1:10 mit 0,9% NaCl verdünnt, wobei eine Listerien Konzentration von 10<sup>8</sup> Bakterien/ ml eingestellt wird.
- Für Versuche mit Zellysat wurde die Zellzahl mittels Infektionsaliquots eingestellt, deren Bakteriendichte bekannt ist und somit die Zahl der eingesetzten Bakterien berechnet werden kann.
- Die Beads werden mit 1ml 0,9 % NaCl-Lösung durch mehrfaches Invertieren gewaschen um das Antibiotikum Tetracyclin, das zur Konservierung beigefügt wird zu entfernen.
- 1 ml der 10<sup>8</sup>/ ml Listerienlösung wird zu 20 µl Beads gegeben.
- Versuche mit Zellkultur mit J774-Makrophagen: Nach Lyse in Aqua dest. wird das Zellysat mit Über-Nacht- Kultur auf 10<sup>8</sup> Listerien pro Zellkulturflasche eingestellt.
- Das Zellysat wird 1\* mit 10 ml 0,9 % NaCl, pH 7,0 bei 5 min 6000 rpm gewaschen und das Pellet in 1 ml 0,9 % NaCl aufgenommen.
- 20 µl einer 1m HCl-Lösung werden zugegeben, um den PH-Wert auf 2,5, dem Aktivierungsbereich der Beads einzustellen
- Die Beads werden 30 sec mit einer 0,9%igen NaCl Lösung pH 2,5 gewaschen
- Die Eppendorff-Caps werden 30 s invertiert, in den Beads Retriever eingesetzt und 1 min magnetisch separiert
- Der Überstand wird abgezogen und die Beads in 80 µl 1\*PBS sofort wieder abgepuffert
- Die Caps werden 30 s gevortext und angemessene Verdünnung auf BHI Platten ausplattiert, inkubiert und die Keimzahlen bestimmt.

## Methoden

---

### 1M HCL:

37 % HCL	40 ml
<u>Aqua<sub>dest</sub></u>	<u>460 ml</u>
	500 ml

## 5. Ergebnisse

Das Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung neuer Methoden zur Darstellung und Quantifizierung bakterieller Exoproteine in infizierten eukaryontischen Zellen im Rahmen des Verbundvorhabens „Neue Methoden zur Erfassung des Gesamtproteoms Gram-positiver Bakterien (Teilprojekt TP2.2: Methodenentwicklung für die Analyse von Subproteomen von *Listeria monocytogenes*, Projektleiter J.Weiland).

Hierbei musste zunächst die Methode mit Schwerpunkt auf die Aufbereitung der Proben für die Anwendung bei immobilisierten pH-Gradienten für das Ettan IPG phor Isoelectric Focussing System von Amersham Biosciences für Listerien unter Zusammenarbeit mit Frau Dr. Andrea Spory und Frau Eva Rotenberg etabliert und optimiert werden.

Da die Transkriptionsanalyse bei Bakterien nur begrenzte Aussagen über die jeweiligen Mengen der tatsächlich aktiven Genprodukte im Bakterium zulässt da hier neben der Menge der m-RNA Konzentration auch Translations- und Abbaurate einen entscheidenden Einfluss haben, sollen Methoden zur direkten Darstellung und Quantifizierung des bakteriellen Proteinmusters innerhalb der Wirtszelle entwickelt werden. Somit kann die tatsächliche biologische Aktivität eines Proteins als Genprodukt eines Genlokus bestimmt und damit eine exaktere Annäherung an die physiologischen Vorgänge in der Bakterienzelle unter Infektionsbedingungen als durch rein genomische Analysen gewonnenen werden.

Das Hauptproblem bei solchen Untersuchungen nämlich die Überlagerung des bakteriellen Proteinmusters durch die im Überschuss vorhandenen Wirtszellproteine muss umgangen werden. Eine Option hierfür wäre eine selektive Markierung der bakteriellen Proteine. Eine entsprechende Methode wurde von L. Burns-Keliher in *Salmonella typhimurium* durch selektive radioaktive Markierung der bakteriellen Proteine mit Tritium markiertem meso-Diaminopimelat ( $[H^3]m$ -DAP) einem Lysin Vorläufer bei Bakterien welcher von Säugerzellen nicht verstoffwechselt werden kann entwickelt [94]. Obwohl vielversprechend wurde dieser Ansatz nicht weiter verfolgt da der zeitliche Aufwand den Rahmen dieser Arbeit gesprengt hätte da die Proteine nur nach mehreren Monaten Autoradiographie detektiert werden können.

Stattdessen wurden Methoden etabliert durch welche intrazellulär gewachsene Listerien über Bindung an paramagnetische Beads-Varianten mit unterschiedlichen Beschichtungen selektiv angereichert werden konnten. Hierbei ergab sich das grundlegende Problem dass die Menge der angereicherten Listerien nicht für die Methode der zweidimensionalen Proteinsynthese ausgereicht hätten. Eine Beadsvariante (Kieselbeads von Merck) gewährleistete eine Menge welche bei 5 großen Zellkulturflaschen für ein mit Silbernitrat gefärbtes Silbergel ausgereicht hätte. Dabei ergab sich aber das Problem dass die Listerienlösung bei der Isolierung auf einen pH-Wert von 2,5 abgesenkt werden musste und somit eine Beeinflussung der Proteinexpression durch eine überlagerte Stressantwort bei der Isolierung als sehr wahrscheinlich erschien.

Darum wurde zusätzlich versucht bei Infektionen von J774-Makrophagen mit *Listeria monocytogenes* die Wirtsproteine welche die proteomische Analyse überlagern würden durch eine Reihe von Waschschrinen zu entfernen. Das Problem der Veränderung des Proteinmusters im Laufe der Isolierungsschritte wurde durch Schockfrostern der kompletten infizierten Zellkulturflaschen in flüssigem Stickstoff in PBS supplementiert mit Natriumazid, Tetracyclin und Chloramphenicol angestrebt. Das hierbei gewonnene Pellet wurde nach dem laborintern etabliertem Protokoll für die Isolierung der Gesamtzellproteine aus Listerien isoliert (→ 4.2.1) und nach der im Labor etablierten Methode für die 2-D-Gelelektrophorese (→ 4.1) aufbereitet und isoliert. Dieses Proteinisolierungs-Protokoll für Listerien und die Methode für die 2-D-Gelelektrophorese mittels immobilisierten pH-Gradienten in dem Ettan IPG phor Isoelectric Focussing System von Amersham Biosciences wurde im Rahmen dieser Arbeit zusammen mit Frau Dr. Andrea Spory und Frau Rotenberg etabliert.

Nach Auftrennung der Proteine in 2-dimensionalen Polyacrylamid-Gelen und der Visualisierung der Proteinspots mittels Silberfärbung konnten anhand der Delta 2D-Software [→ 3.6] unter statistischen Parametern ausgewertete Regulationen von XX Proteinen von *Listeria monocytogenes* während der Infektion in J774-Makrophagen gesichert werden. Die Identifizierung der jeweiligen Proteine wurde mittels der MALDI-TOF Analyse und anschließender Datenbankrecherche von Herrn Armin Bosserhof am ZMBH Heidelberg durchgeführt.

## **5.1 Vorversuche zur Isolierung von Listerien aus Zellkultur mit verschiedenen paramagnetischen Beads.**

Ein erster Ansatz um die Listerien spezifisch aus Infektionen zu isolieren wurde mittels paramagnetischer Beads durchgeführt. Da für ein silbergefärbtes 2-D-Proteingel (75µg Protein)  $1 \cdot 10^9$  Bakterien notwendig wären und aus einer Zellkulturflasche maximal  $1,8 \cdot 10^8$  Bakterien geerntet werden können braucht man zwischen 5,5 und 10 Zellkulturflaschen. Entsprechend müsste die „Recovery“, das heißt die Wiederfindungsrate zwischen 50% und 100% liegen um eine ausreichende Proteinmenge aus den Listerien isolieren zu können. Für alle Vorversuche wurde die Listerienkonzentration in mit PBS verdünnter Übernachtskultur auf  $10^7$  Bakterien eingestellt (entsprechend der Konzentration, welche im Zellysat aus Infektionen zu erwarten wäre). Entsprechend wurde für die Vorversuche Zellysat aus Wirtszellen mit Infektionsaliquots auf  $10^7$  Bakterien/ ml eingestellt.

### **5.1.1 Dynabeads® anti Listeria**

Ein erster Ansatz wurde mit Dynabeads, beschichtet mit polyklonalen Antikörpern durchgeführt. Dynabeads® anti-Listeria ( $\varnothing 2,8 \mu\text{m}$ ) sind Latex-Beads (DynaL, Oslo, Norwegen), an deren Oberfläche polyklonale Antikörper kovalent gebunden sind. Visköse oder fettige Proben sollten vor Gebrauch verdünnt werden. Die Probe wird in 1ml Aliquots mit 20µl Beads für 10 Minuten unter Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert, wobei die spezifischen Antikörper mit Listeria einen Komplex bilden. Anschließend wird der Bead-Bakterien-Komplex durch einen Magneten von der Suspension getrennt, für 10 min in 500µl PBS-Tween (pH 7,4) unter Schütteln gewaschen, in 100 µl PBS-Tween resuspendiert und ausplattiert.

Es wurden unterschiedliche Inkubationszeiten (15 min, 20 min, 45 min) getestet (→ 4.6.1), wobei sich keine eindeutige Verbesserung der Wiederfindungsrate in Abhängigkeit von der Zeit nachweisen ließ. Dagegen konnte die Wiederfindungsrate durch ein Verdoppeln der Beadsmenge von 20 µl/ ml auf 40 µl/ml verdoppelt werden. Bei einer Inkubationszeit von 20 min mit 40 µl Beads mit verdünnter Übernachtskultur konnte eine maximale Wiederfindungsrate von 25,6 % ( $6,4 \cdot 10^6$  Listerien/ml) erreicht werden. Ein Durchschnittswert aus drei Versuchen lag bei 24,4% Wiederfindungsrate. Entsprechend hätte man unter diesen Bedingungen 156 Zellkulturflaschen für ein Silbergel benötigt.

Da sich in den weiteren Vorversuchen mit Zellysat die Recovery weiter um den Faktor 10 verschlechterte ( $1,6 \cdot 10^5$  Listerien/ ml) wurde der Ansatz mit Dynabeads für die Methode der 2-D-Proteinanalyse verworfen, könnte aber durchaus für genomische Analysen Anwendung finden.

### **5.1.2 Kieselgel + Magnetit Beads (MERCK in Entwicklung; zur Verfügung gestellt von Dr. Karl Holschuh, Merck)**

Ein weiterer Ansatz wurde mit in den noch in der Erforschung befindenden mit Kieselgel beschichteten Beads der Firma Merck durchgeführt. Die Bindung der Kieselgel-Beads findet unspezifisch statt, wobei die Bindung vermutlich über Phosphatgruppen vermittelt wird. Die Bedingungen für die Bindung sind ein saurer pH-Wert von 2,5, wobei die Bindung nach 0,5 - 3min Invertieren der Proben erfolgt. Die Beads werden in einem MES-Puffer mit einem pH-Wert von 5,5 mit einem Breitbandantibiotikum (0,5 %) aufbewahrt. Ein Milligramm der Beads (Konzentration 50mg/ml) soll  $10^8$  Bakterien binden (= 20  $\mu$ l Beads).

Da ein Ansatz von 20  $\mu$ l der Kieselgel-Beads ca.  $10^8$  Bakterien binden soll wurde Übernachtskultur mit Listerien 1:10 mit 0,9% NaCl auf ca.  $10^8$  Bakterien/ml verdünnt. Der für die Bindung notwendige pH-Wert wurde mit 20 ml 1M HCl auf 1ml NaCl Lösung eingestellt. Dieses Mischungsverhältnis wurde in einem Vorversuch mit einer Versuchsreihe von 15  $\mu$ l, 20 $\mu$ l, 25  $\mu$ l 1M HCl festgelegt ( $\rightarrow$  4.6.4). Nach 30 sec Invertieren werden die Beads paramagnetisch abgetrennt und in PBS aufgenommen, wodurch der PH-Wert wieder abgepuffert wurde. Bei 20  $\mu$ l HCl/ 1ml 0,9 % NaCl (=pH 2,5) konnte eine Wiederfindungsrate von 59 % ( $1,9 \cdot 10^8$  Bakterien/ml) erreicht werden, welche aber nach 1\* Waschen auf 35,5 % ( $1,15 \cdot 10^8$  Bakterien/ml) also fast die Hälfte absank. Erste Versuche deuteten darauf hin, dass das Zellysat die Wiederfindungsrate stark störte (5-7% Recovery). Erfreulicherweise konnte mit dem Zellysat durch Einführung eines Waschschrilles mit 10 ml 0,9 % NaCl pH 7,0 und Abzentrifugation bei 6000 rpm für 5 min bei eingesetzten 40  $\mu$ l Beads eine Wiederfindungsrate von ca. 30% ( $6 \cdot 10^7$  Bakterien/ Flasche) erreicht werden. Hierbei gilt zu beachten, dass alleine durch den Waschschrille ca. 10% der Listerien verloren gehen. Bemerkenswerterweise wurde bei der Optimierung der Waschschrille festgestellt, dass die Kieselbeads außerordentlich empfindlich gegen Waschschrille mit den Detergentien Tween-20 und Triton-X-100 reagieren, wobei die Recovery auf 0-1 % absank. Dies könnte aber eventuell auch durch einen Verlust des Pellets bei den Waschschrillen resultieren.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Methode im Vergleich zu den Dynabeads um eine Potenz höher liegt (hier:  $6 \cdot 10^7$  Bakterien/ Zellkulturflasche). Das heißt unter diesen Bedingungen bräuchte man 17 Flaschen für ein Standard-Proteingel (75 µg Protein). Da aber auch auf einem Proteingel mit 30 µg Protein noch ein auswertbares Proteinpattern erscheint könnte ein realistischer Versuchsansatz mit 7 Flaschen, welche parallel infiziert werden müssten durchführbar sein. Ein erster Versuch mit säurebehandelten Listerien zeigte aber eine starke Streifenbildung im 2-D-Proteingel. Da dies noch erschwerend zu dem Einfluss der Säurebehandlung auf die Listerien während der Isolierung hinzukam wurde dieser Absatz nicht weiter verfolgt. Dennoch könnte unter geeigneten Bedingungen welche eine Veränderung des Proteinpatterns ausschließen (→ 5.2) dieser Absatz für genomische Analysen interessant sein. Proteomanalysen wären unter den in dieser Arbeit entwickelten Methoden ebenfalls möglich vorausgesetzt der Einfluss der Säurebehandlung auf die zweidimensionale Proteinauftrennung kann umgangen werden.

### **5.1.3 Dynabeads® M-270 Epoxy – CBD Beads (Beschichtung mit Phagenlysin Ply 118 von Martin Loessner)**

Dynabeads® M-270 Epoxy ( $\varnothing$  2,8 µm) bestehen aus stark vernetztem Latex. In dessen Poren magnetische Partikel eingebettet sind. Die Beads sind von einer hydrophilen Schicht aus Epoxy-Gruppen umschlossen, die eine kovalente Bindung zu Proteinen über primäre Aminogruppen ermöglichen. Hierbei kann die Orientierung der Anordnung der „cell wall binding domain“ (CBD) des Phagen-Endolysins Ply 118 bei der Beschichtung nicht kontrolliert werden (→3.5.2, Anwendung →4.6.3) [28, 40, 48, 80].

Bei den Vorversuchen wurden pro 10 µl Beads Ansatz  $5 \cdot 10^3$  Listerien pro Ansatz erreicht. Hierbei konnte eine Wiederfindungsrate zwischen 10-50 % erreicht werden. Leider zeigte sich relativ schnell ein starker Verlust der Recovery da die Haltbarkeit der beschichteten Beads nur auf wenige Wochen limitiert ist. Abgesehen davon schließt die nur sehr geringe isolierte Gesamtbakterienzahl ( $5 \cdot 10^3$ , Listerien) welche sich auch in einem größeren Ansatz auf maximal  $1 \cdot 10^4$  die Anwendung für die zweidimensionale Proteinsynthese aus, da auch für ein mit 30 µg beladenes hierfür mehrere Tausend Flaschen notwendig wären. Das Epoxidharz könnte potentiell die zweidimensionale Proteinauftrennung stören und die Phagenlysine würden als Spots erscheinen und müssten als Hintergrund abgezogen werden. Der Vorteil dieser Methode ist die absolute Spezifität der mit Phagenlysin beschichteten Beads.

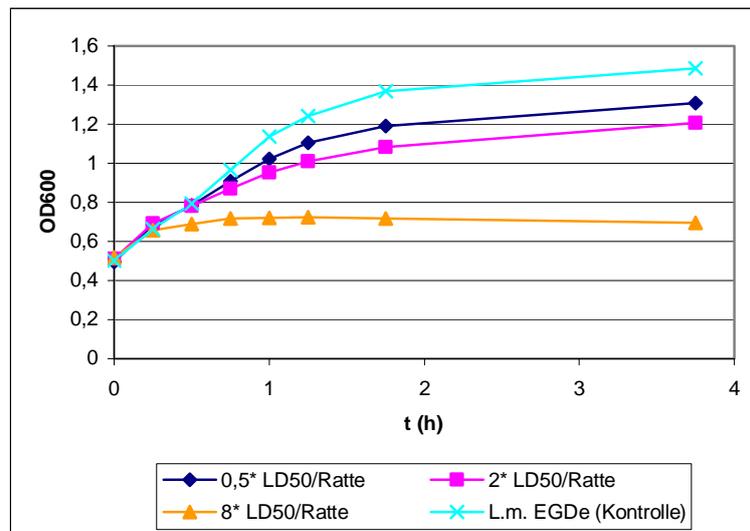
Das Phagenlysin 118 erkennt spezifisch die Listerien Serovare 1/2 wodurch sich interessante Anwendungsmöglichkeiten wie ELISA-Screenings für die Lebensmittelindustrie ergeben.

### **5.2 Vorversuche zur Arretierung des Proteinmusters von *Listeria monocytogenes* bei Isolierung aus J774-Makrophagen**

Nachdem die Versuche mit unterschiedlichen paramagnetischen Beadstypen keine ausreichenden Bakterienzahlen und für die Methode der zweidimensionalen Gelelektrophorese lieferten, wurde mittels eines Lysepuffers (RIPA-Puffer nach Moors, Portnoy 1999 [14]) eine Aufreinigung der Listerien aus den infizierten Makrophagen erzielt. Hierbei besteht das Problem dass bei der Aufreinigung das in den Makrophagen exprimierte Proteinmuster der Listerien sich verändern könnte. Darum muss das Proteinmuster, welches in den Makrophagen exprimiert wird bewahrt werden. Aus diesem Grunde zielen die folgenden Versuche darauf hin das in den Infektionen exprimierte Proteinmuster zu erhalten.

#### **5.2.1 Inhibierung der Atmungskette mit Natriumazid (NaN<sub>3</sub>)**

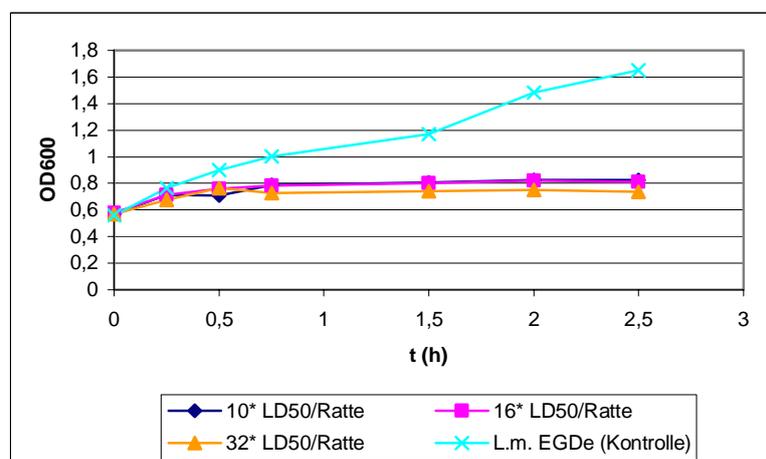
Zunächst wurde versucht mit Natriumazid einem Cyanid (NaN<sub>3</sub>) die Atmungskette zu unterbrechen. Natriumazid ist ein irreversibler Inhibitor der Cytochrom C Oxidase in der Atmungskette. Cyanide blockieren irreversibel die Bindungsstelle für Sauerstoff im aktiven Zentrum der Cytochrom c Oxidase. Hierdurch liegen alle Enzyme der Atmungskette in reduzierter Form vor wodurch der Protonengradient nicht mehr erhalten werden kann und die Produktion des Energieträgers Adenosintriphosphat (ATP) zum Erliegen kommt. Durch die Inhibierung der Gewinnung von Stoffwechselenergie sollten die anabolen Stoffwechselforgänge inhibiert werden. Ein vollständiges Erliegen der Stoffwechselforgänge war hierbei nicht zu erwarten da *Listeria monocytogenes* als fakultativ anaerobes Bakterium die Stoffwechselenergie in Form von ATP auch durch Gärung regenerieren kann.



**Abb.5:** Wachstumskurve von *Listeria monocytogenes*. EGDe unter unterschiedlichen  $\text{NaN}_3$  Konzentrationen

Bei diesem Versuch zeigte sich überraschenderweise, dass selbst bei einer  $\text{NaN}_3$  Konzentration von  $8 \cdot \text{LD}_{50}/\text{Ratte}$  [ $0,36 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ] noch nach 1 Stunde ein Wachstum von *Listeria monocytogenes* zu beobachten war.

Da die Listerien hier bis zu 1 Stunde noch Wachstum aufwiesen schien unter dieser  $\text{K}$  Proteinsynthese offensichtlich nicht hinreichend gehemmt ist, wurde die  $\text{NaN}_3$  Konzentration nochmals erhöht.



**Abb.6:** Wachstumskurve von *Listeria monocytogenes* EGDe bei unterschiedlichen  $\text{NaN}_3$  Konzentrationen

Selbst bei einer Konzentration von  $32 \cdot \text{LD}_{50}$  ist bis 0,5 h noch ein minimales Wachstum erkennbar. Da sich das Wachstum ab einer Natriumazid Konzentration von  $16 \cdot \text{LD}_{50}/\text{Ratte}$  annähernd vollständig stoppen ließ wurde für die weiteren Versuche eine Konzentration von 10 mM  $\text{NaN}_3$  ( $0,695 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) gewählt, welches in etwa  $16 \cdot \text{LD}_{50}/\text{Ratte}$  ( $0,72 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) entspricht.

### **5.2.2 Inhibierung des Stoffwechsel durch Schockfrost in flüssigem Stickstoff (Na N<sub>3</sub>)**

Da die Unterbrechung der Atmungskette noch nicht zu einem vollständigen Erliegen des anabolen Stoffwechsels führte, wurde versucht, die biologische Aktivität der Listerien durch Einfrieren in flüssigem Stickstoff vollständig zu unterbinden und somit eine Veränderung des Expressionsmusters der Proteine auszuschließen. Nach 2 h auf flüssigem N<sub>2</sub> ließ sich lediglich eine signifikante Reduktion um 42% der vitalen Listerien feststellen. Hingegen führte das Schockfrost von Listerien in infizierten Makrophagen in flüssigem N<sub>2</sub> zu einem Verlust von 80% an vitalen Listerien.

### **5.2.3 Inhibierung der Proteinsynthese mittels Antibiotika**

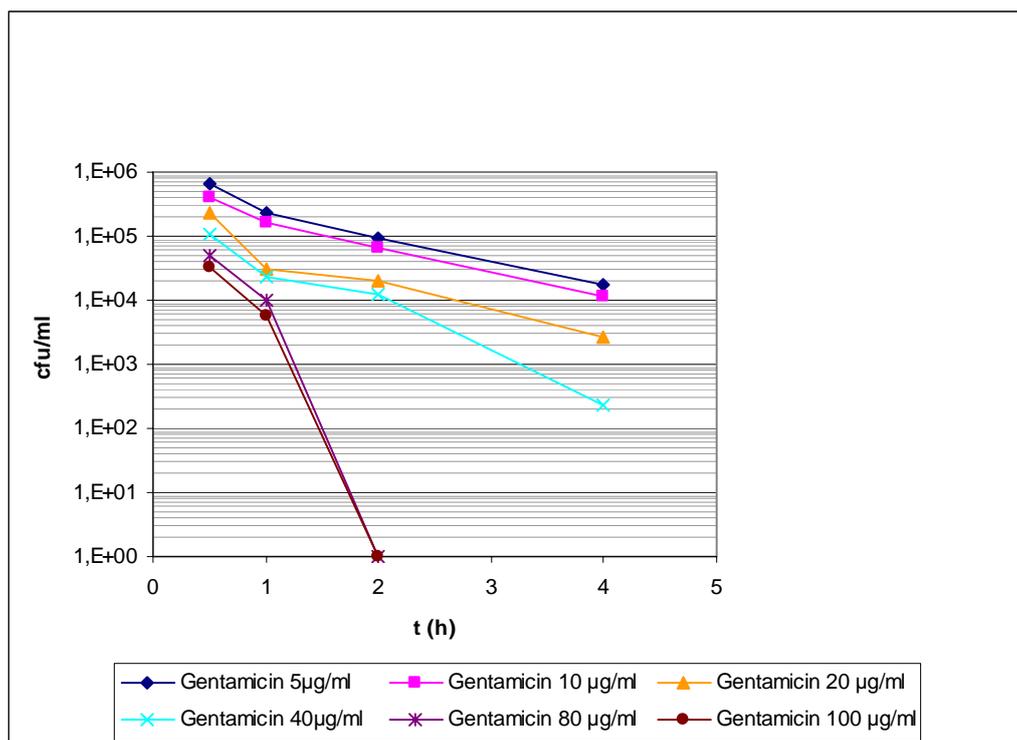
Um nun eine etwaige restliche biologische Aktivität der ca. 20% Listerien welche nach dem Schockfrost in Zellkultur in flüssigem Stickstoff noch vital sein könnten vollständig zu unterbinden wurden dem Phosphatpuffer als Trägerlösung außer dem Natriumazid noch zwei weitere Inhibitoren des bakteriellen Wachstums, die Antibiotika Tetracyclin und Chloramphenicol, beigefügt. Tetracycline führen zu einer Hemmung der bakteriellen Proteinsynthese von grampositiven und gramnegativen Bakterien. Sie verhindern die Anlagerung von Aminoacyl-tRNA an die mRNA in der 30S Untereinheit des Bakterien Ribosoms und somit das Wachstum des Bakteriums. Chloramphenicol stellt ein Breitbandantibiotikum dar welches als Translationhemmer die Knüpfung der Peptidbindung blockiert, das heißt hemmend auf die Peptidyltransferase wirkt also die Bindung an die 50 S Untereinheit der bakteriellen Ribosomen unterbindet.

Folglich wurde die Proteinsynthese bei der Aufreinigung der Listerien aus Zellkultur auf Ebene des Energiestoffwechsels (NaN<sub>3</sub>) der Proteinsynthese an der 30S Untereinheit der Ribosomen (Tetracyclin), auf Ebene der Proteinsynthese an der 50S Untereinheit (Chloramphenicol) während der Isolierung inhibiert. Zusätzlich wurde ein zeitnahes Abstoppen der Proteinsynthese durch das Schockfrost der kompletten Zellkulturflasche in Phosphatpuffer supplementiert mit den oben genannten Inhibitoren [10mM NaN<sub>3</sub>, 5 µg/µl Tc und 50 µg/ml Cm] gewährleistet. Unter diesen Voraussetzungen wurden die Listerien aus 8 parallel infizierten Zellkulturflaschen isoliert und mittels der 2-dimensionalen-Polyacrylamid-Gelelektrophorese erfolgreich analysiert.

### 5.2.4 Optimierung der Infektionsbedingungen

Vor der parallelen Infektion der Makrophagen in 8 Zellkulturflaschen wurden die Infektionsbedingungen noch optimiert in Bezug auf die Infektionszeit und des Verhältnisses von Bakterien zu Wirtszellen (MOI= multiplicity of infection)

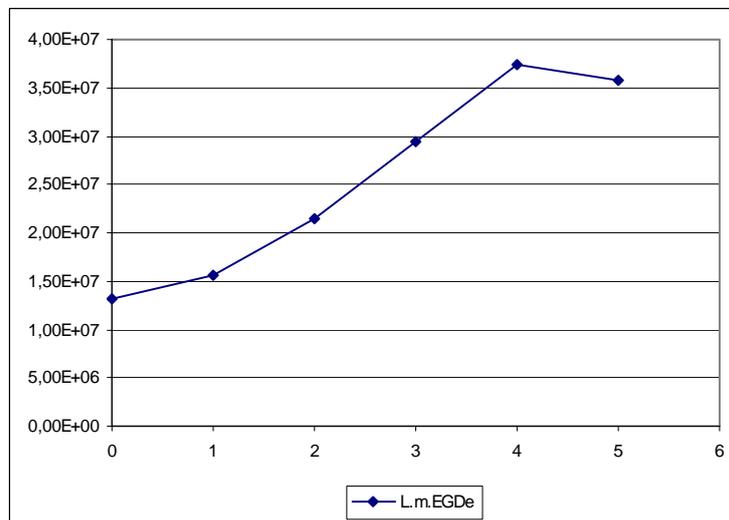
Da laut Literatur Gentamicin in Makrophagen eindringen kann [96], wurde die cytotoxische und cytostatischen Konzentrationen von Gentamicin in Abhängigkeit von der Zeit bestimmt. Hierbei wurden in einem Vorversuch in RPMI 1640 Zellkulturmedium unter Zellkulturbedingungen im Brutschrank die Listerienkonzentrationen mittels Infektionsaliquots [→4.4.2] auf  $10^8$  Bakterien/ml eingestellt und zu unterschiedlichen Zeitpunkten Proben entnommen welche in entsprechenden Verdünnung auf BHI Platten ausplattiert wurden. Nach Inkubation im Brutschrank wurde anhand der gewachsenen Kolonien die Zellzahlen der jeweiligen Proben bestimmt. Die Ergebnisse wurden halblogarithmisch aufgetragen.



**Abb.7.:** Wirksamkeit unterschiedlicher Gentamicin Konzentrationen in RPMI 1640 Medium unter Zellkulturbedingungen auf *Listeria monocytogenes* EGDe

Anhand der Ergebnisse der cytostatischen und cytotoxischen Wirkung von Gentamicin in Zellkultur aus Listerien wurde eine minimal wirksame cytotoxische Impulsinkubation mit 50 µg/ml Gentamicin, anschließend bis 4h eine minimal zytostatisch wirksame Inkubation mit 5 µg/ml gewählt.

Des Weiteren wurde eine Infektionszeit von 4h gewählt, welche nach folgendem Vorversuch die maximale exponentiell wachsende Listerienzahl gewährleistet.



**Abb.8:** Infektion von J774-Makrophagen mit *Listeria monocytogenes*. EGDe ; Infektionszeit 45 min; Gentamicin 1h 50 µg/ml ab dann 5µg/ml

### 5.3 Entwicklung einer neuen Methode zur Darstellung von listeriellen Proteinen in Zellkultur in J774-Makrophagen.

Durch die erfolgten Vorversuche konnte gewährleistet werden, dass sich bei einer Aufreinigung der Listerien aus der Infektion in Zellkultur das in der Wirtszelle exprimierte Proteinmuster nicht weiter veränderte. Die Zellen wurden dabei in der Zellkulturflasche in vorgewärmten 1\*PBS supplementiert mit (10mM NaN<sub>3</sub>, 5µg/ml Tc, 50 µg/ml Cm) flüssigem Stickstoff schockgefrostet. Durch das Schockfrostern in Zellkultur verlieren 80% der Listerien Ihre Vitalität, so dass nur noch 20% der Listerien potentiell vital bleiben und darum Ihr Proteinmuster sich verändern könnte. Um nun eine etwaige restliche biologische Aktivität der ca. 20% vitalen Listerien zu unterbinden wurden dem Phosphatpuffer als Trägerlösung außer dem Natriumazid noch zwei weitere Inhibitoren des bakteriellen Wachstums, die Antibiotika Tetracyclin und Chloramphenicol, beigefügt. Tetracycline führen zu einer Hemmung der bakteriellen Proteinsynthese von grampositiven und gramnegativen Bakterien. Sie verhindern die Anlagerung von Aminoacyl-tRNA an die mRNA in der 30S Untereinheit des Bakterien Ribosoms und somit das Wachstum des Bakteriums.

Chloramphenicol stellt ein Breitbandantibiotikum dar welches als Translationhemmer die Knüpfung der Peptidbindung blockiert, das heißt hemmend auf die Peptidyltransferase wirkt also die Bindung an die 50 S Untereinheit der bakteriellen Ribosomen unterbindet. Folglich wurde die Proteinsynthese bei der Aufreinigung der Listerien aus Zellkultur auf Ebene des Energiestoffwechsels ( $\text{NaN}_3$ ) der Proteinsynthese an der 30S Untereinheit der Ribosomen (Tetracyclin), auf Ebene der Proteinsynthese an der 50S Untereinheit (Chloramphenicol) während der Isolierung inhibiert. Zusätzlich wurde ein zeitnahes Abstoppen der Proteinsynthese durch das Schockfrieren der kompletten Zellkulturflasche in Phosphatpuffer supplementiert mit den oben genannten Inhibitoren [10mM  $\text{NaN}_3$ , 5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  Tc und 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Cm] gewährleistet.

Unter diesen Voraussetzungen wurden die Listerien aus 8 parallel infizierten J//4-Makrophagen mit *Listeria monocytogenes* EGDe aus Zellkulturflaschen [→ 4.4.4] isoliert und die Gesamtzellproteine isoliert. Aus 8 Zellkulturflaschen konnte ca. 30  $\mu\text{g}$  Proteine aus den Listerien unter Infektion gewonnen werden welche noch für die Visualisierung in einem mit Silbernitrat gefärbtem 2-D-Polyacrylamidgel ausreichen (Nachweisgrenze 10 ng/ spot). Diese Gesamtzellproteine wurden nach dem laborintern etabliertem Protokoll für die Isolierung der Gesamtzellproteine aus Listerien isoliert [→ 4.2.1] und nach der im Labor etablierten Methode für die 2-D-Gelelektrophorese [→ 4.1] aufbereitet und isoliert.

Dieses Proteinisolierungs-Protokoll für Listerien und die Methode für die 2-D-Gelelektrophorese mittels immobilisierten pH-Gradienten in dem Ettan IPG phor Isoelectric Focussing System von Amersham Biosciences wurde im Rahmen dieser Arbeit zusammen mit Frau Dr. Andrea Spory und Frau Rotenberg etabliert.

Nach Auftrennung der Proteine in 2-dimensionalen Polyacrylamidgelen und der Visualisierung der Proteinspots mittels Silberfärbung konnten anhand der Delta 2D-Software [→ 3.6] unter statistischen Parametern ausgewertete Regulationen von XX Proteinen von *Listeria monocytogenes* während der Infektion in J774-Makrophagen gesichert werden. Die Identifizierung der jeweiligen Proteine wurde mittels der MALDI-TOF Analyse und anschließender Datenbankrecherche von Herrn Armin Bosserhof am ZMBH Heidelberg durchgeführt.

### **5.3.1 Expressionsanalyse des Gesamtproteoms mittels der Delta-2-D Software**

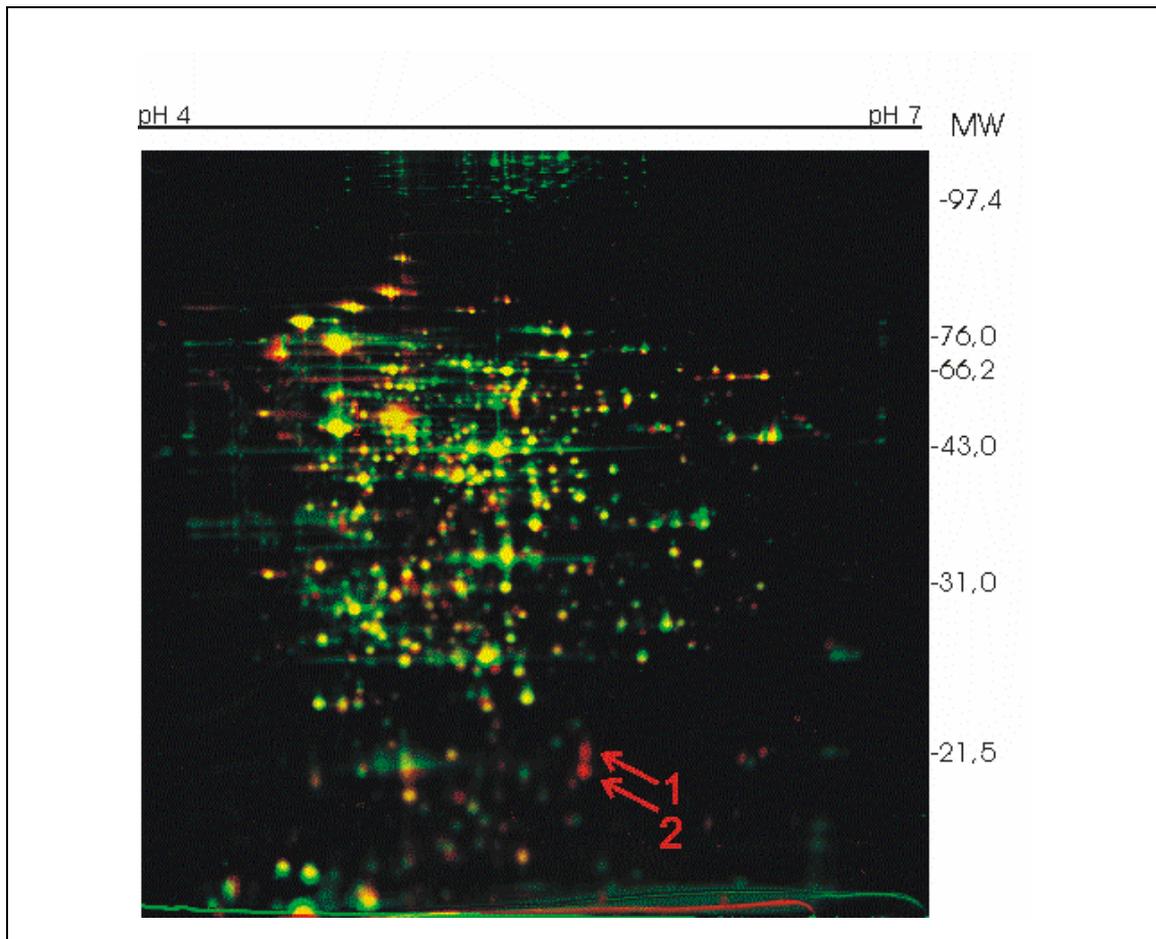
In den Analysen der Proteine aus Zellkultur wurden jeweils 30 µg Gesamtzellprotein in einem Polyacrylamid-Gel in der 1.-Dimension in einem pH-Gradienten von pH 4-7 und in der 2. Dimension nach Ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Die Gele wurden mit Silbernitrat gefärbt, eingescannt und mit Hilfe der Delta-2D-Software von der Firma Decodon ausgewertet.

Hierbei werden die Gele unter rechnerischer Beseitigung von Verzerrungen über von Hand gesetzte Vektoren übereinandergelegt und ein Vergleich der Spotintensitäten mittels Falschfarben dargestellt. Dabei wird der Kontrolle die Farbe grün zugewiesen und der Probe die Farbe rot. Bei gleich starker Expression der jeweiligen Spots erscheinen diese gelb beziehungsweise in der Mischfarbe entsprechend der Intensitäten.

In einer Auswertung der Delta 2D-Software können gleichzeitig drei Gele der Probe als auch der Kontrolle verrechnet werden. Zur Quantifizierung von Proteinen auf 2-D-Gelen wurde die Quantifizierungsfunktionen des Programms Delta2D (Version 3.2, Decodon) verwendet. Als Bezugsgröße wurde das relative Volumen festgelegt, d.h. das Volumen des betrachteten Proteinpunktes bezogen auf das Gesamtvolumen aller Proteinpunkte des Gels. Eine Regulation eines Proteins im 2-D-Vergleich wurde angenommen, wenn (1) der ermittelte Faktor der relativen Volumina  $\leq 0,5$  bzw.  $\geq 2,0$  war und anhand des Students t-test statistisch bestätigt wurde. Hierbei gilt ein Students t-test mit einer Wahrscheinlichkeit von 95%-100% als statistisch signifikant ( $\rightarrow$  3.6).

### **5.3.2 Kontrolle der Auswertbarkeit der neuen Methode:**

Eine weitere Kontrolle sollte sicherstellen, dass die neu entwickelte Isolierungsmethode zur Darstellung des Gesamtzellproteoms der Listerien während der Infektion in J774-Makrophagen ( $\rightarrow$  5.2) keine Auswirkungen auf die Expression der listeriellen Proteine hat. Hierfür wurde das Gesamtzellproteom von in BHI gewachsenen Listerien mit einer Kontrolle von in BHI gewachsenen Listerien, welche der Isolierungsmethode der Listerien aus Zellkultur unterworfen wurden, verglichen. Hierfür wurden Listerien in BHI bis zu einer OD=1,0 angezogen und in Phosphatpuffer (PBS) supplementiert mit (10mM Na<sub>3</sub>, 5µg/ml Tc, 50µg/ml Cm) gewaschen, in diesem Medium in flüssigem Stickstoff eingefroren und den Isolierungsschritten für Listerien aus Zellkultur unterworfen ( $\rightarrow$  4.2.4).



**Abb.9:** Vergleich des Proteinmusters von in BHI gewachsenen *Listeria monocytogenes* EGDe mit Listerien aus BHI, welche den neu entwickelten Isolierungsbedingungen unterworfen wurden

Erfreulicherweise zeigte sich bei dem Overlay der Proteinmuster mittels der Decodon 2D-Software, dass es kaum Unterschiede in den Proteinmustern der beiden Isolierungsmethoden gibt. Somit hat die neu entwickelte Isolierungsmethode keine größeren Auswirkungen auf das Proteinmuster der Listerien verursacht. Auffallend waren jedoch zwei große, neu aufgetretene Spots (1, 2) bei der simulierten Isolierungsmethode auftraten, welche nie zuvor auf *Listeria monocytogenes*-2D-Proteingelen identifiziert werden konnten. Natürlich bestand besonderes Interesse, diese neu aufgetreten Proteinspots zu identifizieren. Die Analyse mittels Maldi-TOF-MS identifizierte sie als homolog zu einem ribosomalen Protein aus *Listeria innocua* Clip 11262 und einem listeriellen Protein L10 Stamm 4b F2365. Diese ribosomalen Proteine stellen vermutlich einen alternativen Weg der Proteinsynthese unter den stringenten die Proteinsynthese inhibierenden Isolierungsbedingungen dar.

## **5.4 Proteomische Analyse der Proteine von *Listeria monocytogenes* aus Infektionen von J774-Makrophagen**

Bei der Auswertung der Proteinexpression in Zellkultur besteht das Hauptproblem darin, dass sich das Proteinmuster während der unterschiedlichen Phasen der Infektion wie Adhäsion, Invasion und Replikation stetig ändert. Da die Listerien hier in einer späten Phase der Infektion, der intrazellulären Replikation isoliert werden, ist anzunehmen, dass viele der Proteinexpressionen durch einen Mangel an Nährstoffen verursacht werden.

Darum wurde in dieser Arbeit mit weiteren Kontrollen eine Annäherung für die Identifizierung von für die Virulenz essentiellen Proteinbeteiligungen sichergestellt. Da bekannt ist, dass Listerien in chemisch definiertem RPMI-1640 Medium wesentlich langsamer replizieren als in BHI Vollmedium (Rinder Gehirn-Herz-Boullion) wurde das RPMI-1640 Zellkulturmedium in der Rolle des Minimalmediums als Kontrolle gewählt. RPMI-1640 besteht aus einem Hydrocarbonat-Puffersystem und basiert auf einer Lösung von Glukose, Salzen, Aminosäuren und Vitaminen.

Zunächst wurden in einer RPMI-Kontrolle die Proteine bestimmt, welche vermutlich durch veränderte Nährstoffbedingungen reguliert werden und nicht direkt am Virulenzgeschehen beteiligt sind. Hierfür wurden in RPMI subkultivierte Listerien mit in BHI gewachsenen Listerien verglichen.

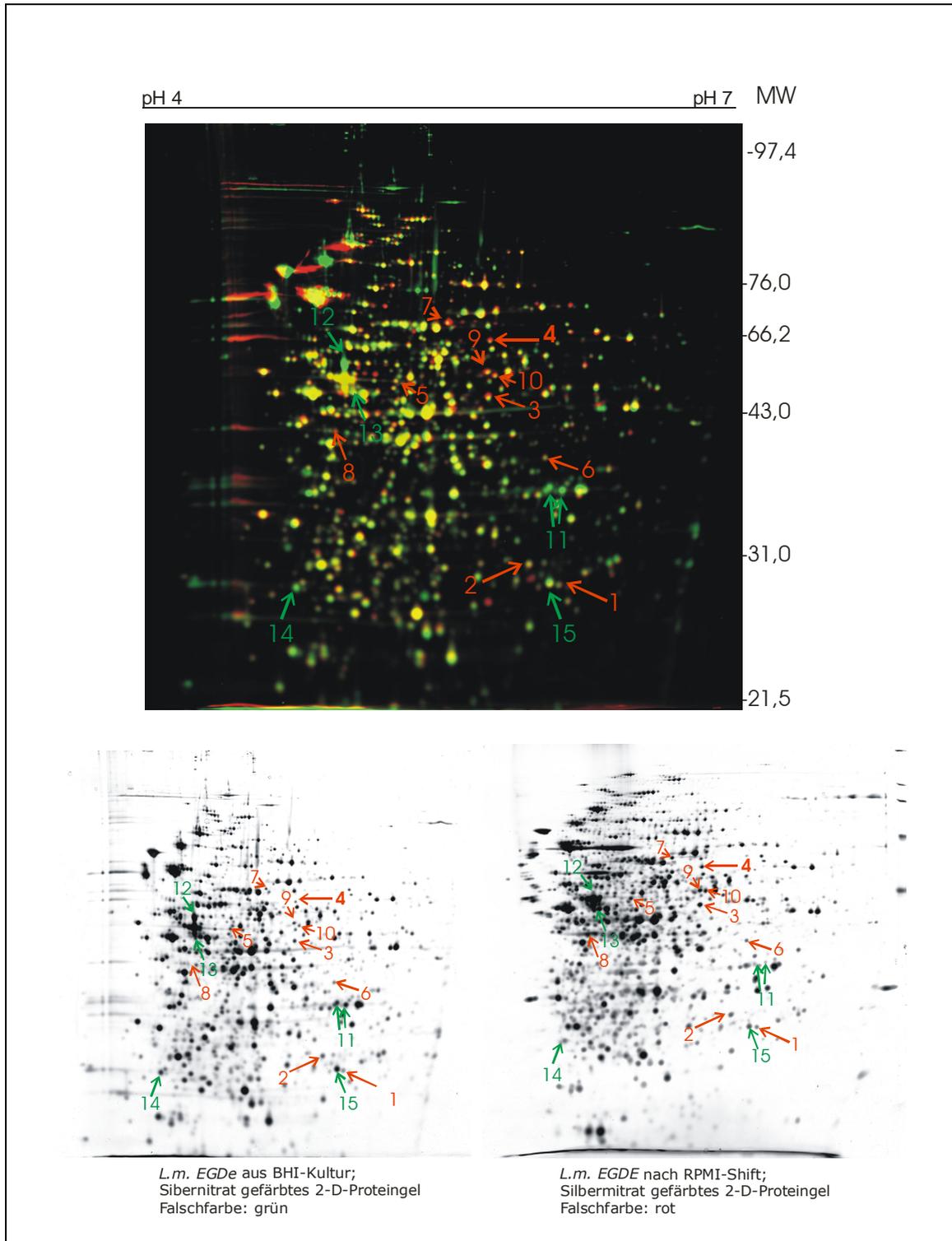
Zusätzlich wurden in einer Positivkontrolle die Proteine bestimmt, welche in J774-Makrophagen im Vergleich zu in RPMI subkultivierten Zellen reguliert werden. In diesem Falle werden die meisten Proteinexpressionen, welche durch Nährstoffmangel induziert werden, aus der Auswertung herausgenommen. Somit ist zu vermuten, dass anhand dieser Positivkontrolle gezielt Proteine identifiziert werden, welche Virulenz-assoziierte oder sogar direkt am Virulenzgeschehen beteiligt sind. Diese stellen somit potentielle neu identifizierte Virulenzfaktoren dar.

---

#### **5.4.1 Vergleich des Proteinmusters von in RPMI subkultivierten Listerien mit in BHI kultivierten Listerien („RPMI-Kontrolle“)**

Diese Kontrolle wurde durchgeführt um den Einfluss des Zellkulturmediums RPMI-1640 und der humiden Atmosphäre bei 5% CO<sub>2</sub> auf das Expressionsmuster von *Listeria monocytogenes* zu untersuchen. Hierfür wurden Listerien unter Zellkulturbedingungen in RPMI eine Stunde lang subkultiviert und anschließend den Isolierungsschritten für Listerien aus Zellkultur unterworfen (→ 4.2.2).

Bei der Auswertung dieser Kontrolle wurden die Gele mittels der Delta-2D-Software ausgewertet. Statistisch gesicherte Proteinregulationen sind in der folgenden Abbildung dargestellt, wobei den Spots die korrespondierenden Proteine anhand der für die Infektionsexperimente identifizierten Proteine, soweit diese bekannt waren, zugewiesen. Somit liefert diese Kontrolle einen weiteren Hinweis auf die Relevanz der in den Infektionsexperimenten identifizierten Proteine auf das Infektionsgeschehen selbst und nicht nur auf die Veränderung des Nährstoffangebotes in der Wirtszelle liefern.



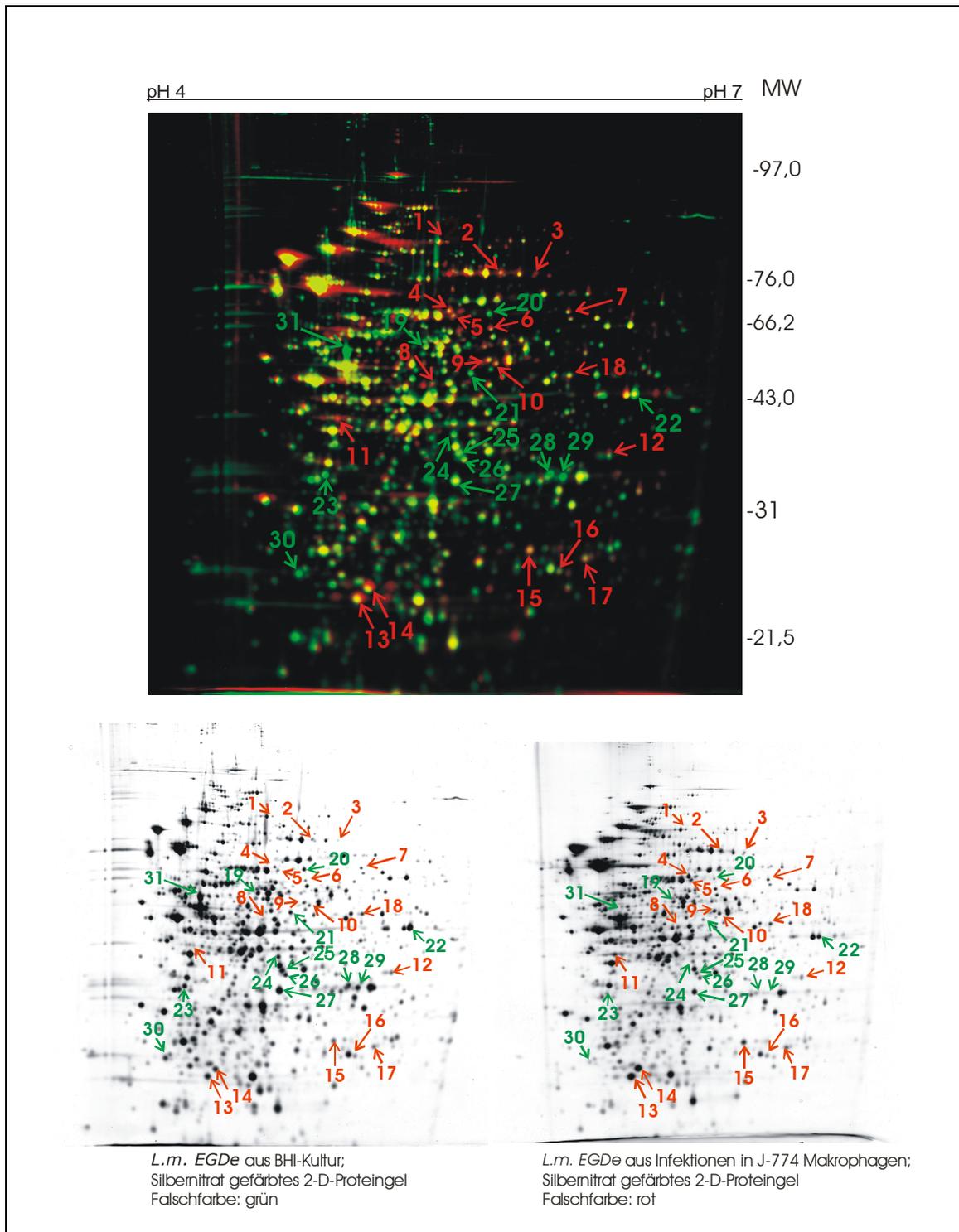
**Abb.10:** Vergleich des Proteinmusters von in RPMI subkultivierten *Listeria monocytogenes* mit in BHI gewachsenen *Listeria. monocytogenes*

**Regulierte Proteine der RPMI-Kontrolle:**

Spot	Regulation/ (student's t-test)	Beschreibung	Gen ID/ Name
1	3,0-fach/ 95,1 %	Similar to ABC transporter, ATP-binding protein	Lmo2372
2	2,59-fach/ 99,0 %	Similar to phosphoglyceromutase	Lmo2205
3	2,82-fach/ 97,5%	3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthase	Lmo1600/ (AroA)
4	8,052-fach/ 100%	Similar to glycine dehydrogenase (decarboxylating) subunit 2	Lmo1350
5	1,93-fach/ 93,1 %	Phosphoribosylaminoimidazole carboxylase II	Lmo1774/ (PurK)
6	4,45-fach/ 99,0 %	Similar to Pho H phosphate starvation induced protein	Lmo1467/ (PhoH-Homolog)
7	4,34-fach/ 99,0%	Bifunctional phosphoribosylaminoimidazole carboxyl formyl formyltransferase and inosine monophosphate cyclohydrolase	Lmo1765/ (PurH)
8	6,0-fach/ 88,2 %	Similar to mannose-6-phosphate isomerase	Lmo2110
9	2,94-fach/ 98,2%	Highly similar to glycine hydroxymethyltransferase	Lmo2539/ (GlyA)
10	4,68-fach/ 99,8%	Similar to glycine dehydrogenase (decarboxylating) subunit 1	Lmo1349
11 (zwei Spots)	0,44- und 0,4-fach/ 94,7 %	30S ribosomal protein S2	Lmo1658 (RpsB)
12	0 (fehlt bei RPMI Subkultur)	Highly similar to translation elongation factor EF-Tu	Lmo2653 (Tuf)
13	0,628-fach/ 97,5 %	Highly similar to phosphoglycerate kinase	Lmo2458/ (Pfk)
14	0,398-fach/ 99,1%	Similar to peptidyl-prolyl-cis-trans-isomerase	Lmo2376
15	0,601-fach/ 94,2 %	Similar to uracil phosphoribosyltransferase	Lmo2538/ (Upp)

#### **5.4.2 Vergleich des Proteinmusters von in BHI kultivierten mit in J774-Makrophagen gewachsenen Listerien**

In diesem Versuch wurden die Gesamtzellproteine von *Listeria monocytogenes*, welche nach der in dieser Arbeit neu entwickelten Methode (→ 5.2) isoliert wurden mit in BHI gewachsenen Listerien verglichen. Hierbei wurde mittels der Delta-2D-Software das typische Verteilungsmuster eines jeden Proteinspots erkannt und quantifiziert. Bei der Auswertung der Delta 2D-Software wurden jeweils drei 2-D-Gele der Listerien aus drei unabhängigen Infektionen sowie drei unabhängig isolierter Kontrollen verrechnet. Bei ausreichenden Daten konnten statistisch gesicherte Werte anhand des students-t-test bezüglich der Verteilung eines Spots in allen Referenzgelen zugewiesen werden. Hierbei gilt ein Students t- Test mit einer Wahrscheinlichkeit von 95%-100% als statistisch signifikant (→ 3.6).



**Abb.11:** Vergleich des Proteinmusters von in BHI kultivierten *Listeria monocytogenes* mit Listerien aus Infektionen von J774-Makrophagen

**Regulierte Proteine des Hauptversuches:**

Spot	Regulation/ (student's t- test)	Beschreibung	Gen ID/ Name
1	11,6-fach/ 100%	Polynucleotide phosphorylase (PNPase)	Lmo1331/ (PnpA)
2	2,2-fach (Links)/ 93,5 %	Similar to <i>B. subtilis</i> minor teichoic acids biosynthesis protein GgaB	Lmo1080/
3	7,426-fach (rechts)/ 99,2 %	Similar to <i>B. subtilis</i> minor teichoic acids biosynthesis protein GgaB	Lmo1080
4	2,42-fach/ 100%	Bifunctional phosphoribosylaminoimidazole coxoy formyl formyltrabnsferase and inosine monophoshate cyclohydrolase	Lmo1765/ (PurH)
5	1,64-fach/ 97,8 %	Highly similar to dihydrolipoamide dehydrogenase complex	Lmo1055/ (PhD)
6	2,1-fach/ 99,7 %	Similar to glycine dehydrogenise (decarboxylating) subunit 2	Lmo1350/
7	2,0-fach/ 100 %	Similar to sugar ABC transporter, ATP binding protein	Lmo1389
8	2,1-fach/ 97,9 %	Highy similar to acetate kinase	Lmo 1581/ (AckA)
9	2,3-fach/ 100 %	Highly similar to glycine hydroxymethyltransferase	Lmo2539/ (GlyA)
10	2,02-fach/ 99,6 %	Similar to glycine dehydrogenase (decarboxylating) subunit 2	Lmo1349
11	4,2-fach/ 99,9 %	Similar to mannose-6-phosphate isomerase	Lmo2110
12	3,9-fach/ 99,8 %	highly similar to acetyl-CoA-carboxylase beta subunit	Lmo1904/ (BirA)
13	1,93-fach/ 99,9 %	Similar to ATP dependent Clp protease proteolytic component	Lmo1138
14	1,92-fach/ 99,0 %	ATP dependent Clp protease proteolytic component	Lmo2468/ (ClpP)
15	1,981-fach/ 99,7%	Similar to phoshoglyceromutase	Lmo2205

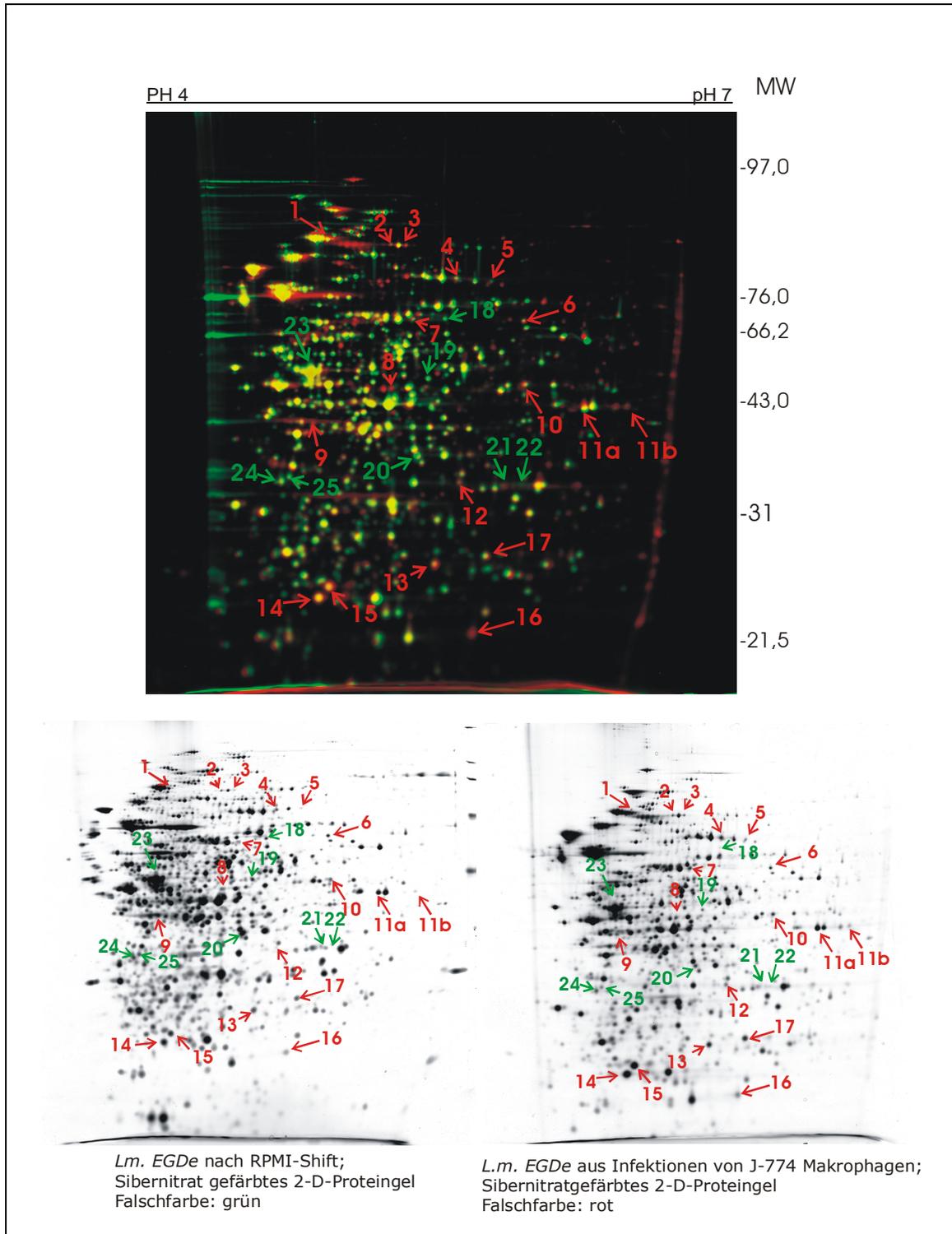
16	1,9-fach/ 99,1 %	Similar to ABC transporter ATP binding protein	Lmo2372
17	2,9-fach/ 99,9 %	Similar to cytidilate kinase	Lmo1939/ (Cmk)
18	2,2-fach/ 99,6 %	Similar to D-alanyl-D-alanine carboxypeptodase (penicillin binding protein 5)	Lmo2754
19	0,52-fach/ 99,8%	Glycose-6-phosphate isomerase	Lmo2367/ (Pgi)
20	0,51-fach/ 99,3 %	Similar to acetate-CoA-ligase	Lmo2720
21	0,53-fach/ 99,7 %	Similar to UDP-N-acetyl muramate-alanine ligases	Lmo1605/ (MurC)
22	0,48-fach/ 100%	Highly similar to pyruvate dehydrogenase (E1 alpha subunit)	Lmo1052/ (PdhA)
23	0,39-fach/ 99,9 %	Thioredoxin Reduktase oder Conserved hypothetical protein (2.MSTreffer)	Lmo2478/ (TrxB) Lmo 0663
24	0,538-fach/ 99,7 %	Similar to NAD(P dehydrogenase)H dependent glycerol-3-phosphate	Lmo1936/ (GpsA)
25	0,31-fach/ 100%	Highly similar to 6-phosphofructokinase	Lmo1571/ (PfkA)
26	0,56-fach/ 97,3 %	Fructose-1-phosphate kinase	Lmo2336/ (FruB)
27	0,47-fach/ 99,9 %	Highly similar to cysteine synthase	Lmo0223/ (CysK)
28	0,448-fach/ 99,7 % (links)	30 S ribosomal protein S2	Lmo1658/ (RpsB)
29	0,255-fach/ 100% (rechts)	30 S ribosomal protein S2	Lmo1658/ (RpsB)
30	0,4-fach/ 99,1 %	Similar to peptidyl-prolyl-cis-trans-isomerase	Lmo2376
31	0 (fehlt bei Wachstum in BHI)	Highly similar to translation elongation factor EF-Tu	Lmo2653

### 5.4.3

#### **Vergleich des Proteinmusters von *Listeria monocytogenes* aus Zwischenkultur in RPMI mit *Listeria* aus Infektionen in J774-Makrophagen („Infektionskontrolle“)**

Anhand der Infektionskontrolle wurden im Vergleich von in RPMI subkultivierten Listerien, welche eine Stunde lang unter Zellkulturbedingungen subkultiviert wurden und dann wie die Listerien aus Zellkultur aufgereinigt wurden (→ 4.2.2) mit den Listerien, die anhand der neu entwickelten Methode aufgereinigt wurden verglichen. Die Proteinexpressionen, welche möglicherweise durch Nährstoffmangel induziert werden, werden hiermit aus der Auswertung herausgenommen, so dass die hier identifizierten Proteine direkt am Virulenzgeschehen beteiligt sind und somit potentielle Virulenzfaktoren darstellen.

Da die Proteinexpression bereits in RPMI in den Listerien insgesamt gedrosselt wird, wie die Reprimierung der ribosomalen Proteine belegt (siehe Abb. 12), ist anzunehmen, dass hier bereits Induktionen von 1,5-facher Stärke einen signifikanten Wert darstellen. Im umgekehrten Fall sind für die reprimierten Proteine erst Regulationen unter 0,5-fach als signifikant zu betrachten. Die insgesamt gedrosselte Proteinsynthese in der Kontrolle muss für die Auswertung und Diskussion der Ergebnisse beachtet werden.



**Abb.12:** Vergleich des Proteinmusters von *Listeria monocytogenes* aus Zwischenkultur in RPMI mit *Listeria* aus Infektionen in J774-Makrophagen

**Regulierte Proteine der Infektionskontrolle:**

Spot	Regulation/ (student's t-test)	Beschreibung	Gen ID/ Name
1	1,670-fach/ 99,8%	Similar to endopeptidase Clp ATP-binding chain B (Clp B)	Lmo2206/ (ClpB)
2	1,85-fach/ 99,8 %	Polynucleotide phosphorylase (PNPase)	Lmo1331/ (PnpA)
3	3,83-fach/ 98,3 %	Polynucleotide phosphorylase (PNPase)	Lmo1331/ (PnpA)
4	1,71-fach/ 88,9 %	Similar to <i>B.subtilis</i> minor teichoic acids biosynthesis protein	Lmo1080
5	3,8-fach/ 94,2 %	Similar to <i>B.subtilis</i> minor teichoic acids biosynthesis protein	Lmo1080
6	1,52-fach/ 85,6%	Similar to sugar ABC transporter, ATP binding protein	Lmo1389
7	1,57-fach/ 96,6 %	Highly similar to dihydrolipoamide dehydrogenase complex	Lmo1055/ (PdhD)
8	1,62 -fach/ 82,8%	Highly similar to acetate kinase	Lmo1581/ (AckA)
9	2,82-fach/ kein t-test verfügbar	Similar to mannose-6-phosphate isomerase	Lmo2110
10	Visuelle Beurteilung	Similar to D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase's (penicillin binding protein 5)	Lmo 2754
11 a	1,298-fach/ 98,3 %	Highly similar to pyruvate dehydrogenase (E1 alpha subunit)	Lmo1052/ (PdhA)
11 b	6,05-fach/ 97,5 %	Highly similar to pyruvate dehydrogenase (E1 alpha subunit)	Lmo1052/ (PdhA)
12	1,76-fach/ 78,2 %	Conserved hypothetical protein	Lmo0774
13	1,73-fach/ 97,6 %	Similar to 3-ketoacyl-acyl carrier protein reductase	Lmo1807/ (FabG)
14	1,93-fach/ 99,9 %	Similar to ATP dependent Clp protease proteolytic component	Lmo1138
15	2,2-fach/ 99,9 %	ATP dependent Clp protease proteolytic component	Lmo2468/ (ClpP)

16	3,1-fach/ 98,7 % 3,1-fach/ 98,7 %	Ribosomales Protein S7 ( <i>Lactobacillus casei</i> ) (2.Treffer) Lmo0592 [Listeria monocytogenes EGDe]	Lca2509 Lmo0592
17	1,476-fach/ 92,2 %	Similar to phosphoglyceromutase 1	Lmo2205
18	0,564-fach/ 97,8 %	Similar to acetate CoA ligase	Lmo2720
19	0,455-fach/ 99,9 %	Similar to UDP-N-acetyl mramate-alanine ligases	Lmo1605/ (MurC)
20	0,461 -fach/ 99,8 %	Highly similar to 6-phosphofruktokinase	Lmo1571/ (Pfk)
21	Nicht mehr detektierbar	30 S ribosomal protein	Lmo1658/ (RpsB)
22	Nicht mehr detektierbar	30 S ribosomal protein	Lmo1658/ (RpsB)
23	Nicht mehr detektierbar	Highly similar to translation elongation factor EF-Tu	Lmo2653/ (Tuf)
24	0,601-fach/ 92,1 %	Thioredoxin Reduktase	Lmo2478/ (TrxB)
25	0,626-fach/ 98,3 % 0,626-fach/ 98,3 %	Thioredoxin Reduktase  (2.Treffer) Conserved hypothetical protein	Lmo2478 (TrxB) Lmo0663

## 5.5 Übersicht der regulierten Proteine in den unterschiedlichen Versuchsansätzen

Das Ziel dieser Arbeit war es eine zuverlässige Methode zur Darstellung des Proteinmusters von *Listeria* während der Infektion in der eukaryontischen Zelle darzustellen. Des Weiteren sollte die Methode auf die Identifizierung von neuen potentiellen Virulenzfaktoren zielen. Hiefür wurde eine RPMI-Kontrolle durch Vergleich von in BHI gewachsenen *Listerien* mit in RPMI zwischenkultivierten *Listerien* etabliert um Proteine auszuschließen welche durch die veränderten Nährstoffverhältnisse induziert werden auszuschließen. Der Hauptversuchsansatz wurde als Vergleich von in Vollmedium BHI gewachsenen *Listerien* mit aus Infektionen isolierten *Listerien* durchgeführt.

Als Positivkontrolle diente der Vergleich von in RPMI zwischenkultivierten Listerien mit den Infektions-Versuchsansätzen. Hierbei konnten vor allem die Clp Proteasen Clp P und Clp X als potentielle Virulenzfaktoren identifiziert werden. Da für die Clp Proteasen eine Beteiligung an der Virulenz für *Listeria* bereits berichtet wurde stellt dieses Ergebnis eine Bestätigung der Methode dar. Ebenso konnten Oberflächenproteine wie Lmo1080 und Lmo2754 identifiziert werden für welche eine Beteiligung am Virulenzgeschehen sehr wahrscheinlich ist da häufig Oberflächenproteine Virulenzfaktoren darstellen. Diese Ergebnisse stellen jedoch keine umfassende Untersuchung des listeriellen Proteoms dar sondern können nur Hinweise liefern. Der Hauptfokus dieser Arbeit lag auf der Entwicklung einer neuen Methode zur Darstellung des Proteinpopulation unter Infektionsbedingungen. In der Anfangsphase dieser Arbeit wurden die Proteine noch visuell beurteilt und erst nachdem die DELTA-2-D Software zur Verfügung stand im Nachhinein statistisch ausgewertet, wobei sich die Grenzen der statistischen Signifikanz von  $<0,5$  oder  $>2,0$  der Spotintensitäten nicht für alle identifizierten Proteine bestätigen ließ. Für eine vollständige Beurteilung müssten alle beteiligten Spots statistisch erfasst werden. Somit könnten auch einige der Proteine der Positivkontrolle auch im Hauptversuchsansatz als bestätigt erscheinen und weitere Proteinregulationen gesichert und die jeweiligen Proteine identifiziert werden. Somit könnten noch weitere potentielle Virulenzfaktoren identifiziert werden oder zumindest deren wahrscheinliche Beteiligung am Virulenzgeschehen vermutet werden.

Obwohl nicht alle statistisch signifikant regulierten Proteine dargestellt werden konnten, sprechen die ermittelten Ergebnisse dafür, dass die neu entwickelte Methode zuverlässige Ergebnisse untermauert durch die statistische Auswertung durch die Delta-2-D Software liefert (siehe Abb. 13).

↑	Regulation von BHI-Medium zu RPMI-Medium	Regulation von BHI-Medium zu Infektionen		Regulation von RPMI-Medium in zu Infektionen
	Lmo1765 (PurH)	Lmo1765 (PurH)	Lmo1904 (BirA)	Lmo0592 (unbekanntes Protein)
	Lmo1349 (Glycine dehydrogenase Untereinheit 1)	Lmo1080 (homolog zu <i>B. subtilis</i> m Teichonsäuren)	Lmo1939 (Cytidylate Kinase)	Lmo0774 (konserviertes hypothetisches Protein)
	Lmo1350 (glycine dehydrogenase)	Lmo 1055 (PdhD)	Lmo2110 (Mannose-6-Phosphate Isomerase)	Lmo1052 (PdhA)
	Lmo1467 (PhoH-Homolog)	Lmo 1138	Lmo2372 (ABC transporter ATP binding protein)	Lmo1055 (PdhD)
	Lmo1600 (AroA)	Lmo 1331 (PnpA)	Lmo2468 (ClpP)	Lmo1080 (GgaB)
	Lmo1774 (PurK)	Lmo1349 (Glycine dehydrogenase Untereinheit 1)	Lmo 2539 (GlyA)	Lmo1138
	Lmo2205 (Phosphoglyceromutase)	Lmo 1350 (glycine dehydrogenase subunit 2)	Lmo2754 (Penicillin bindendes Protein 5)	Lmo1331 (PnpA)
	Lmo2372 (ABC transporter, ATP bindendes Protein)	Lmo1389 (ABC transporter, ATP bindendes Protein)	Lmo2205 (Phosphoglyceromutase)	Lmo1389 (ABC transporter, ATP bindendes Protein)
	Lmo2539 (GlyA)	Lmo1581 (AckA)		Lmo1807 (FabG)
	Lmo2110	Lmo1807 (FabG)		Lmo2205 (Phosphoglyceromutase)
				Lmo2206 (ClpB)
				Lmo2468 (ClpP)
				Lmo2754 (D-alanyl-D-alanine Carboxypeptidase)
				Lmo1581 (AckA)
↓	Regulation von BHI-Medium zu RPMI-Medium	Regulation von BHI-Medium zu Infektionen		Regulation von RPMI-Medium zu Infektionen
	Lmo1658 (RpsB)	Lmo0223 (CysK)	Lmo2336 (FruB)	Lmo2720 (Acetat-CoA-Ligase)
	Lmo2538 (Upp)	Lmo2478 (TrxB)	Lmo2367 (Pgi)	Lmo1571 (PfkA)
	Lmo2458 (Pgk)	Lmo1052 (PdhA)	Lmo2376 (Peptidyl-Prolyl Cis-Trans-Isomerase)	Lmo1605 (MurC)
	Lmo2376 (Peptidyl-Prolyl-Cis-Trans-Isomerase)	Lmo1571 (PfkA)	Lmo2653 (Tuf)	Lmo1658 (RpsB)
	Lmo2653 (Tuf)	Lmo1605 (MurC)	Lmo2720 (Acetat- CoA-Ligase)	Lmo2478 (TrxB)
		Lmo1658 (RpsB)		Lmo2653 (Tuf)
		Lmo1936 (GpsA)		

**LEGENDE:**

RPMI-Kontrolle (Regulation von BHI-Medium zu RPMI-Medium)	Infektionskontrolle (Regulation von RPMI-Medium zu Infektionen)	unspezifische Regulationen
Überschneidung mit der Infektionskontrolle	neu regulierte Proteine	keine Überschneidungen

**Abb. 13:** Übersicht der regulierten Proteine in den 2-D-Proteinanalysen der RPMI-Kontrolle, Hauptversuch und Positivkontrolle

### 5.5.1 Übersicht der Funktionellen Klassen der identifizierten Proteine

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Regulationen der Proteine sich über alle funktionellen Klassen erstrecken. Statistische Aussagen lassen sich anhand der hier identifizierten Anzahl von Proteinen nicht treffen. Auffallend häufig ist jedoch eine Beteiligung des Intermediären Stoffwechsels und hierbei vor allem eine Regulation der an der Glukolyse beteiligten Proteine, des Aminosäuren Stoffwechsels, des Nukleotid Stoffwechsels und der Proteinsynthese. Außerdem sind Oberflächen Proteine, Transporter und Stress induzierte Proteine beteiligt.

#### Übersicht der induzierten Proteine:

Funktionelle Klassifizierung	Beschreibung ↑	Gen ID/ Name
1 Cell envelope and cellular processes:		
1.1 Cell wall	similar to B. subtilis minor teichoic acids biosynthesis protein GgaB	Lmo1080
	similar to D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase (penicillin binding protein 5)	Lmo2754
1.2 Transport/binding proteins and lipoproteins	similar to sugar ABC transporter, ATP-binding protein	Lmo1389
	similar to ABC-transporter ATP binding proteins	Lmo2372
2. Intermediary metabolism		
2.1.1 Specific pathways	highly similar to acetate kinase	Lmo1581/ (AckA)
	similar to mannose-6 phosphate isomerase	Lmo2110

2.1.2 Main glycolytic pathways	similar to phosphoglyceromutase 1	Lmo2205
	highly similar to dihydrolipamide dehydrogenase, E3 subunit	Lmo1055/ (PdhD)
2.2 Metabolism of amino acids and related molecules	3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthase	Lmo1600/ (AroA)
	similar to glycine dehydrogenase (decarboxylating) subunit 2	Lmo1349
	similar to glycine dehydrogenase (decarboxylating) subunit 2	Lmo1350
	highly similar to glycine hydroxymethyltransferase	Lmo2539/ (GlyA)
2.3 Metabolism of nucleotids and nucleic acids	phosphoribosylaminoimidazole carboxylase II	Lmo1774/ (PurK)
	Bifunctional phosphoribosylaminoimidazole caboxy formyl formyltrabnsferase and inosine monophoshate cyclohydrolase	Lmo1765/ (PurH)
	polynucleotide phosphorylase (PNPase)	Lmo1331/ (PnpA)
	similar to cytidylate kinase	Lmo1939/ (Cmk)
2.4 Metabolism of lipids	similar to 3-ketoacyl-acyl carrier protein reductase	Lmo1807/ (FabG)
2.5 Metabolism of coenzymes and	highly similar to acetyl-CoA carboxylase beta subunit	Lmo1904/ (BirA)

Ergebnisse

---

2.6 Metabolism of phosphate	similar to phosphate starvation induced protein PhoH	Lmo1467/ (PhoH)
4 Other functions		
4.1 Adaptation to atypical conditions	ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit	Lmo2468 / (ClpP)
	similar to endopeptidase Clp ATP-binding chain B (ClpB)	Lmo2206/ (ClpB)
	similar to ATP-dependent Clp protease proteolytic component	Lmo1138
5 Other organisms	conserved hypothetical protein	Lmo0774
6 No similarity	Lmo0592	Lmo 0592

**Übersicht der reprimierten Proteine:**

Funktionelle Klassifizierung	Beschreibung ↓	Gen ID/ Name
1 Cell envelope and cellular processes:		
1.1 Cell wall	similar to UDP-N-acetyl muramate-alanine ligases	Lmo1605/ (MurC)
1.4 Membrane bioenergetics	Thioredoxin Reduktase	Lmo2478/ (TrxB)
2. Intermediary metabolism		
2.1.1 Specific pathways	similar to acetate-CoA ligase	Lmo2720
	similar to NAD(P)H-dependent glycerol-3-phosphate dehydrogenase	Lmo1936/ (GpsA)
	highly similar to 6-phosphofructokinase	Lmo1571/ (Pfk)
	fructose-1-phosphate kinase	Lmo2336/ (FruB)
2.1.2 Main glycolytic pathways	glucose-6-phosphate isomerase	Lmo2367/ (Pgi)
	highly similar to pyruvate dehydrogenase (E1 alpha subunit)	Lmo1052/ (PdhA)
	highly similar to phosphoglycerate kinase	Lmo2458/ (Pgk)
2.2 Metabolism of amino acids and related molecules	highly similar to cysteine synthase	Lmo0223/ (CysK)
	highly similar to uracil phosphoribosyltransferase	Lmo2538/ (Upp)

## Ergebnisse

---

3 Information pathways		
3.7.1 Ribosomal Proteins	30S ribosomal protein S2	Lmo1658/ (RpsB)
3.7.4 Protein Synthese Elongation	highly similar to translation elongation factor EF-Tu	Lmo2653/ (TufA)
3.9 Protein folding	similar to peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	Lmo2376
5 Other organisms	conserved hypothetical proteins	Lmo0663

## 6 DISKUSSION

Bislang wurde das Infektionsgeschehen von *Listeria monocytogenes* vornehmlich auf mikroskopischer und biochemischer, molekulargenetisch auf genomischer und transskriptioneller Ebene untersucht. Über das Proteom, das heißt die Natur, Menge und Modifikationsformen der tatsächlich aktiven Proteine unter Infektionen in eukaryontischen Zellen ist nur überraschend wenig bekannt obwohl die Methode der proteomischen Analyse bereits in der Mikrobiologie gut etabliert ist. Einer der Gründe hierfür ist, dass bei der Isolierung der Listerien aus Wirtszellen die im Überschuss vorliegenden Wirtszellproteine das listerielle Proteinmuster überlagern. Die einzige Möglichkeit dies zu umgehen stellt bislang die radioaktive Markierung der Listerienproteine dar, wobei aber die Proteinsynthese der Wirtszelle inhibiert werden muss, um einen gezielten Einbau der Isotops in die Bakterien zu gewährleisten. Da die Wirtszellen hierbei in ihrer normalen Physiologie beeinflusst werden, sind Sekundäreffekte auf die Ergebnisse zu vermuten. Ein solcher Ansatz wurde bis jetzt nur von T. Hanawa (1995) [67] durchgeführt, wobei dieser bei Infektionen von J774-1 Makrophagen 32 Proteine als induziert nachweisen konnte. In diesem Ansatz wurden diese Proteine mit dem Muster von durch Stress induzierten Listerien verglichen, jedoch deren Identität nicht bestimmt. Das heißt, bislang gibt es weder genaue Ergebnisse noch einen zuverlässigen Ansatz das Proteom, das heißt die Menge der tatsächlich aktiven Proteine oder deren Modifikationen in *Listeria* unter Infektionsbedingungen zu bestimmen.

In der hier vorliegenden Arbeit gelang es eine neue Methoden zur Darstellung und Quantifizierung bakterieller Proteine, in diesem Falle *Listeria monocytogenes* in infizierten J774-Makrophagen zu entwickeln und erstmals statistisch gesicherte Ergebnisse über die Expression und die Identität von 38 Proteinen unter Infektionen in J774-Makrophagen zu gewinnen. Diese neue Methode ermöglicht ohne radioaktive Markierung und die damit verbundene Unterbrechung der Wirtszellproteinsynthese durch neu eingeführte differentielle Waschrinne unter gesicherter Arretierung des listeriellen Proteinpatterns eine ausreichende Menge an Proteinen von Listerien aus Infektionen zu isolieren. Diese Proteine konnten anschließend mittels der Methode der 2-D-Gelelektrophorese aufgetrennt und anhand der Delta-2D-Software visualisiert und statistisch ausgewertet werden. Diese Ergebnisse ermöglichen eine zusätzliche Beleuchtung der bereits vorliegenden Ergebnisse aus den transskriptomischen Analysen [80] [20], wobei die Methode im Gegensatz zum Transskriptom durch physikalische und analytische Limitierungen der Methode der 2-D-Gelelektrophorese

(→ 6.1) nicht alle Proteine von *Listeria* sondern nur etwa ein Drittel des Genoms (ca. 1000 Proteine) der insgesamt auf dem Genom kodierten detektieren kann.

## **6.1 Rationale zur Methode der Proteinanalyse durch 2-Dimensionale Gelelektrophorese**

Durch die hier etablierte Methode können Aussagen über die differentielle Genaktivität der *Listeria* in J-774-Makrophagen gewonnen werden. Diese sind zusätzlich zu den bereits gewonnenen Ergebnissen der Transkriptionsanalysen [20, 80] von besonderem Interesse, da die Transkriptanalyse nur begrenzte Aussagen über die tatsächlichen Mengen der Genprodukte im Bakterium zulässt, zumal die Anzahl der tatsächlich aktiven Proteine nicht nur durch die m-RNA-Konzentration, sondern auch durch die Translations- und Abbaurate in der Zelle beeinflusst werden. Um das komplexe Netzwerk physiologischer Vorgänge zu verstehen reicht es nicht aus, das Genom eines Organismus zu entschlüsseln, es müssen vielmehr die Proteine in Ihrer Gesamtheit erfasst werden. Während das Genom eine gut definierte statische Größe ist, bildet das Proteom ein dynamisches und sich ständig veränderndes Gebilde. Daher ist für die Proteomanalyse die Definition der Ausgangsbedingungen eine unverzichtbare Voraussetzung.

Dennoch unterliegt die 2-D-Elektrophorese einigen Limitierungen (→ 2.1.1): Die potentiell 2853 Proteine von *Listeria monocytogenes* können nicht komplett dargestellt werden. Die Methode der 2-D-Elektrophorese erlaubt die Auftrennung von etwa 1400 Spots Proteinkomponenten in einem Proteingel [160] [59]. Zudem entfallen Proteine mit einem Molekulargewicht von weniger als 5.000 Da und für Proteine größer als 150.000 Da. In diesem Bereich ist nur eine schlechte Auflösung möglich. Ebenso verhält es sich mit Proteinen mit einem isoelektrischen Punkt in extremen pH-Bereichen (kleiner als pH 2 und größer als pH 12), wobei im pH-Bereich 9-12 bereits einige Optimierungsschritte notwendig sind, um eine gute Auftrennung zu erreichen. In dieser Arbeit wurde ein pH- Bereich von 4-7 gewählt und die Proteine wurden im Bereich zwischen 20.000 Da und 100.000 Da aufgetrennt. Außerdem können nur in geringer Menge vorkommende und stark hydrophobe Proteine nicht nachgewiesen werden. Erschwerend kommt die eingeschränkte Reproduzierbarkeit der äußerst sensiblen Methode und der hohe Zeit- und Kostenaufwand hinzu um jeden Spot zu identifizieren. Neue voll automatisierte Methoden erlauben die Identifizierung von hunderten Proteinen aus einem Coomassie oder sogar Silbergel in einem Ansatz [169]. Alternativ besteht noch die Möglichkeit der Flüssigchromatographie und anschließender MS-Identifizierung, wobei eine

Quantifizierung nur noch durch zuvor durchgeführte radioaktive Markierung mit Isotopen möglich ist [57][17]. Diese und weitere Entwicklungen werden neue Möglichkeiten der Proteomforschung eröffnen.

Unter Berücksichtigung der Limitierungen der Methode können die Ergebnisse dieser Arbeit als eine ergänzende Information zu den genomischen Untersuchungen gelten, stellen aber keine umfassende Darstellung des listeriellen Proteoms dar.

## **6.2 Entwicklung einer neuen Methode zur selektiven Darstellung listerieller Proteine aus Infektionen in J774-Makrophagen**

Bei der Entwicklung der Methode wurde zunächst ein Ansatz der selektiven Isolierung der Listerien aus Zellkultur mit verschiedenen paramagnetischen Beads durchgeführt: Dynabeads® anti Listeria (Dynal, Oslo), Kieselgel + Magnetit Beads (MERCK in Entwicklung), Dynabeads® M-270 Epoxy – CBD Beads (Beschichtung mit Phagenlysin Ply 118). Leider führte die Isolierung mittels paramagnetischer Beads nicht zu einer ausreichenden Menge an Proteinen für die Methode der 2-D-Elektrophorese. Des Weiteren gelang es, Versuchsbedingungen zu etablieren, welche die Isolierung von *Listeria monocytogenes* aus Zellkultur unter Bewahrung des Proteinexpressionsmuster in Zellkultur ermöglichten. In einem weiteren Versuch der selektiven Isolierung der Listerien gelang eine Aufreinigung einer ausreichenden Menge an Listerien mittels verschiedener Waschschriffe aus Zellkultur. Dieser Ansatz konnte erfolgreich mittels 2-D-Proteinanalyse ausgewertet werden.

### **6.2.1 Selektive Isolierung der Listerien aus Zellkultur mit verschiedenen paramagnetischen Beads**

Ziel dieser Arbeit war die Darstellung des Proteoms von *Listeria monocytogenes* während des Infektionszyklus in der Wirtszelle. Das Hauptproblem bei solchen Untersuchungen, nämlich die Überlagerung des bakteriellen Proteinmusters durch die im Überschuss vorhandenen Wirtszellproteine, könnte im Prinzip durch eine selektive Markierung der bakteriellen Proteine überwunden werden. Dies ist bislang nur durch radioaktive Markierung mit [<sup>35</sup>S]-Methionin möglich, wobei aber die Proteinsynthese der eukaryontischen Zelle mit Cycloheximid inhibiert werden muss,

wodurch diese jedoch in ihrer gesamten Physiologie sowie sowie ihrer Reaktion gegen den bakteriellen Eindringling beeinträchtigt wird und die Versuchsbedingungen nicht den realen Interaktionen Wirt-Parasit entsprechen. Eine relativ spezifische Markierung mit [ $^3\text{H}$ ]-Diaminopimelat (DAP) wäre zwar ebenfalls in Frage gekommen, da DAP nur bei Bakterien in den Lysin-Metabolismus eingeschleust wird. Die Auswertung hätte jedoch wegen der sehr schwachen Strahlung von Tritium mehrere Monate Autoradiographie benötigt und somit den Rahmen dieser Arbeit gesprengt.

Da die Methode der selektiven Markierung verworfen wurde, wurde ein Ansatz der selektiven Isolierung mittels paramagnetischer Beads gewählt. Ein erster Ansatz wurde mit Dynabeads, beschichtet mit polyklonalen Antikörpern gegen Oberflächenproteine von *Listeria*, durchgeführt. Es wurde eine maximale Wiederfindungsrate von 25,6 % ( $6,4 \cdot 10^6$  Listerien/ml) erreicht. Da jedoch ca.  $10^9$  Bakterien als Ausgangsmaterial für die weitere Aufarbeitung und Analyse erforderlich waren, hätte man unter diesen Bedingungen 156 Zellkulturflaschen für ein Gel benötigt. Da sich jedoch in den weiteren Vorversuchen mit Zellysat die Recovery weiter um den Faktor 10 verschlechterte ( $1,6 \cdot 10^5$  Listerien/ml), wurde der Ansatz mit Dynabeads für die Methode der 2-D-Proteinanalyse verworfen.

Ein zweiter Ansatz mit Kieselgel Beads der Firma Merck lieferte im Vergleich zu den Dynabeads Listerien in einer Potenz höher (hier:  $6 \cdot 10^7$  Bakterien/Zellkulturflasche). Das heißt, Ausgangsmaterial für ein Proteingel mit 30  $\mu\text{g}$  Protein könnte aus 7 Zellkulturflächen gewonnen werden. Leider zeigte sich in einem ersten Versuch der zweidimensionalen Auftrennung eine starke Streifenbildung. Diese könnte durch die noch an den Listerien heftenden Magnetit Beads oder aber durch NaCl Reste der Probe verursacht sein. Vorausgesetzt, eine Entkopplung von den Magnetit Beads und eine hinreichende Aufreinigung der Probe von NaCl Resten könnten gewährleistet werden, wären die Kieselgel Beads eine Option für die selektive Anreicherung von *Listeria monocytogenes* aus Zellkultur und deren anschließende zweidimensionale Proteinanalyse. Des Weiteren müsste analog zu den in dieser Arbeit gezeigten Ergebnissen, ( $\rightarrow$  5.2) das Proteinpattren in Zellkultur über die Zeit der Aufreinigung bewahrt bleiben. Dieser neue Ansatz hätte den Vorteil, dass er sich auch auf andere Zelllinien übertragen ließe.

Durch Vorversuche mit der Zellwandbindungsdomäne (CBD) des Phagenlysin Ply118 beschichteten Dynabeads konnten pro Ansatz maximal  $1 \cdot 10^4$  Listerien gewonnen werden. Da unter diesen Bedingungen Tausende von Zellkulturflaschen benötigt würden, schied dieser Ansatz aus. Der Vorteil dieser Methode ist die absolute Spezifität der mit Phagenlysin beschichteten Beads. Das Phagenlysin 118 erkennt spezifisch die Listerien Serovare 1/ 2 wodurch sich interessante

Anwendungsmöglichkeiten wie ELISA-Screenings für die Lebensmittelindustrie ergeben.

Insgesamt lässt sich sagen, dass die Methode der paramagnetischen Separation entweder an der Anzahl der Listerien, welche für eine 2-D-Proteindarstellung benötigt gewesen wären scheiterte oder aber die Beads sich kovalent an die Listerien banden und somit die äußerst empfindliche Methode der zweidimensionalen elektrophoretischen Proteinauftrennung störten.

Auch alternative Nachweismethoden, wie Fluoreszenzfarbstoff erlauben keine wesentlich höhere Sensitivität. Die derzeit von Amersham Biosciences angebotenen „CyDye Fluorescent Dyes“ verfügen über eine Nachweisgrenze von 125 pg/spot [51]. Nachträgliche Markierung der Proteingele mit dem Fluoreszenzfarbstoff SYPRO Ruby würde eine Nachweisgrenze von 1-2 ng je Spot erlauben. Hierbei können typischerweise Proteine mit ca.  $10^3$  Kopien/ Zelle nachgewiesen werden. Die Nachweisgrenze für Silbernitrat gefärbte Gele liegt bei 0,1 ng/spot. Somit kann die absolute Nachweisgrenze nicht erhöht werden. Fluoreszenzfarbstoffe hätten jedoch den Vorteil eines linearen Nachweises der absoluten Proteinmenge. Die Methode stellt mittels der Auswertung auf einem entsprechenden Fluoreszenzscanner eine Möglichkeit dar, die Nachweisgrenze der hier entwickelten Methode zu erweitern.

Die sensibelsten Methoden stellen immer noch die radioaktiven Markierungen dar (→ 2.1), wobei zum Erreichen der maximalen Sensitivität lange Expositionszeiten von mehreren Wochen notwendig sein können, wodurch diese für diese Arbeit ausserhalb des möglichen Zeitrahmens lagen.

Ein weiterer viel versprechender Ansatz zur Erhöhung der Sensitivität der Methode ist die Kombination von Radiomarkierung und Nachweis mittels Phosphor-Screens, wobei Kristalle in den Screens angeregt werden und die Lumineszenz durch die Anregung mit einem He-Ne Phosphor-Mager-Scanner erfasst wird. Dies erlaubt eine Erhöhung der Sensitivität der radioaktiven Markierung um den Faktor fünf [120]. Dies stellt unter Voraussetzung der technischen Ausstattung eine Möglichkeit der Erweiterung der Nachweisgrenze für die hier entwickelte Methode dar.

Leider scheiterte die Methode der paramagnetischen Separation der Listerien aus Zellkultur an der nicht ausreichenden Sensitivität der Methode der 2-D-Proteinanalyse zum jetzigen Zeitpunkt. Da die Methoden der 2-D-Proteinanalyse sich weiterhin in Entwicklung befindet, könnte die paramagnetische Separation unter den hier entwickelten Isolierungsbedingungen aber ein interessanter Ansatz für die Zukunft sein.

### 6.2.2 Arretierung des Proteinmusters aus Zellkultur

Um das Proteinmuster aus Zellkultur zu erhalten wurde das folgende Protokoll anhand von Vorversuchen entwickelt: Die Zellen werden in der Zellkulturflasche in vorgewärmten 1\*PBS supplementiert mit (10mM NaN<sub>3</sub>, 5µg/ml Tc, 50 µg/ml Cm) flüssigem Stickstoff schockgefrostet. Durch das Schockfrostern in Zellkultur verlieren 80% der Listerien Ihre Vitalität, so dass nur noch 20% der Listerien potentiell vital bleiben und somit Ihr Proteinmuster sich verändern könnte.

Um nun eine etwaige restliche biologische Aktivität der ca. 20% vitalen Listerien zu unterbinden, werden dem Phosphatpuffer als Trägerlösung außer dem Natriumazid noch zwei weitere Inhibitoren des bakteriellen Wachstums, die Antibiotika Tetracyclin und Chloramphenicol, beigefügt. Tetracycline führen zu einer Hemmung der bakteriellen Proteinsynthese von grampositiven und gramnegativen Bakterien. Sie verhindern die Anlagerung von Aminoacyl-tRNA an die mRNA in der 30S Untereinheit des Bakterien Ribosoms und somit das Wachstum des Bakteriums. Chloramphenicol stellt ein Breitbandantibiotikum dar welches als Translationhemmer die Knüpfung der Peptidbindung blockiert, das heißt hemmend auf die Peptidyltransferase wirkt und somit die Bindung an die 50 S Untereinheit der bakteriellen Ribosomen unterbindet. Folglich wurde die Proteinsynthese bei der Aufreinigung der Listerien aus Zellkultur auf Ebene des Energiestoffwechsels (NaN<sub>3</sub>) der Proteinsynthese an der 30S Untereinheit der Ribosomen (Tetracyclin) und auf Ebene der Proteinsynthese an der 50S Untereinheit (Chloramphenicol) während der Isolierung inhibiert. Zusätzlich wurde ein zeitnahes Abstoppen der Proteinsynthese durch das Schockfrostern der kompletten Zellkulturflasche in Phosphatpuffer supplementiert mit den oben genannten Inhibitoren [10mM NaN<sub>3</sub>, 5 µg/µl Tc und 50 µg/ml Cm] gewährleistet.

Um zu überprüfen, ob die Methode das Proteinexpressionsmuster an sich beeinflusst, wurde ein Ansatz mit Listerien aus BHI Kultur den hier entwickelten Isolierungsbedingungen unterzogen. Das Proteinmuster erwies sich als gut vergleichbar mit dem einer ohne weitere Behandlung in BHI angezogenen Bakterienkultur (→ 5.3.2). Auffallend waren jedoch zwei große, neu aufgetretene Spots, die bei der simulierten Isolierungsmethode auftraten, welche nie zuvor auf *Listeria monocytogenes*-2D-Proteingelen aufgefallen waren. Natürlich bestand besonderes Interesse, diese neu aufgetreten Proteinspots zu identifizieren. Die Analyse mittels MALDI-TOF-MS identifizierte sie als Untereinheit L10 (Imo0250, *Listeria monocytogenes*). Offensichtlich wird bei Translationshemmung durch Tetracyclin/ Chloramphenicol entweder die Synthese dieses Proteins oder/ und seine Stabilität bzw. biologische Halbwertszeit gesteigert, eine Erklärung hierfür fehlt jedoch.

### **6.2.3 Aufreinigung der Listerien aus Zellkultur in J774-Makrophagen**

Unter der erfolgreichen Arretierung des Proteinpatterns während der Isolierung aus Zellkultur (→ 5.3.2), konnte *Listeria monocytogenes* EGDe aus 8 parallel infizierten Zellkulturflaschen mit J774-Makrophagen [→ 4.4.4] isoliert und deren Proteine aufgereinigt werden. Durch einen Waschschrift bei niedriger Geschwindigkeit wurde grober Zelldebris abgetrennt. Aus dem Überstand wurden die Listerien pelletiert und der Überstand verworfen. Restliche Zellrückstände wurden mit einem aus mehreren Detergentien zusammengesetzten Lysepuffer (RIPA-Puffer) entfernt[128]. Diese Gesamtzellproteine wurden nach dem laborintern etabliertem Protokoll für die Isolierung der Gesamtzellproteine aus Listerien isoliert [→ 4.2.1] und nach der im Labor etablierten Methode für die 2-D-Gelelektrophorese [→ 4.1.2] aufbereitet und isoliert. Aus 8 parallel infizierten Zellkulturflaschen konnten ca. 30-50 µg Proteine aus den Listerien gewonnen werden, welche noch für die Visualisierung in einem mit Silbernitrat gefärbtem 2-D-Polyacrylamidgel ausreichen (Nachweisgrenze 1 ng/ spot) ausreichen. Für diese Versuche wurde der Auftrag von 30 µg Protein je Gel gewählt.

### **6.3. Proteomische Analyse der Proteine von *Listeria monocytogenes* aus Infektionen von J774-Makrophagen**

Basierend auf der bei der Aufreinigung der Beads entwickelten Methode, das Proteinmuster aus Zellkultur während den Isolierungsschritten zu erhalten, gelang es erstmals Listerien direkt aus Zellkultur mittels selektiver Waschschriffe aufzureinigen und hierdurch eine ausreichende Menge an aufgereinigten Listerien-Proteinen für die Methode der 2-D-Elektrophorese zu isolieren.

Hierbei wurde ein Ansatz von Positiv- und Negativkontrollen eingeführt, um selektiv potentielle Virulenzproteine zu detektieren. Die erzielten Ergebnisse konnten diesen Versuchsansatz bestätigen. Im Anschluss daran wurden die regulierten Proteine welche zunächst durch visuelle Abschätzung ausgewertet wurden noch mit der Delta-2D Software von Decodon quantifiziert und die Resultate statistisch gesichert.

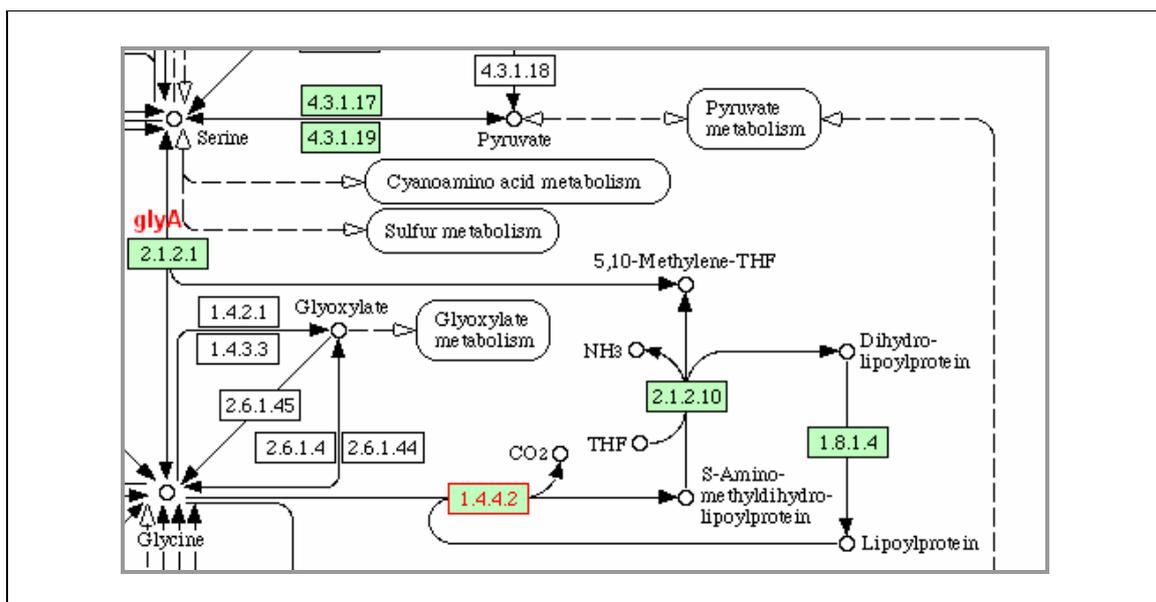
#### **6.3.1 Vergleich des Proteinmusters von in RPMI subkultivierten Listerien mit in BHI kultivierten Listerien („RPMI-Kontrolle“)**

Diese Kontrolle wurde durchgeführt, um den Einfluss des Zellkulturmediums RPMI-1640 und der Atmosphäre mit 5% CO<sub>2</sub> auf das Expressionsmuster von *Listeria monocytogenes* zu untersuchen. Hierfür wurden Listerien unter Zellkulturbedingungen in RPMI eine Stunde lang subkultiviert und anschließend den Isolierungsschritten für Listerien aus Zellkultur unterworfen (→ 4.2.3). In diesem Ansatz wurden diese in RPMI geshifteten Listerien mit in BHI kultivierten Listerien verglichen.

Bei der Auswertung dieser Kontrolle wurden die Gele mittels der Delta-2D-Software ausgewertet. Statistisch gesicherte Proteinregulationen sind in der Abbildung 10 (→ 5.4.1) dargestellt, wobei den Spots die anhand der Infektionsexperimente identifizierten Proteine, zugewiesen wurden. Diese Versuche wurden durchgeführt, weil die Listerien bei den Infektionsexperimenten zunächst in RPMI suspendiert vorliegen und erst im Zeitverlauf in die Wirtszelle gelangen. Mit dieser Kontrolle sollten also solche Proteine erfasst werden, welche schon bei der Überführung von BHI in RPMI in ihrer Expression verändert werden und gleichzeitig so stabil sind, dass

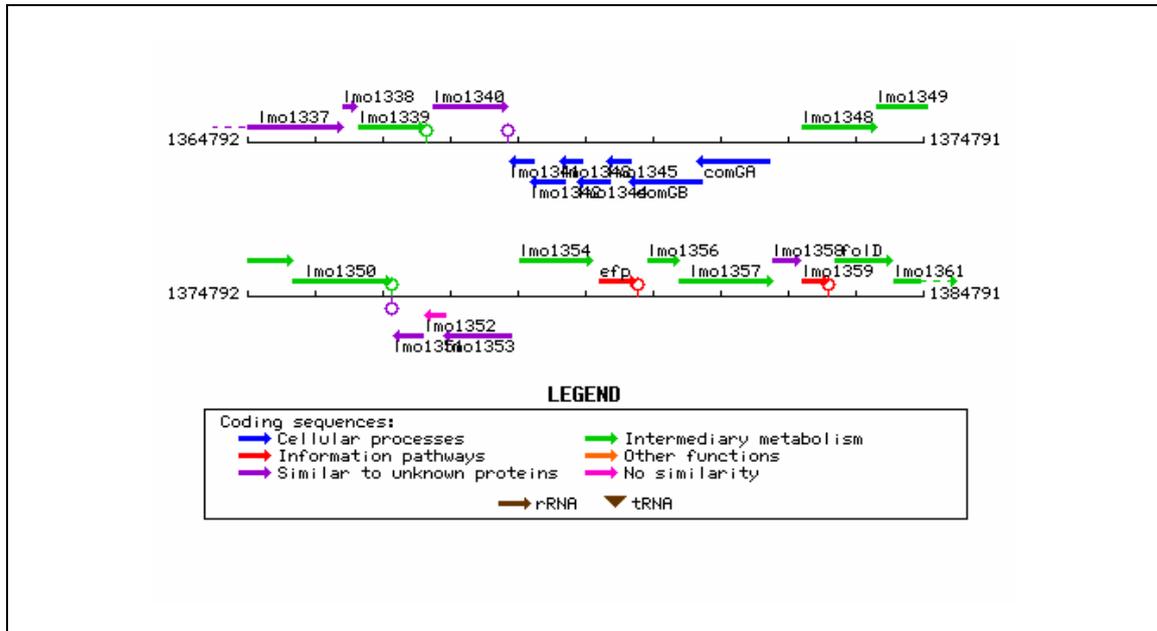
sie auch noch in der Wirtszelle als reguliert erscheinen, ohne dass dieser Effekt tatsächlich auf die Bedingungen in der Wirtszelle zurückgeht.

Die am stärksten regulierten Proteine in diesem Ansatz waren die Proteine Lmo1349 (4,68-fach reguliert) und Lmo1350 (8,0-fach reguliert), welche für die Glycin Dehydrogenase Untereinheiten 1 und 2 kodieren. Diese gehören zu dem „glycin cleavage system“, welches aus vier Untereinheiten besteht. Die hier regulierten Untereinheiten katalysieren die Decarboxylierung von Glycin (siehe untenstehendes Schema, Abb 14), welches für Lipoylprotein abhängige Reaktionen im Folat- und Pyruvat-Stoffwechsel essentiell ist. Wie nachstehend beschriebene weitere Experimente zeigen, sind die einzigen mit dieser Analyse methode identifizierten Proteine, welche beim Übergang von BHI in RPMI und auch beim Vergleich BHI zu Infektion erhöht erscheinen, sich jedoch von RPMI zu Infektion (d.h. beim Übertritt in die Wirtszelle) in der Menge nicht weiter verändern.



**Abb.14:** Beteiligung von Lmo1349 und Lmo1350 [hier: EC: 1.4.4.2] an dem Glycin, Serin und Threonin sowie am THF und Lipoylprotein-abhängigen Metabolismus  
<http://www.genome.jp/kegg/>

Vermutlich werden die beiden Gene auch gemeinsam transkribiert (siehe Abb. 15).



**Abb. 15.:** Genkarte lmo1349 und lmo 150  
<http://genolist.pasteur.fr/ListiList>

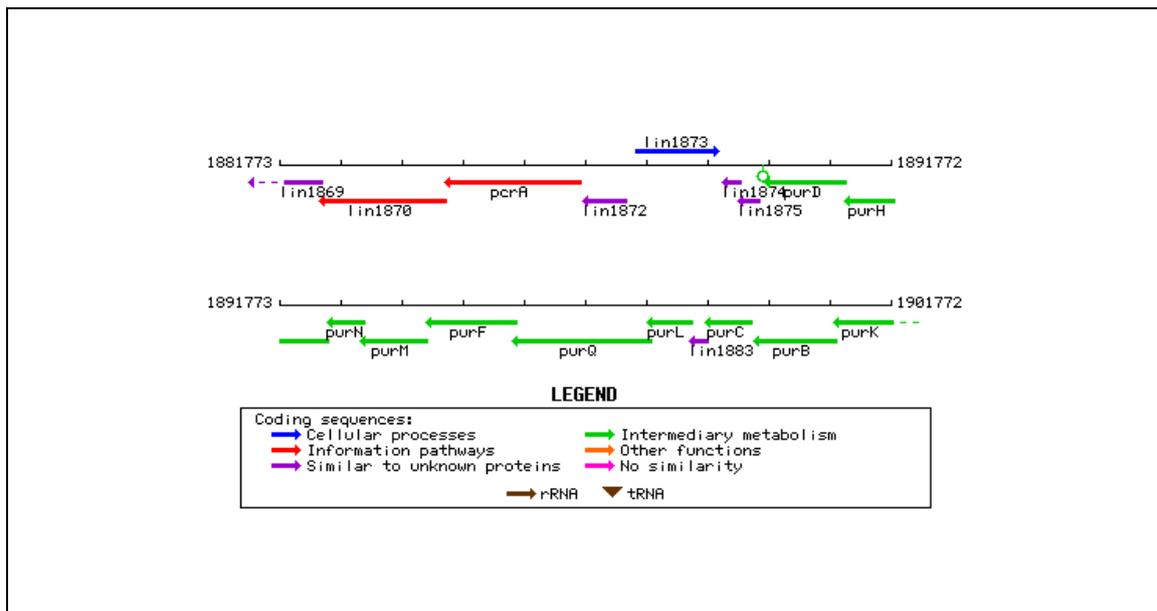
Besonders stark ist das durch Phosphatmangel induzierbare Protein zu PhoH homologe Protein (Lmo1467) hochreguliert. Dies ist insofern erstaunlich und im Moment nicht erklärbar, als in RPMI mit ca. 6 mM eigentlich ausreichen Phosphat vorhanden ist. Hierbei zeigt sich ein deutlicher Unterschied zu den transkriptomischen Analysen von Chatterjee et al. [20]. In den transkriptomischen Analysen war während der Replikation im Zytosol der Wirtszelle das Zweikomponentensystem *phoRP* (lmo2500-2501) reprimiert.

Ebenfalls stark induziert zeigte sich die Carboxyl- und Formyltransferase PurH (Lmo1765) sowie die Phosphoribosylaminoimidazole-Carboxylase PurK (Lmo1774). Neben einer Rolle im Folatstoffwechsel ist PurH zusammen mit PurK, an der Biosynthese von Purinen beteiligt (Abb.17). Da RPMI keine Nucleotide oder Nucleoside enthält, ist diese Hochregulierung leicht erklärlich.



## Diskussion

Dies scheint ein essentieller Vorgang unter Nährstoffmangel zu sein, da ebenso *purK* induziert ist. Interessanterweise befinden sich die Gene *purK* und *purH* am Anfang und Ende eines 10 Gene umfassenden Operons, jedoch war keine translationale Hochregulierung der übrigen Enzyme dieses Biosyntheseweges zu beobachten. Die Organisation im Operon lässt dennoch darauf schließen, dass noch weitere Proteine aktiv sind (siehe Abb. 18). Somit scheint dies ein essentieller Weg der Adaptation an Veränderungen im Nährstoffangebot bei *Listeria* zu sein.



**Abb. 18.:** Genkarte *purH* und *purK*  
<http://genolist.pasteur.fr/ListiList>

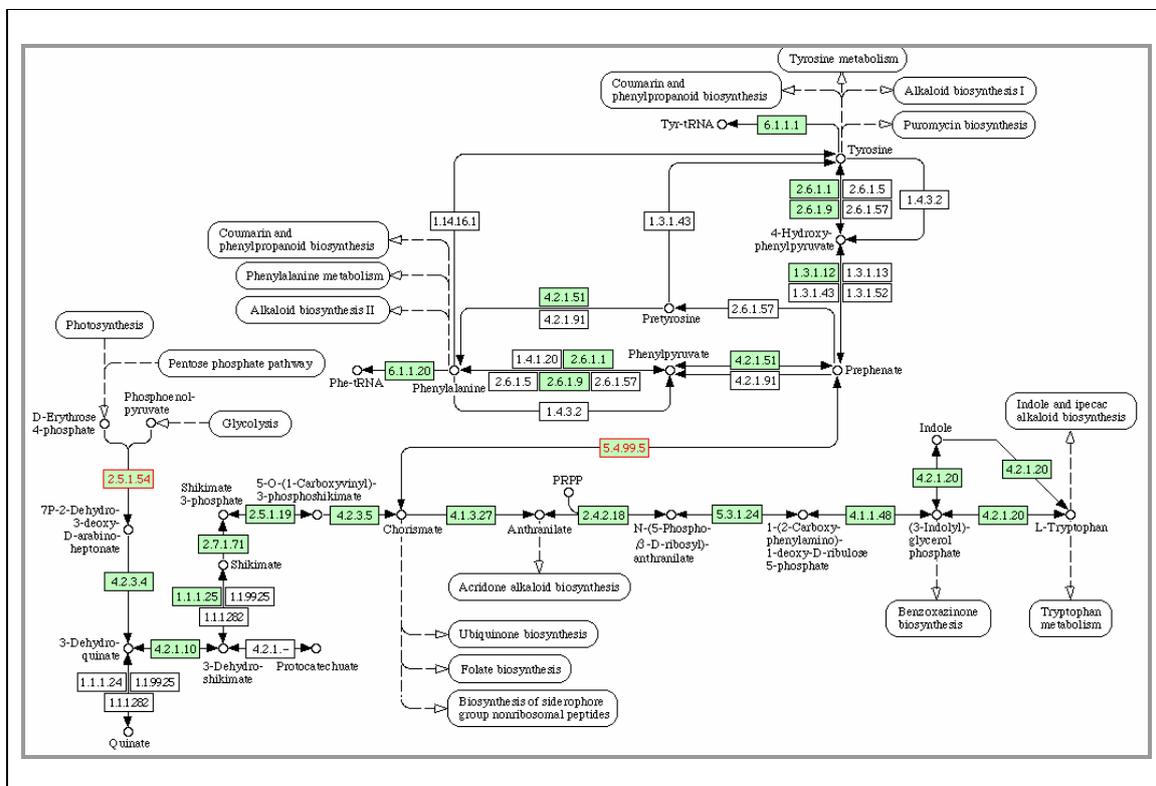
Für die Pur Proteinfamilie ist eine Induktion intrazellulär in *Listeria* bekannt [82]. Ein weiterer Hinweis auf eine Beteiligung am Virulenzgeschehen stellt das Vorkommen der Pur Proteine im Überstand dar [155]. Somit scheint PurH sowohl für die Anpassung an veränderte Nährstoffbedingungen als auch für das Virulenzgeschehen wichtig zu sein. In diesem Falle greift der Versuchsansatz nur bedingt als Negativkontrolle.

Für *purD*, *purH* und *pyrE* war schon früher eine transkriptionelle Induktion nach Infektion von Säugerzellen beschrieben worden [82]. Hier wurde nun für PurH und PurK eine erhöhte Proteinmenge bereits nach Überführung von BHI in RPMI gezeigt, welche intrazellulär nicht weiter zunahm.

Interessanterweise ist die Uracil-Phosphoribosyltransferase Upp (Lmo2538), welche UMP bereitstellen kann, in RPMI in geringerer Menge vorhanden.

Als weiteres Protein des Intermediärstoffwechsels zeigt sich AroA induziert. AroA ist an der Synthese von Phenylalanine, Tyrosin und Tryptophan beteiligt. Für AroA Deletionsmutanten ist eine  $10^4$ -fache Attenuierung der letalen Dosis in BALB/c Mäusen bekannt [147]. Die in Zellkultur beobachtete Replikationsdauer war im Vergleich zum Wildtyp verdoppelt. Somit können auch Virulenz-assoziierte Gene eine relativ starke Attenuierung verursachen.

Erstaunlicherweise zeigte sich in dem Hauptexperiment von Infektionen im Vergleich zu Listerien aus BHI-Kultur die Induktion von AroA als nicht mehr signifikant (1,5-fach). In der Infektionskontrolle war analog hierzu keine positive Regulation mehr zu erkennen.

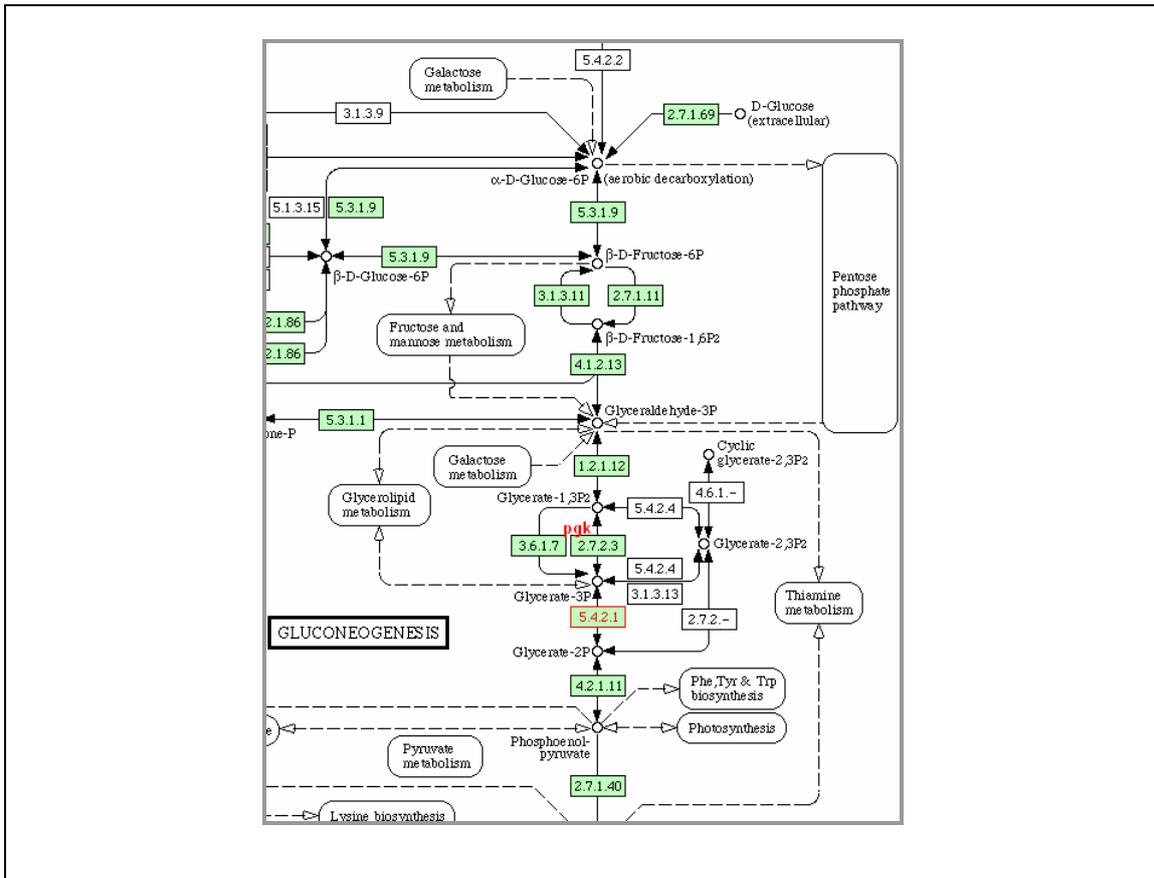


**Abb.19:** Beteiligung von AroA (Lmo1600) [hier: EC: 2.5.1.54] und [EC: 5.4.99.5] am Phenylalanine, Tyrosin und Tryptophan Stoffwechsel.  
<http://www.genome.jp/kegg/>

Als weiterer Hinweis auf die Beteiligung der Aminosäuresynthese ist die Serin Hydroxymethyltransferase Lmo2539 (GlyA) induziert. Diese vermittelt (siehe Abb.: 14) die Synthese von Serin aus Glycin. Zusätzlich ist die Serin Hydroxymethyltransferase, wie auch PurH, am Folsäure-Stoffwechsel (siehe Abb.17) beteiligt.

Auch hier ist diese Regulation in der Infektionskontrolle nicht mehr nachweisbar, wohl aber im Vergleich „BHI-Kultur zu Infektionen“. Somit scheint es sich hier um einen spezifischen Unterschied zu Versuchen in BHI-Medium zu handeln. Dies ist insofern erstaunlich, da RPMI über alle notwendigen Aminosäuren verfügt und dennoch zu BHI eine starke positive Regulation des Aminosäurenstoffwechsels vor allem in Bezug auf Glycin stattfindet. Da es sich hier um keinen absoluten Mangel handeln kann, scheint es sich um einen relativen Unterschied des Nährstoffangebotes zwischen BHI und RPMI zu handeln.

Die Induktion der Phosphoglucерomutase Lmo2205 deutet auf eine Induktion der Glukolyse hin. Aus Infektionsexperimenten war bekannt, dass die Enzyme der Glucolyse intrazellulär in der Transkription reprimiert sind und Glucose vor allem über den Pentosephosphatzyklus verwertet wird [80]. Die Induktion der Phosphoglyceromutase (Pgm) Lmo2205 in RPMI könnte auf eine Induktion der Glukolyse hindeuten. Jedoch wurde keine Erhöhung der anderen Glukolyseenzyme gefunden. Eine Induktion von Lmo2205 ist aus Proteinanalysen unter Glucosemangel im Kulturmedium bekannt [72]. Dies kann als Steigerung der Gluconeogenese gedeutet werden. Da in diesem Falle das RPMI Medium jedoch über Glucose verfügt, scheidet diese Erklärung aus, vielmehr hängt der Effekt vermutlich mit der schon beschriebenen Steigerung des Aminosäurestoffwechsels zusammen, da Pgm 2-Phosphoglycerat für die Synthese von Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan liefern könnte (Abb.20).



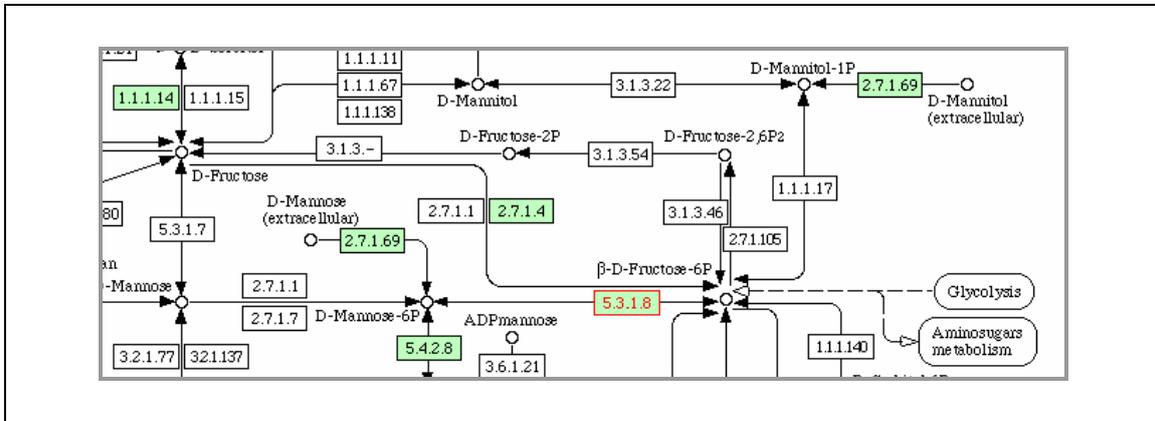
**Abb. 20:** Beteiligung von Lmo2205 [hier EC: 5.4.2.1.] an der Glukolyse bzw. Aminosärestoffwechsel  
<http://www.genome.jp/kegg/>

In diesem Zusammenhang ist auch die Induktion eines Monosaccharid-ABC Transporters Lmo2372 (ATP-bindendes Protein) interessant, dessen Substrat allerdings nicht bekannt ist. Dieser ist aber in den Infektionsexperimenten nicht induziert.

Als deutlich reprimiertes Protein unter den Kulturbedingungen in RPMI-Zellkulturmedium finden sich die beiden Spots (Isoformen) des S2 Proteins der 30S Untereinheit der Ribosomen. Ebenso ist der Elongationsfaktor EF-Tu (Lmo2653, Tuf) praktisch nicht mehr nachweisbar, das heißt die Proteinsynthese wird offenbar deutlich gedrosselt, was mit der Beobachtung übereinstimmt, dass es in RPMI kaum zu einer Bakterienvermehrung kommt.

Übereinstimmend mit einer Reprimierung der Glukolyse wird (siehe Abb.20) die Phosphoglycerat-Kinase (Pfk; Lmo2458) reprimiert. Als weiteres Enzym des Zuckermetabolismus ist die Mannose-6-Phosphat-Isomerase (Lmo2110) induziert,

welche Fructose-6-Phosphat (aus der Glukolyse) zu Mannose-6-Phosphat isomerisiert.



**Abb.21:** Beteiligung von Lmo2110 [hier EC. 5.3.1.8] an dem Mannosestoffwechsel  
<http://www.genome.jp/kegg/>

Interessanterweise ist auch Dipeptidyl-Prolyl-Isomerase Lmo2376, ein Enzym welches als allgemeines Stressprotein an der Reparatur und Neufaltung von Proteinen beteiligt ist, induziert. Lmo2376 wurde in Biofilmen bei Gegenwart von Glucose als induziert vorgefunden [72]. Die Bedeutung der hier in RPMI beobachteten Erhöhung ist unklar.

### 6.3.2 Vergleich des Proteinmusters von in BHI kultivierten mit in J774-Makrophagen gewachsenen Listerien

In den folgenden Versuchen wurden die Gesamtzellproteine von *Listeria monocytogenes*, welche nach der in dieser Arbeit neu entwickelten Methode (→ 4.2.1) isoliert wurden mit in BHI gewachsenen Listerien verglichen.

Bei der Auswertung der Delta 2D-Software wurden jeweils drei 2-D-Gele der Listerien aus drei unabhängigen Infektionen sowie aus drei unabhängig isolierten Kontrollen verrechnet. Bei ausreichenden Daten konnten statistisch signifikante Werte anhand des Students-t-Tests bezüglich der Verteilung eines Spots in allen Referenzgelen zugewiesen werden.

Im Unterschied zur RPMI-Kontrolle traten hier Induktionen von Oberflächenproteinen auf. Dies gilt für GgaB (Lmo1080; homolog zu einem Teichonsäure-Biosynthese

Protein von *Bacillus subtilis*), welches auch in *Listeria* vermutlich die Teichonsäurebiosynthese vermittelt. Dieses oberflächengebundene Teichonsäure-Biosynthese-Protein ist im Überstand von *Listeria* zu finden [155]. Für die Teichonsäuren ist eine maßgebliche Beteiligung an der Virulenz bekannt welche durch einen 4log-fachen Anstieg der LD<sub>50</sub>, einer *dltA* Deletionsmutante, im Mausmodell untermauert wird [1]. DltA katalysiert den Einbau von D-Alanin in die Lipoteichonsäure. Des Weiteren wurde für Teichonsäuren eine Assoziation mit InIB [79] und eine Rolle bei der Adhäsion von *Staphylococcus aureus* [75] nachgewiesen.

Interessanterweise wurde Lmo1080 in den proteomischen Analysen in zwei unterschiedlichen Modifikationen an zwei unterschiedlichen isoelektrischen Punkten als induziert nachgewiesen. Dies deutet darauf hin, dass posttranslationale Modifikationen eventuell eine Rolle für dieses Protein spielen und dieses vielleicht durch Phosphorylierungen aktiviert werden muss. Weiterhin ist interessant, dass in der Infektionskontrolle dieses Lmo1080 ebenfalls induziert vorliegt wodurch die Rolle als stark aktives Protein unter Infektionsbedingungen nochmals belegt wird. In Anbetracht der starken Attenuierung der Teichonsäure defizienten Mutanten wäre eine weitere Untersuchung der Teichonsäure Biosynthese von großem Interesse.

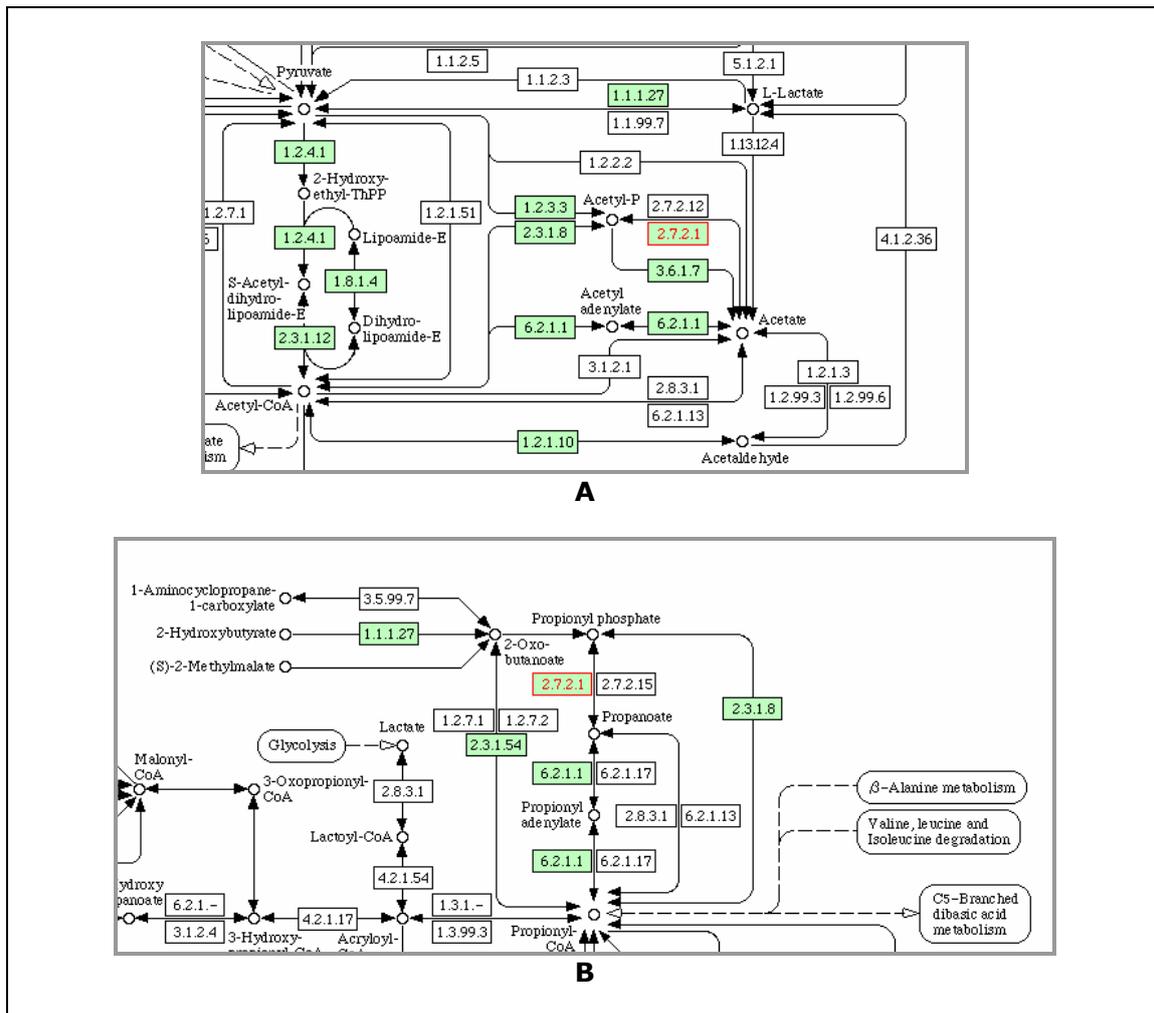
Als weiteres Protein der Zelloberfläche wurde Lmo2754 (Penicillin-bindendes Protein 5) induziert identifiziert. Auch dieses Lmo2754, welches über ein GW-Modul verfügt, konnte im Überstand von *Listeria monocytogenes* gefunden werden [155]. Für Mutanten von Lmo2754 konnte ein ca. 1log-facher Defekt sowohl in Zellkultur in C2Bbe1 Zellen als auch in der Milz im Mausmodell festgestellt werden [63]. Interessant ist auch, dass Lmo2754 im Vergleich zu den anderen PBPs in *Listeria* hoch konserviert ist und ihm somit eine wichtige Bedeutung zukommt [65]. Es gibt 5 Penicillin Binding Proteins (PBP) in *Listeria monocytogenes*, welche für den Aufbau von Peptidoglycan und die Vernetzung der Peptide verantwortlich sind. Für eine Lmo 2754-Deletionsmutante ist bekannt, dass diese eine dickere Zellwand ausbildet [89]. In *E.coli* ist für PBP5 Mutanten ein aberranter Phänotyp bekannt, welcher sich in veränderten Zelldurchmessern und starker Verzweigung der Zellen manifestiert [114, 115]. In *Listeria* scheint dies durch eine andere D-Carboxypeptidase kompensiert zu werden. Es ist zu vermuten, dass *Listeria* unter Infektionsbedingungen seine Zellwand den osmotischen Veränderungen anpasst. Eine besonders starke Regulation von Lmo2754 in der Infektionskontrolle legt nahe, dass dieses Protein auf allerdings noch unbekannt Weise am Infektionsgeschehen beteiligt ist. Interessanterweise wurden weder Lmo1080 noch Lmo2754 in den Transkriptom-Analysen als reguliert identifiziert.

Im Gegensatz zur RPMI-Kontrolle sind die Clp Proteasen ClpP (Lmo2468) und Lmo1138 induziert, welche durch Stress aktiviert werden. Für die ClpB, ClpC, ClpE und ClpP konnte in *Listeria monocytogenes* bereits eine Beteiligung an der Virulenz nachgewiesen werden. Eine ClpB Deletionsmutante zeigte sich im Mausmodell als 100-fach attenuiert im Vergleich zum Wildtyp. Interessanterweise wird ClpB nicht durch Stress induziert werden außer durch einen Hitzeschock. ClpB konnte in der Infektionskontrolle (Siehe 6.3.3) als statistisch signifikant positiv reguliert werden ist aber auch in diesem Versuchsansatz als induziert zu erkennen. ClpC wird für das intrazelluläre Wachstum und das in vivo Überleben im Wirtsgewebe durch Förderung des frühzeitigen Entkommens aus dem Phagosom benötigt [136, 137] und ist ebenso notwendig für die Adhäsion und Invasion [113]. Die ClpE ATPase spielt eine Rolle in der Virulenz von *L. monocytogenes* [112].

Für die ClpP-Deletionsmutante wurde eine stark verringerte Replikation in Makrophagen festgestellt, wobei dies durch eine Reduktion von LLO und eine verringerte Aktin Polymerisation verursacht sein könnte [47]. Interessanterweise wird ClpP auch durch Glucosemangel induziert [72]. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass die Listerien in Infektion eine Art Stressantwort durchlaufen, auch wenn dies nicht im klassischen Sinn für ClpB der Fall ist. Ein weiterer Hinweis auf eine zusätzliche Rolle der Clps außer der klassischen Stressantwort ist die Induktion von Lmo1138, welches homolog zu den Clps ist aber für das noch keine Induktion durch Stress nachweisbar ist. Folglich scheinen die proteolytischen Systeme außer den Reparaturmechanismen auch die Aktivität von Proteinen zu steuern, wie das Beispiel von ClpP zeigt.

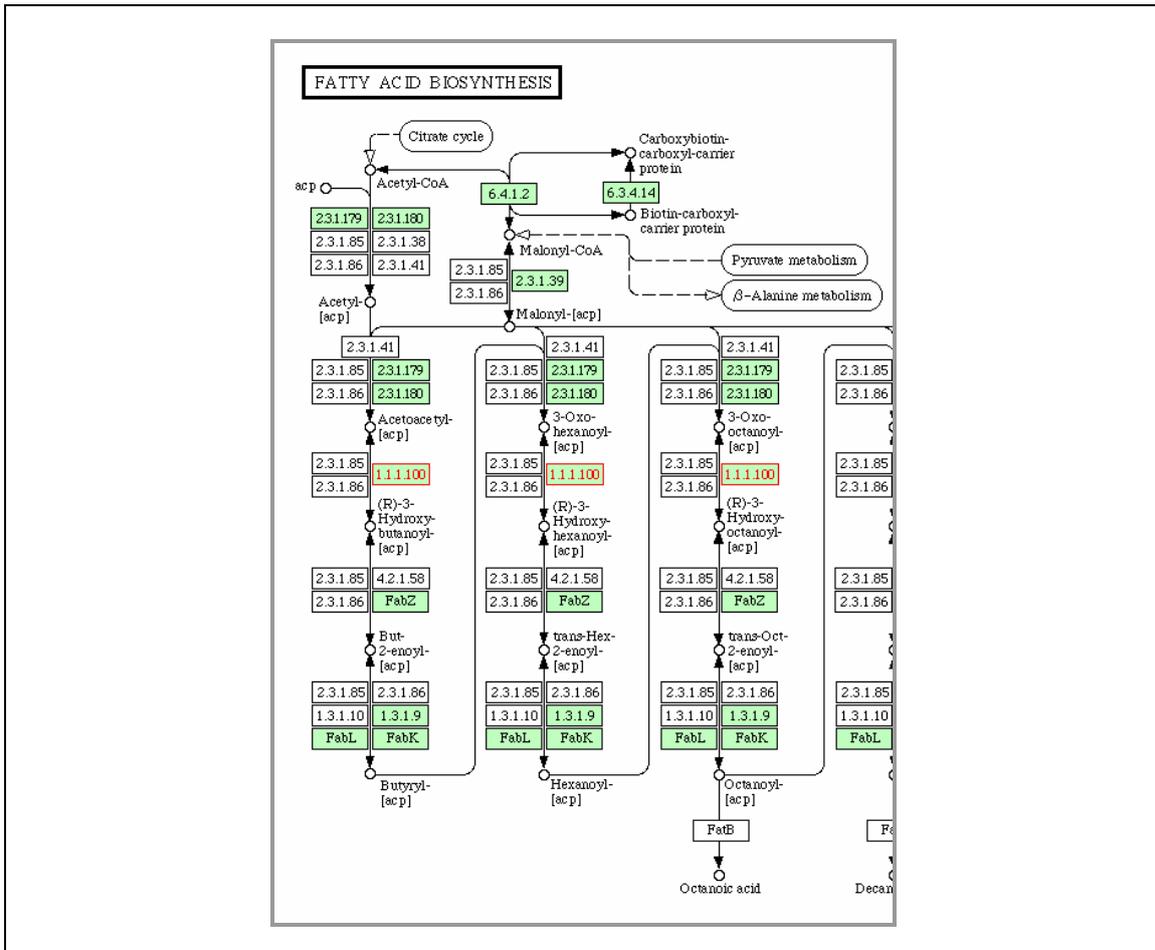
Auch wenn es sich bei dieser Regulation um eine Minderheit der Proteine handelt, so betrifft es vorwiegend die Schlüssel-Regulatoren der Stressantwort, des Zellzyklus und der Differenzierung, was auf einen größeren Einfluss auf die zelluläre Regulation hinweist [73]. In diesem Zusammenhang wäre eine Untersuchung der Beteiligung von Lmo1138 an der Virulenz von *Listeria* von großem Interesse.

Einen weiteren Unterschied zur RPMI-Kontrolle stellt die Induktion der Proteine AckA (Lmo1581), FabG (Lmo1807) und BirA (Lmo1904) dar. Die Acetat-Kinase AckA katalysiert im Pyruvatstoffwechsel die Dephosphorylierung von Acetyl-Phosphat, wobei ATP regeneriert wird.



**Abb.22:** Beteiligung von AckA (Lmo1581) [hier EC: 2.7.2.1] am:  
**A** Pyruvatstoffwechsel  
**B** Propionat Stoffwechsel;  
<http://www.genome.jp/kegg/>

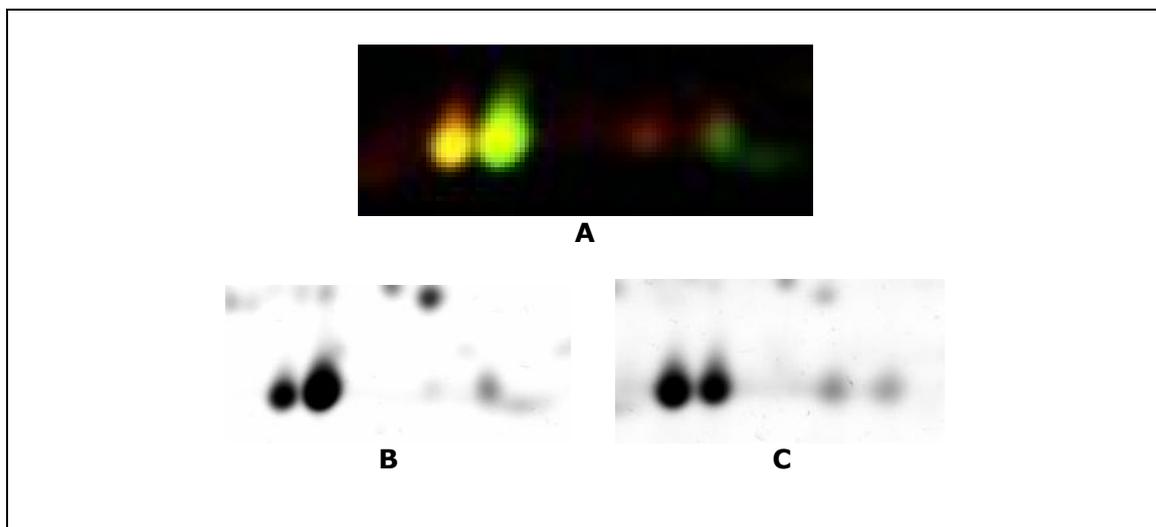
FabG katalysiert anabole Stoffwechselreaktionen. BirA vermittelt die Aktivierung von Acetyl-CoA über Biotin als Coenzym und somit ebenso anabole Stoffwechselreaktionen. Die Induktion von FabG deutet auf eine Induktion der Fettsäuresynthese hin. Lipide stellen einen wesentlichen Bestandteil der Cytoplasmamembranen dar, was darauf schließen lässt, dass sich *Listeria* den intrazellulären Bedingungen durch eine Anpassung der Flexibilität seiner Zellmembranen anpasst. Im Gegensatz dazu konnte in den transkriptomischen Analysen keine Induktion sondern sogar eine Repression der Fettsäuresynthese festgestellt werden [20]. Die starke Expressierung von FabG deutet auf einen essentiellen intrazellulären Anpassungsmechanismus hin. Ein weiterer Hinweis darauf ist die Induktion von FabG in der Infektionskontrolle.



**Abb. 23:** Beteiligung von FabG (Lmo1807) [hier EC: 1.1.1.100] an der Fettsäurebiosynthese  
<http://www.genome.jp/kegg/>

Interessanterweise ist auch PdhD, eine Untereinheit der Pyruvatdehydrogenase (PDH), induziert, welche ein Schlüsselenzym des Pyruvatstoffwechsels darstellt. Die Pyruvat-Dehydrogenase katalysiert die oxidative Decarboxylierung von Pyruvat zu Acetyl-CoA und CO<sub>2</sub>. Dies ist für *Listeria* besonders wichtig, da dieses Bakterium aufgrund seines inkompletten Citratcyklus Acetyl-CoA zur Auffüllung des Zyklus benötigt (Abb.24). Die Pyruvat-Dehydrogenase stellt einen Multienzymkomplex dar, wobei PdhD die E3-Untereinheit darstellt, die Dihydroliponamide Dehydrogenase. Diese reoxidiert nach der Aktivierung von Acetyl-CoA das Dihydroliponat zu Liponat. Der Anstieg von PdhD weist auf eine Induktion von anabolen Stoffwechselreaktionen hin, wobei PdhD auch über den Citratcyklus, an der Biosynthese von Glutamat, Arginin, Prolin und auch Glutathion beteiligt ist. Letzteres ist insofern bedeutend, da die Thioredoxin-Reduktase TrxB (Lmo2478) absinkt, ein daraus resultierender Mangel an reduziertem Thioredoxin könnte durch gesteigerte Glutathionsynthese ausgeglichen werden.

Obwohl PdhA an der Glukolyse beteiligt ist, konnte hier eine Besonderheit für diese Untereinheit der Pyruvat Dehydrogenase festgestellt werden. In den hier durchgeführten proteomischen Analysen konnten insgesamt drei Isoformen der PDH mit gleichem Molekulargewicht aber unterschiedlichem isoelektrischen Punkt identifiziert werden. Hierbei konnte für zwei der Isoformen eine Art „Shift“ festgestellt werden, das heißt, ein Spot erscheint stärker, der andere dafür aber schwächer, wobei hier nur der schwächere als statistisch signifikant erscheint. Somit bleibt fraglich, ob die absolute Menge des Proteins zu- oder abnimmt. Dies könnte aber ein Hinweis auf eine posttranslationale Modifikation, welche intrazellulär von Bedeutung ist hinweisen. Eventuell handelt es sich dabei um noch gebundenes Thiaminpyrophosphat (TPP), welches an der Reaktion der E1 Untereinheit beteiligt ist. Möglicherweise kommt es durch einen Thiaminmangel, welches als Coenzym fungiert zu einer Abnahme der aktiven Proteineinheiten und einer Zunahme der inaktiven Formen ohne Thiaminpyrophosphat. Die Bindung von stark negativ geladenen Phosphaten würde einen Shift der Isoform zu einem alkalischeren isoelektrischen Punkt verursachen. Diese putative Isoform nimmt hier analog dazu ab, was eine Phosphorylierung (wie in TPP vorhanden) als Ursache des Shiftes möglich macht. Die dritte induzierte Isoform, welche auf Abbildung 27 A als roter Spot weiter rechts der beiden stärker exprimierten Isoformen erscheint, konnte als statistisch signifikant in der Infektions-Kontrolle an dem alkalischeren isoelektrischen Punkt identifiziert werden, was auf eine Bedeutung von Modifikationen dieser E1-Untereinheit der PDH intrazellulär hinweist.



**Abb. 27:** Isoformen der PdhA (Lmo1552)

**A** Vergleich des Proteinmusters mittels Delta-2D Software von in BHI gewachsenen *Listeria monocytogenes* (B) mit aus Infektionen in Makrophagen isolierten *Listeria monocytogenes*(C).

**B** 2-D Proteingel mit Proteinen aus in BHI kultivierten Listerien isoliert aus Infektionen  
**C** 2-D-Proteingel mit Proteinen aus Listerien isoliert aus Infektionen in Makrophagen.

Bemerkenswert ist, dass für einen durch die Lipoate Ligase LplA1 verursachten Defekt der Pdh E2 Untereinheit ein Defekt der intrazellulären Replikation beobachtet wurde. Dieser Defekt wurde durch das Fehlen einer Lipoat-Modifikation des E2 Enzyms verursacht. Die entsprechenden LplA1 Deletionsmutanten zeigten sich im Mausmodell um den Faktor 300 attenuiert. Zudem konnte eine Induktion von PdhB unter Glucosemangel [72], eine Induktion von PdhA und PdhD unter Salzstress [37, 38] und eine Induktion von PdhD in der stationären Wachstumsphase von *Listeria monocytogenes* [43] nachgewiesen werden.

Erstaunlicherweise wurde das *pdhABC* Operon (lmo1052-1054) in Transkriptionsanalysen intrazellulär reprimiert vorgefunden [20]. In diesen Untersuchungen wurden in der Infektionskontrolle sowohl die PdhA als auch die PdhD Untereinheit induziert vorgefunden. Dies deutet auf eine Virulenz-Assoziation der Pyruvat Dehydrogenase hin.



Auffällig ist die hier stark erhöhte Menge der Polynucleotid-Phosphorylase PnpA (Lmo1331). Die in vivo Rolle dieses RNA-abbauenden Enzyms ist kontrovers, es scheint aber vor allem an der posttranskriptionellen Regulation von mRNAs beteiligt zu sein. Da für Pnp auch in der Infektionskontrolle eine starke Induktion nachgewiesen werden konnte, scheint dieser Vorgang essentiell für *Listeria monocytogenes* unter Infektionsbedingungen zu sein.

Ebenso wie bei der RPMI-Kontrolle waren auch hier das Enzym der Purinbiosynthese PurH mengenmäßig erhöht sowie zusätzlich die Transferase Cmk (Lmo1939), welche Phosphat von ATP auf Nucleotidmonophosphate, vor allem CMP, überträgt. Dies zeigt eine allgemeine Hochregulierung der Nucleotidbiosynthese an.

In Übereinstimmung mit den transkriptomischen Analysen findet sich auch hier die Induktion eines ATP-bindenden Proteins eines ABC-Transporters (Lmo2372), dessen Substrat nicht bekannt ist.

Wie bereits in der RPMI-Kontrolle identifiziert findet sich hier Lmo2205, die Phosphoglyceratmutase induziert, welche bereits unter Glucosemangel als induziert vorgefunden wurde [72]. Hier handelt es sich um einen Sonderfall, da Lmo2205 hier sowohl in der Infektions- als auch in der RPMI-Kontrolle als induziert nachgewiesen werden konnte. Da Phosphoglyceratmutase sowohl bei der Glucoseverwertung als auch bei der Gluconeogenese eine Rolle spielt (Abb.20), könnte dies eine Anpassung an wechselnde Glucosekonzentrationen widerspiegeln.

Ebenso wie in der RPMI-Kontrolle (siehe 6.5) finden sich hier die Enzyme des Glycinmetabolismus induziert (Lmo 1349, Lmo1350 und Lmo2539=glyA). Dies weist darauf hin, dass Glycin-Abbau wichtig ist, die genaue Rolle ist jedoch unklar.

Als stark reprimierte Proteine zeigen sich die ribosomale Untereinheit RpsB (Lmo1658) und der Elongationsfaktor EF-Tu (Lmo2653, Tuf). Beide sind in den Infektionen kaum noch nachzuweisen. Dies ist erstaunlich, da *L. monocytogenes* intrazellulär mit einer Rate repliziert, welche der in BHI vergleichbar ist. Da also die Proteinbiosynthese allgemein offensichtlich nicht beeinträchtigt ist, ist die beobachtete Mengenabnahme nicht erklärlich, möglicherweise handelt es sich um einen speziellen Artefakt.

Ebenso wie in den Transkriptionsanalysen zeigen sich auch hier PfkA (Lmo1571) [siehe Abb. 25], Pgi (Lmo2367) [siehe Abb. 25] und FruB (Lmo2336) [siehe Abb. 26] als Enzyme der Glukolyse reprimiert.

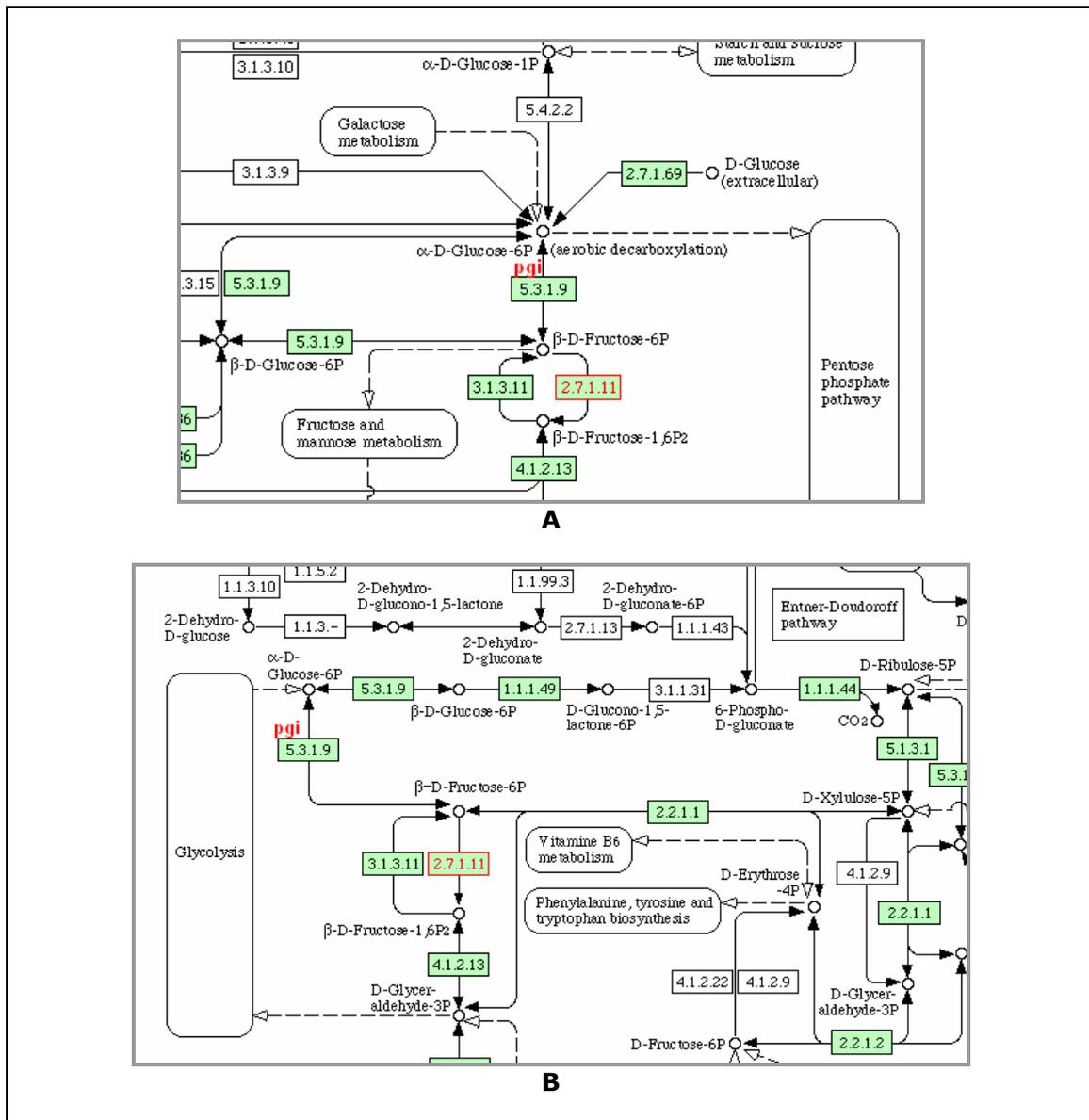


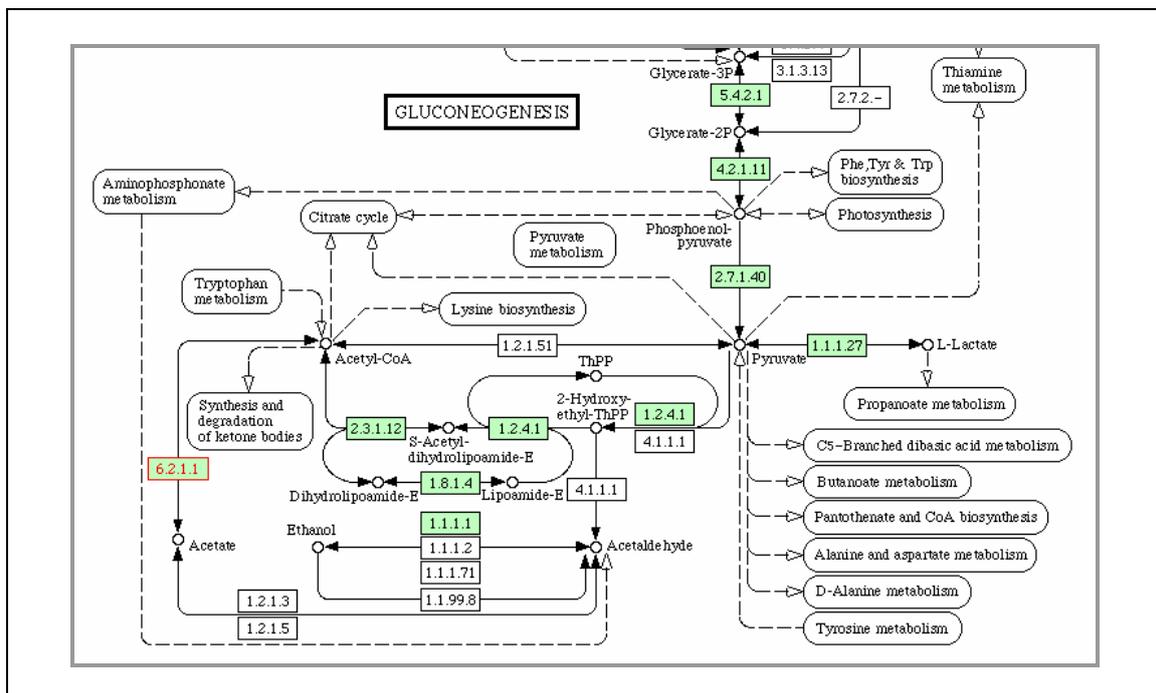
Abb. 25: Beteiligung von Pfk (Lmo1571) [hier EC: 2.7.1.11] und Pgi (Lmo2367) hier [EC: 5.3.1.9] am:

A Glycolyse

B Pentose Phosphat Zyklus

<http://www.genome.jp/kegg/>





**Abb. 27:** Beteiligung von Lmo2720 [hier EC 6.2.1.1] an der Gluconeogenese.  
<http://www.genome.jp/kegg/>

Des Weiteren weist eine Reprimierung von GpsA (Lmo1936) auf eine Inhibierung der Synthese von Glycerophospholipiden. Dies ist ein Hinweis darauf, dass spezifische Stoffwechselreaktionen reduziert werden, die anabolen Hauptstoffwechselwege jedoch aktiviert werden.

Die Reprimierung der Cystein Synthase CysK (Lmo0223) ist deshalb erstaunlich, weil *Listeria* aufgrund des Fehlens einer Sulfatreduktase Cystein nicht synthetisieren kann, so dass der Sinn einer Regulation völlig unklar ist. Bemerkenswerterweise konnte CysK auch im Überstand von *Listeria monocytogenes* nachgewiesen werden [155]. Für CysK ist eine Induktion durch Salzstress [37] und Kälteschock in *Leuconostoc* [138] bekannt.

Einen weiteren Hinweis auf eine Anpassung der Zellwand liefert die Reprimierung der Murein-Ligase MurC (Lmo1605). Diese scheint sich den osmotischen Veränderungen durch eine geringere Produktion von Peptidoglykan anzupassen.

Entsprechend der RPMI-Kontrolle ist die Dipeptidyl-Prolyl-Isomerase Lmo2376 induziert. Dies kann dadurch erklärt werden, dass es sich um ein allgemeines

Stressprotein handelt, welches an der Reparatur und der Faltung der Proteine beteiligt ist [72].

Insgesamt fällt auf, dass etwa ein Viertel der hier regulierten Proteine sich im Überstand von *Listeria monocytogenes* nachweisen ließen (9/ 38) [155]. Darunter PurH und PurK, TufA, CysK, PfkA, EF-Tu, Lmo1080 (beteiligt an der Teichonsäure-Biosynthese, Lmo2754 (penicillin binding protein 5). Auch PdhD konnte im Überstand von *Listeria innocua* gefunden werden. Da es sich hier um typische cytoplasmatische Proteine handelt, welche jedoch in relativ großer Menge vorkommen, wurde zunächst vermutet, dass diese durch Zellyse im Sekretom erscheinen. Da es aber bereits Hinweise über eine gezielte Sekretion von Listeria-Proteinen ohne Signalpeptid gibt [96, 97], vermuteten Trost et.al. [155], dass diese Proteine eventuell auch ohne ein Signalpeptid über den SecA2 Sekretionsmechanismus [28] an die Zelloberfläche transportiert werden. Dies könnte einen Hinweis darauf liefern, dass auch vermeintliche Stoffwechsellzyme direkt an dem Virulenzgeschehen und damit an Interaktionen mit der Wirtszelle beteiligt sind. Diese Annahme wird durch die hier durchgeführten proteomischen Analysen von *Listeria monocytogenes* in Infektionen von J774-Makrophagen unterstützt.

### **6.3.3 Vergleich des Proteinmusters von *Listeria monocytogenes* aus Zwischenkultur in RPMI mit *Listeria* aus Infektionen in J774-Makrophagen („Infektionskontrolle“)**

Diese Kontrolle bestätigt die Mehrheit der im Hauptversuch (→6.3.2) gefundenen Regulationen. Dennoch konnten einige weitere regulierte Proteine identifiziert werden, welche eventuell nur in diesem Versuchsansatz darstellbar sind. Die Vermutung liegt nahe, dass sich die Stoffwechsellage nach Zwischenkultur in RPMI welches eine Annäherung an die Bedingungen in Zellkultur darstellt besser vergleichbar mit den Infektionen ist, so dass auch feinere Unterschiede zutage treten können. Auffällig ist, dass hier positive Regulationen welche sowohl in der RPMI-Kontrolle als auch in dem Vergleich von BHI zu Infektionen gefunden wurden, nicht mehr nachgewiesen werden können. Dies ist der Fall für Lmo1349, Lmo1350, PurH und GlyA. Somit scheinen diese Proteine vor allem durch den großen Unterschied der Nährstoffdichte in diesen Versuchsansätzen als induziert zu erscheinen, was jedoch eine Rolle bei der intrazellulären Replikation und damit Virulenz nicht grundsätzlich ausschließt.

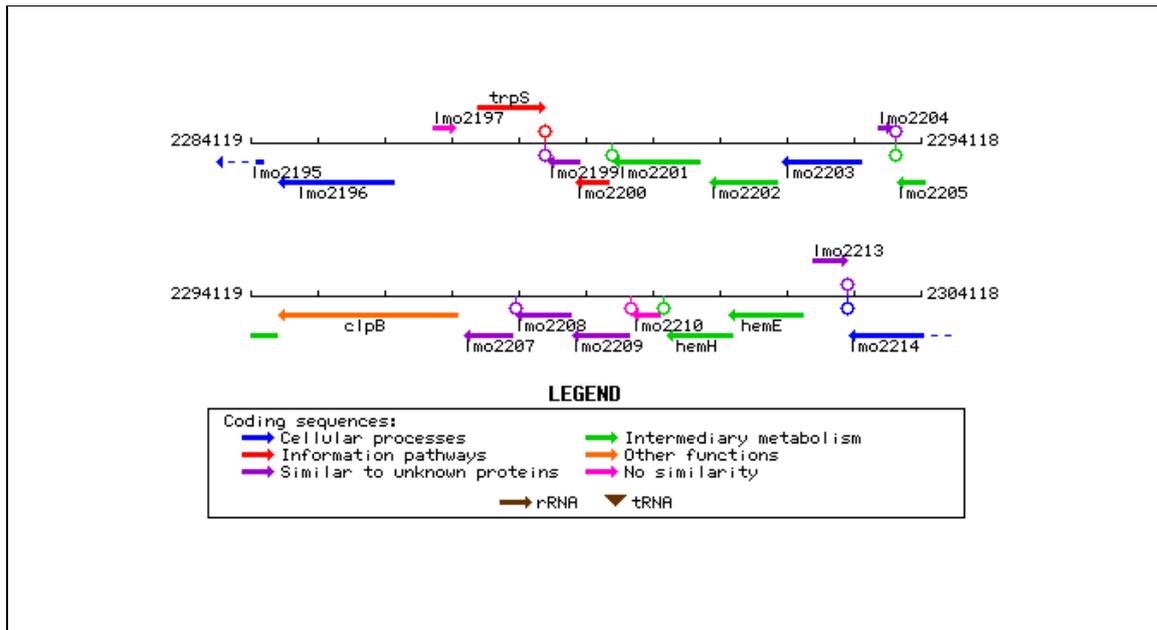
Übereinstimmend mit der schon diskutierten Bedeutung des Pyruvatstoffwechsels konnte in diesem Versuchsansatz die induzierte Isoform der beiden Pyruvat-Dehydrogenase-Isoformen (PdhA) statistisch signifikant induziert nachgewiesen werden (Abb. 27, → 6.3.2). Somit ist der Shift dieser zwei Isoformen in Zellkultur auch statistisch bestätigt. Auch eine dritte Isoform konnte hier als statistisch signifikant induziert erfasst werden. In diesem Zusammenhang wäre es sehr interessant die Natur der hier beobachteten Isoformen und somit unter Infektionen auftretenden Modifikationen der Pyruvat-Dehydrogenase weiter zu untersuchen.

Als neu induziertes Protein erscheint hier das unbekannte Protein Lmo0592. Ebenso hier statistisch signifikant nachweisbar erscheint Lmo0774. Dieses unbekannte Protein besitzt eine Diacylglycerol Kinase Domäne (DAGKc). Diacylglycerol ist „second messenger“ und agiert als Protein-Kinase-C-Aktivator und entsteht aus der Hydrolyse des Membranlipids Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate. Die DAGK phosphoryliert Diacylglycerol (DAG) um Phosphatische Säure zu gewinnen. Für Säuger sind DAGKs PKC-ähnliche Zinkfinger und eine Beteiligung an Signaltransduktionen bekannt. Auch wenn für diese Protein keine Sekretion bekannt ist, so wäre doch eine Interaktion mit der Protein-Kinase-C der Wirtszelle denkbar. Substrate der Proteinkinase-C sind MARCKS-Proteine, MAP-Kinasen, Transkriptionsfaktor-Inhibitor I $\kappa$ B, Vitamin D<sub>3</sub> Rezeptor, Raf-Kinase, Calpain und der EGF-Rezeptor. Das heißt diese mutmaßliche Interaktion würde direkt in die Signaltransduktion der Wirtszelle eingreifen. Substrate der Proteinkinase-C sind MARCKS-Proteine, MAP Kinasen, Transkriptionsfaktor-Inhibitor I $\kappa$ B, Vitamin D<sub>3</sub> Rezeptor, Raf-Kinase, Calpain und der EGF-Rezeptor. Dies geht konform mit der Annahme, dass nach Hydrolyse von PI (Phosphatidyl-Inositol) durch bakterielles PI-PLC in Diacylglycerol (DAG) eine Aktivierung von Protein-Kinase-C in Wirtszellen angenommen wird (→ 2.4.1) [156].

In Übereinstimmung und Ergänzung der Ergebnisse im Vergleich BHI zu Infektionen konnte hier neben ClpP und Lmo1138 noch ClpB (Lmo2206) positiv reguliert (1,6-fach) identifiziert werden. Da hier alle Proteine schwächer induziert erscheinen, kann diese Regulation im Vergleich zu den anderen Proteinen noch als positiv gewertet werden. Für eine ClpB-Deletionsmutante konnte im Mausmodell bereits eine Beteiligung an der Virulenz festgestellt werden, wobei die LD<sub>50</sub> sich um den Faktor 100 verringert. ClpB besitzt einen durch Hitzeschock induzierbaren  $\sigma^A$ -Promotor und wird durch CtsR unterdrückt [19]. Somit wird hiermit ein weiterer Hinweis auf die maßgebliche Beteiligung der Clp-HSP-100 ATPasen am Virulenzgeschehen geliefert. Des weiteren konnte ClpB auch in den Transkriptomanalysen induziert nachgewiesen werden [80].

## Diskussion

Die hier erzielten Ergebnisse werden nochmals durch die Tatsache untermauert, dass *clpB* und die Phosphoglyceromutase (Imo2205) sich in einem Operon befinden (Abb.: 16). Für Imo2205 ist eine Induktion unter Glucosemangel bekannt (→6.3.1). Dies bestätigt nochmals die Beteiligung ClpB und Lmo2205 am Überleben von *Listeria* in Makrophagen.



**Abb. 28:** Genkarte von *clpB* und Imo2205  
<http://genolist.pasteur.fr/ListiList>

Mit der Reprimierung von Lmo2478 der Thioredoxin-Reduktase liegt ein weiterer Hinweis auf eine Reprimierung des Pyrimidinstoffwechsels und somit der DNA-Synthese vor.

Insgesamt konnten in der Infektionskontrolle die meisten Proteine als statistisch signifikant schwächer exprimiert erfasst werden als im Vergleich von BHI zu Infektionen. Da dies durchgehend der Fall war, wurden auch Induktionen, welche nicht größer als 2-fach reguliert waren noch als positiv gewertet. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass bereits durch die Zwischenkultur in RPMI einige der Proteine, welche auch intrazellulär notwendig sind, induziert werden und daher eine weitere Induktion sich nicht mehr so deutlich nachweisen lässt. Zudem wird die Proteinsynthese, wie bereits in der RPMI-Kontrolle erkennbar, bereits beim Shift in RPMI gedrosselt, wodurch sich eine verringerte relative Induktion erklären ließe. Dennoch gibt es einige Unterschiede: Einige der Proteine liegen hier nicht mehr

induziert vor, darunter für Lmo1349, Lmo1350, PurH und GlyA. Dies könnte ein Hinweis auf eine nicht Infektions-spezifische Beteiligung dieser Gene darstellen. Auch wenn hier weniger Proteine induziert vorliegen, stimmen die Ergebnisse aber sehr gut mit den Vergleichen mit BHI überein. Eine genauere Untersuchung dieses Ansatzes würde noch weitere Induktionen identifizieren, welche im Vergleich der Infektionen zu BHI-Kultur durch die großen Unterschiede zwischen den Bedingungen in Infektionen und in Vollmedium überlagert werden. Es ist hervorzuheben, dass die Beispiele der in der Infektions-Kontrolle erstmals als induziert nachgewiesenen Proteine Lmo0592 und dem hier besonders stark induzierten Lmo2754 (penicillin binding protein 5) diese hier durchgeführte Kontrolle als viel versprechenden Ansatz zur Identifizierung neuer Virulenz-assoziiierter Proteine bestätigt.

## **6.4 Bewertung der neu entwickelten Methode und deren Ergebnisse**

Erfreulicherweise konnte für einige hier identifizierten Proteine anhand der vorliegenden Literatur (Transkriptom, Sekretom, Virulenz von *Listeria*) bereits eine Beteiligung am Virulenzgeschehen nachgewiesen werden. Somit kann die hier neu entwickelte Methode als vielversprechend gewertet werden. Vor allem die Kontrolle aus *Listerien*, welche in RPMI-Zellkulturmedium inkubiert wurden, stellt einen neuen interessanten Ansatz dar, da unspezifische Induktionen hier verschwinden und neue Induktionen, welche aus dem Transkriptom nicht bekannt sind aber vielversprechend sind, wie (Lmo2754, penicillin-binding protein 5; Lmo0774 mit einer DAGK-Domäne), neu auftauchen. Ebenfalls positiv ist zu bewerten, dass die hier durchgeführten Isolierungen mit paramagnetischen Partikeln unter den hier etablierten versuchsbedingungen in anderen zelllinien außer J774-Makrophagen Ihre Anwendung finden können.

Zum jetzigen Zeitpunkt unterliegt die proteomische Analyse von Proteomen einigen Limitierungen, wie dem Nachweis von schwach exprimierten, stark alkalischen, stark basischen, stark hydrophoben, hochmolekularen und niedermolekularen Proteinen (→ 2.1.1). Das heißt, zum jetzigen Zeitpunkt kann die Proteomik nur Zusatzinformationen liefern, aber noch nicht das gesamte Proteom abdecken, was sich auch in der vorliegenden Analyse deutlich zeigte. Da die Delta-2-D-Software leider erst nach Abschluss der MALDI-TOF- Identifizierungen verfügbar war, zeigte sich auch, dass das Auge offensichtlich schon feinere Unterschiede als die Software-definierten 0,5-fachen und 2-fachen Regulationen aufzeigt.

Auch können Spots, welche sich in naher Nachbarschaft zu anderen Proteinen befinden oftmals nicht erfasst werden. Es scheint, dass durch die gesetzten Grenzen auch signifikante Regulationen im Vergleich zum Transkriptom nicht mehr erfasst werden, da die äußerst sensitive Methode größere Varianzen statistisch verrechnen muss. Somit stellt die statistische Erfassung des Proteoms eine weitere Limitierung der Methode dar.

Dass die „klassischen“ Virulenzfaktoren pathogener Listerien, Listeriolysin O (LLO), die Phospholipasen PlcA und PlcB, sowie ActA hier nicht erfasst wurden, ist darin begründet, dass es sich dabei um sekretierte Proteine handelt, im Fall von ActA um ein lose mit der Membran und Zellwand assoziiertes Protein. Extrazelluläre Proteine konnten mit der Methode prinzipiell nicht erfasst werden, ihr intrazellulärer Pool ist offenbar sehr klein und unterliegt möglicherweise keinen signifikanten Veränderungen.

Besondere Bedeutung kommt der Beobachtung zu, dass nur in ganz wenigen Fällen (z.B.. Pgm, ClpP, Pgi, TrxB, MurC) die nachgewiesenen intrazellulären Veränderungen der Proteinmenge mit den von anderen publizierten Transkriptionsdaten [20, 80] übereinstimmen. In etlichen Fällen (z.B.. Pnp, GgaB, Glycinderhydrogenase, Acetat-CoA-Ligase) wurden dort Gene als transkriptionell unreguliert beschrieben, welche im Proteom eindeutig verändert sind, die hier als hochreguliert erkannte PdhD gilt als transkriptionell reprimiert.

Diese Diskrepanzen stellen keine Artefakte dar, sondern sind durch eine Reihe von Effekten erklärbar, welche durch Transkriptionsanalysen nicht erfasst werden können. Dazu zählen unter anderem Veränderungen in der biologischen Halbwertszeit von Proteinen, welche auf Aktivierung bzw. Inaktivierung von Schutz- und Reparatur- sowie proteolytischen Mechanismen beruhen. Auch stabilisierende bzw. destabilisierende Proteinmodifikationen könnten eine Rolle spielen.

Insgesamt zeigte auch diese Proteomanalyse, wie schon die vorliegenden Transkriptomdaten, dass bei der Replikation von *Listeria monocytogenes* im Cytosol eukaryontischer Wirtszellen zahlreiche komplexe Anpassungen von teils zentralen, aber auch peripheren Stoffwechselwegen und Biosynthesen der Bakterien an dieses spezielle Milieu ablaufen.

## 7. Literatur

- [1] **Abachin, E., C. Poyart, E. Pellegrini, E. Milohanic, F. Fiedler, P. Berche und P. Trieu-Cuot**, 2002 *Formation of D-alanyl-lipoteichoic acid is required for adhesion and virulence of Listeria monocytogenes*. Mol Microbiol. **43**(1): p. 1-14.
- [2] **Altland, K., P. Becher, U. Rossmann und B. Bjellqvist**, 1988 *Isoelectric focusing of basic proteins: the problem of oxidation of cysteines*. Electrophoresis. **9**(9): p. 474-85.
- [3] **Altrock, S.**, 2002 *Genetische Organisation und Transkription eines Virulenz-assoziierten instabilen Chromosomenabschnitts von Listeria ivanovii*. Dissertation.
- [4] **Baumgartner, M., U. Karst, B. Gerstel, M. Loessner, J. Wehland und L. Jansch**, 2007 *Inactivation of Lgt allows systematic characterization of lipoproteins from Listeria monocytogenes*. J Bacteriol. **189**(2): p. 313-24.
- [5] **Bayles, D.O., B.A. Annous und B.J. Wilkinson**, 1996 *Cold stress proteins induced in Listeria monocytogenes in response to temperature downshock and growth at low temperatures*. Appl Environ Microbiol. **62**(3): p. 1116-9.
- [6] **Bernhardt, J., K. Buttner, C. Scharf und M. Hecker**, 1999 *Dual channel imaging of two-dimensional electropherograms in Bacillus subtilis*. Electrophoresis. **20**(11): p. 2225-40.
- [7] **Bierne, H., S.K. Mazmanian, M. Trost, M.G. Pucciarelli, G. Liu, P. Dehoux, L. Jansch, F. Garcia-del Portillo, O. Schneewind und P. Cossart**, 2002 *Inactivation of the srtA gene in Listeria monocytogenes inhibits anchoring of surface proteins and affects virulence*. Mol Microbiol. **43**(4): p. 869-81.
- [8] **Bigot, A., E. Botton, I. Dubail und A. Charbit**, 2006 *A homolog of Bacillus subtilis trigger factor in Listeria monocytogenes is involved in stress tolerance and bacterial virulence*. Appl Environ Microbiol. **72**(10): p. 6623-31.
- [9] **Borezee, E., E. Pellegrini und P. Berche**, 2000 *OppA of Listeria monocytogenes, an oligopeptide-binding protein required for bacterial growth at low temperature and involved in intracellular survival*. Infect Immun. **68**(12): p. 7069-77.
- [10] **Brehm, K., A. Haas, W. Goebel und J. Kreft**, 1992 *A gene encoding a superoxide dismutase of the facultative intracellular bacterium Listeria monocytogenes*. Gene. **118**(1): p. 121-5.
- [11] **Bubert, A., S. Kohler und 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**(8): p. 2625-32.
- [12] **Bubert, A., P. Schubert, S. Kohler, R. Frank und 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 Environ Microbiol. **60**(9): p. 3120-7.
- [13] **Cabanes, D., P. Dehoux, O. Dussurget, L. Frangeul und P. Cossart**, 2002 *Surface proteins and the pathogenic potential of Listeria monocytogenes*. Trends Microbiol. **10**(5): p. 238-45.

- [14] **Cabanes, D., O. Dussurget, P. Dehoux und P. Cossart**, 2004 Auto, a surface associated autolysin of *Listeria monocytogenes* required for entry into eukaryotic cells and virulence. *Mol Microbiol.* **51**(6): p. 1601-14.
- [15] **Cabanes, D., S. Sousa, A. Cebría, M. Lecuit, F. Garcia-del Portillo und P. Cossart**, 2005 *Gp96 is a receptor for a novel Listeria monocytogenes virulence factor, Vip, a surface protein.* *Embo J.* **24**(15): p. 2827-38.
- [16] **Calvo, E., M.G. Pucciarelli, H. Bierne, P. Cossart, J.P. Albar und F. Garcia-Del Portillo**, 2005 *Analysis of the Listeria cell wall proteome by two-dimensional nanoliquid chromatography coupled to mass spectrometry.* *Proteomics.* **5**(2): p. 433-43.
- [17] **Chakraborty, T. und W. Goebel**, 1988 *Recent developments in the study of virulence in Listeria monocytogenes.* *Curr Top Microbiol Immunol.* **138**: p. 41-58.
- [18] **Chakraborty, T., M. Leimeister-Wächter, E. Domann, M. Hartl, W. Goebel, T. Nichterlein und S. Notermans**, 1992 *Coordinate regulation of virulence genes in Listeria monocytogenes requires the product of the prfA gene.* *J Bacteriol.* **174**(2): p. 568-74.
- [19] **Chastanet, A., I. Derre, S. Nair und T. Msadek**, 2004 *clpB, a novel member of the Listeria monocytogenes CtsR regulon, is involved in virulence but not in general stress tolerance.* *J Bacteriol.* **186**(4): p. 1165-74.
- [20] **Chatterjee, S.S., H. Hossain, S. Otten, C. Kuenne, K. Kuchmina, S. Machata, E. Domann, T. Chakraborty und T. Hain**, 2006 *Intracellular gene expression profile of Listeria monocytogenes.* *Infect Immun.* **74**(2): p. 1323-38.
- [21] **Chico-Calero, I., M. Suarez, B. Gonzalez-Zorn, M. Scotti, J. Slaghuis, W. Goebel und J.A. Vazquez-Boland**, 2002 *Hpt, a bacterial homolog of the microsomal glucose- 6-phosphate translocase, mediates rapid intracellular proliferation in Listeria.* *Proc Natl Acad Sci U S A.* **99**(1): p. 431-6.
- [22] **Cordwell, S.J., A.S. Nouwens und B.J. Walsh**, 2001 *Comparative proteomics of bacterial pathogens.* *Proteomics.* **1**(4): p. 461-72.
- [23] **Corthals, G.L., V.C. Wasinger, D.F. Hochstrasser und J.C. Sanchez**, 2000 *The dynamic range of protein expression: a challenge for proteomic research.* *Electrophoresis.* **21**(6): p. 1104-15.
- [24] **Cossart, P. und J. Mengaud**, 1989 *Listeria monocytogenes. A model system for the molecular study of intracellular parasitism.* *Mol Biol Med.* **6**(5): p. 463-74.
- [25] **Cotter, P.D., N. Emerson, C.G. Gahan und C. Hill**, 1999 *Identification and disruption of lisRK, a genetic locus encoding a two-component signal transduction system involved in stress tolerance and virulence in Listeria monocytogenes.* *J Bacteriol.* **181**(21): p. 6840-3.
- [26] **Dabiri, G.A., J.M. Sanger, D.A. Portnoy und F.S. Southwick**, 1990 *Listeria monocytogenes moves rapidly through the host-cell cytoplasm by inducing directional actin assembly.* *Proc Natl Acad Sci U S A.* **87**(16): p. 6068-72.
- [27] **Davis, M.J., P.J. Coote und C.P. O'Byrne**, 1996 *Acid tolerance in Listeria monocytogenes: the adaptive acid tolerance response (ATR) and growth-phase-dependent acid resistance.* *Microbiology.* **142 ( Pt 10)**: p. 2975-82.
- [28] **Desvaux, M. und M. Hebraud**, 2006 *The protein secretion systems in Listeria: inside out bacterial virulence.* *FEMS Microbiol Rev.* **30**(5): p. 774-805.

- [29]**Dieterich, G., U. Karst, E. Fischer, J. Wehland und L. Jansch**, 2006 LEGER: knowledge database and visualization tool for comparative genomics of pathogenic and non-pathogenic *Listeria* species. *Nucleic Acids Res.* **34**(Database issue): p. D402-6.
- [30]**Domann, E., J. Wehland, M. Rohde, S. Pistor, M. Hartl, W. Goebel, M. Leimeister-Wächter, M. Wuenscher und 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**(5): p. 1981-90.
- [31]**Domann, E., S. Zechel, A. Lingnau, T. Hain, A. Darji, T. Nichterlein, J. Wehland und 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**(1): p. 101-9.
- [32]**Dramsi, S., F. Bourdichon, D. Cabanes, M. Lecuit, H. Fsihi und P. Cossart**, 2004 *FbpA, a novel multifunctional Listeria monocytogenes virulence factor.* *Mol Microbiol.* **53**(2): p. 639-49.
- [33]**Dramsi, S., P. Dehoux und P. Cossart**, 1993 Common features of gram-positive bacterial proteins involved in cell recognition. *Mol Microbiol.* **9**(5): p. 1119-21.
- [34]**Dramsi, S., P. Dehoux, M. Lebrun, P.L. Goossens und P. Cossart**, 1997 *Identification of four new members of the internalin multigene family of Listeria monocytogenes EGD.* *Infect Immun.* **65**(5): p. 1615-25.
- [35]**Dramsi, S., C. Kocks, C. Forestier und 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**(5): p. 931-41.
- [36]**Dubail, I., A. Bigot, V. Lazarevic, B. Soldo, D. Euphrasie, M. Dupuis und A. Charbit**, 2006 *Identification of an essential gene of Listeria monocytogenes involved in teichoic acid biogenesis.* *J Bacteriol.* **188**(18): p. 6580-91.
- [37]**Duche, O., F. Tremoulet, P. Glaser und J. Labadie**, 2002 *Salt stress proteins induced in Listeria monocytogenes.* *Appl Environ Microbiol.* **68**(4): p. 1491-8.
- [38]**Duche, O., F. Tremoulet, A. Namane und J. Labadie**, 2002 *A proteomic analysis of the salt stress response of Listeria monocytogenes.* *FEMS Microbiol Lett.* **215**(2): p. 183-8.
- [39]**Duffes, F., P. Jenoe und P. Boyaval**, 2000 Use of two-dimensional electrophoresis To study differential protein expression in divercin V41-resistant and wild-type strains of *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol.* **66**(10): p. 4318-24.
- [40]**Dussurget, O., D. Cabanes, P. Dehoux, M. Lecuit, C. Buchrieser, P. Glaser und P. Cossart**, 2002 *Listeria monocytogenes* bile salt hydrolase is a PrfA-regulated virulence factor involved in the intestinal and hepatic phases of listeriosis. *Mol Microbiol.* **45**(4): p. 1095-106.
- [41]**Engelbrecht, F., S.K. Chun, C. Ochs, J. Hess, F. Lottspeich, W. Goebel und 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**(4): p. 823-37.
- [42]**Esvan, H., J. Minet, C. Laclie und M. Cormier**, 2000 *Proteins variations in Listeria monocytogenes exposed to high salinities.* *Int J Food Microbiol.* **55**(1-3): p. 151-5.

- [43] **Folio, P., P. Chavant, I. Chafsey, A. Belkorchia, C. Chambon und M. Hebraud**, 2004 Two-dimensional electrophoresis database of *Listeria monocytogenes* EGDe proteome and proteomic analysis of mid-log and stationary growth phase cells. *Proteomics*. **4**(10): p. 3187-201.
- [44] **Folsom, J.P. und J.F. Frank**, 2007 Proteomic analysis of a hypochlorous acid-tolerant *Listeria monocytogenes* cultural variant exhibiting enhanced biofilm production. *J Food Prot.* **70**(5): p. 1129-36.
- [45] **Gaillard, J.L., P. Berche, C. Frehel, E. Guoin und 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**(7): p. 1127-41.
- [46] **Gaillard, J.L., P. Berche, J. Mounier, S. Richard und 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**(11): p. 2822-9.
- [47] **Gaillot, O., E. Pellegrini, S. Bregenholt, S. Nair und P. Berche**, 2000 The ClpP serine protease is essential for the intracellular parasitism and virulence of *Listeria monocytogenes*. *Mol Microbiol.* **35**(6): p. 1286-94.
- [48] **Garner, M.R., B.L. Njaa, M. Wiedmann und K.J. Boor**, 2006 Sigma B contributes to *Listeria monocytogenes* gastrointestinal infection but not to systemic spread in the guinea pig infection model. *Infect Immun.* **74**(2): p. 876-86.
- [49] **Geoffroy, C., J.L. Gaillard, J.E. Alouf und P. Berche**, 1987 Purification, characterization, and toxicity of the sulfhydryl-activated hemolysin listeriolysin O from *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun.* **55**(7): p. 1641-6.
- [50] **Geoffroy, C., J. Raveneau, J.L. Beretti, A. Lecroisey, J.A. Vazquez-Boland, J.E. Alouf und P. Berche**, 1991 *Purification and characterization of an extracellular 29-kilodalton phospholipase C from Listeria monocytogenes*. *Infect Immun.* **59**(7): p. 2382-8.
- [51] **Gharbi, S., P. Gaffney, A. Yang, M.J. Zvelebil, R. Cramer, M.D. Waterfield und J.F. Timms**, 2002 Evaluation of two-dimensional differential gel electrophoresis for proteomic expression analysis of a model breast cancer cell system. *Mol Cell Proteomics*. **1**(2): p. 91-8.
- [52] **Glaser, P., L. Frangeul, C. Buchrieser, C. Rusniok, A. Amend, F. Baquero, P. Berche, H. Bloecker, P. Brandt, T. Chakraborty, A. Charbit, F. Chetouani, E. Couve, A. de Daruvar, P. Dehoux, E. Domann, G. Dominguez-Bernal, E. Duchaud, L. Durant, O. Dussurget, K.D. Entian, H. Fsihi, F. Garcia-del Portillo, P. Garrido, L. Gautier, W. Goebel, N. Gomez-Lopez, T. Hain, J. Hauf, D. Jackson, L.M. Jones, U. Kaerst, J. Kreft, M. Kuhn, F. Kunst, G. Kurapkat, E. Madueno, A. Maitournam, J.M. Vicente, E. Ng, H. Nedjari, G. Nordsiek, S. Novella, B. de Pablos, J.C. Perez-Diaz, R. Purcell, B. Remmel, M. Rose, T. Schlueter, N. Simoes, A. Tierrez, J.A. Vazquez-Boland, H. Voss, J. Wehland und P. Cossart**, 2001 *Comparative genomics of Listeria species*. *Science*. 294(5543): p. 849-52.
- [53] **Goldfine, H. und S.J. Wadsworth**, 2002 *Macrophage intracellular signaling induced by Listeria monocytogenes*. *Microbes Infect.* **4**(13): p. 1335-43.

- [54] **Goldfine, H., S.J. Wadsworth und N.C. Johnston**, 2000 Activation of host phospholipases C and D in macrophages after infection with *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun.* **68**(10): p. 5735-41.
- [55] **Görg, A., G. Boguth, C. Obermaier, A. Posch und W. Weiss**, 1995 Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis with immobilized pH gradients in the first dimension (IPG-Dalt): the state of the art and the controversy of vertical versus horizontal systems. *Electrophoresis.* **16**(7): p. 1079-86.
- [56] **Görg, A., C. Obermaier, G. Boguth, A. Csordas, J.J. Diaz und J.J. Madjar**, 1997 *Very alkaline immobilized pH gradients for two-dimensional electrophoresis of ribosomal and nuclear proteins.* *Electrophoresis.* **18**(3-4): p. 328-37.
- [57] **Görg, A., C. Obermaier, G. Boguth, A. Harder, B. Scheibe, R. Wildgruber und W. Weiss**, 2000 *The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients.* *Electrophoresis.* **21**(6): p. 1037-53.
- [58] **Görg, A., W. Postel und S. Gunther**, 1988 The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis.* **9**(9): p. 531-46.
- [59] **Görg, A., W. Weiss und M.J. Dunn**, 2004 *Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics.* *Proteomics.* **4**(12): p. 3665-85.
- [60] **Gouin, E., J. Mengaud und 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**(8): p. 3550-3.
- [61] **Gravesen, A., M. Ramnath, K.B. Rechinger, N. Andersen, L. Jansch, Y. Hechard, J.W. Hastings und S. Knochel**, 2002 *High-level resistance to class IIa bacteriocins is associated with one general mechanism in Listeria monocytogenes.* *Microbiology.* **148**(Pt 8): p. 2361-9.
- [62] **Gray, M.L. und A.H. Killinger**, 1966 *Listeria monocytogenes and listeric infections.* *Bacteriol Rev.* **30**(2): p. 309-82.
- [63] **Guinane, C.M., P.D. Cotter, R.P. Ross und C. Hill**, 2006 Contribution of penicillin-binding protein homologs to antibiotic resistance, cell morphology, and virulence of *Listeria monocytogenes* EGDe. *Antimicrob Agents Chemother.* **50**(8): p. 2824-8.
- [64] **Hain, T., S.S. Chatterjee, R. Ghai, C.T. Kuenne, A. Billion, C. Steinweg, E. Domann, U. Karst, L. Jansch, J. Wehland, W. Eisenreich, A. Bacher, B. Joseph, J. Schar, J. Kreft, J. Klumpp, M.J. Loessner, J. Dorscht, K. Neuhaus, T.M. Fuchs, S. Scherer, M. Doumith, C. Jacquet, P. Martin, P. Cossart, C. Rusniok, P. Glaser, C. Buchrieser, W. Goebel und T. Chakraborty**, 2007 *Pathogenomics of Listeria spp.* *Int J Med Microbiol.*
- [65] **Hakenbeck, R. und H. Hof**, 1991 *Relatedness of penicillin-binding proteins from various Listeria species.* *FEMS Microbiol Lett.* **68**(2): p. 191-5.
- [66] **Hamon, M., H. Bierne und P. Cossart**, 2006 *Listeria monocytogenes: a multifaceted model.* *Nat Rev Microbiol.* **4**(6): p. 423-34.
- [67] **Hanawa, T., T. Yamamoto und S. Kamiya**, 1995 *Listeria monocytogenes* can grow in macrophages without the aid of proteins induced by environmental stresses. *Infect Immun.* **63**(12): p. 4595-9.
- [68] **Hauf, N., W. Goebel, F. Fiedler, Z. Sokolovic und M. Kuhn**, 1997 *Listeria monocytogenes* infection of P388D1 macrophages results in a biphasic NF-kappaB

(RelA/p50) activation induced by lipoteichoic acid and bacterial phospholipases and mediated by IkappaBalpha and IkappaBbeta degradation. Proc Natl Acad Sci U S A. **94**(17): p. 9394-9.

[69]**Hauf, N., W. Goebel, E. Serfling und M. Kuhn**, 1994 *Listeria monocytogenes* infection enhances transcription factor NF-kappa B in P388D1 macrophage-like cells. Infect Immun. **62**(7): p. 2740-7.

[70]**Hebraud, M. und J. Guzzo**, 2000 The main cold shock protein of *Listeria monocytogenes* belongs to the family of ferritin-like proteins. FEMS Microbiol Lett. **190**(1): p. 29-34.

[71]**Hecker, M., S. Engelmann und S.J. Cordwell**, 2003 *Proteomics of Staphylococcus aureus--current state and future challenges*. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. **787**(1): p. 179-95.

[72]**Helloin, E., L. Jansch und L. Phan-Thanh**, 2003 Carbon starvation survival of *Listeria monocytogenes* in planktonic state and in biofilm: a proteomic study. Proteomics. **3**(10): p. 2052-64.

[73]**Hengge, R. und B. Bukau**, 2003 Proteolysis in prokaryotes: protein quality control and regulatory principles. Mol Microbiol. **49**(6): p. 1451-62.

[74]**Hufnagel, P. und R. Rabus**, 2006 Mass spectrometric identification of proteins in complex post-genomic projects. Soluble proteins of the metabolically versatile, denitrifying 'Aromatoleum' sp. strain EbN1. J Mol Microbiol Biotechnol. **11**(1-2): p. 53-81.

[75]**Hussain, M., C. Heilmann, G. Peters und M. Herrmann**, 2001 *Teichoic acid enhances adhesion of Staphylococcus epidermidis to immobilized fibronectin*. Microb Pathog. **31**(6): p. 261-70.

[76]**Jones, D.**, 1989 *Taxonomic position of Listeria strains*. Acta Microbiol Hung. **36**(2-3): p. 113-8.

[77]**Jones, D.**, 1990 *Foodborne illness - foodborne listeriosis*. The Lancet. **336**: p. 1171-1174.

[78]**Jones, D.**, 1992 *Current classification of the genus listeria*. Absta. 11th Int. Probl. Listeriosis. **Abstr. 2:7-8**.

[79]**Jonquieres, R., H. Bierne, F. Fiedler, P. Gounon und 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**(5): p. 902-14.

[80]**Joseph, B., K. Przybilla, C. Stuhler, K. Schauer, J. Slaghuis, T.M. Fuchs und W. Goebel**, 2006 Identification of *Listeria monocytogenes* genes contributing to intracellular replication by expression profiling and mutant screening. J Bacteriol. **188**(2): p. 556-68.

[81]**Kazmierczak, M.J., S.C. Mithoe, K.J. Boor und M. Wiedmann**, 2003 *Listeria monocytogenes sigma B regulates stress response and virulence functions*. J Bacteriol. **185**(19): p. 5722-34.

[82]**Klarsfeld, A.D., P.L. Goossens und 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**(4): p. 585-97.

- [83]**Klose, J.**, 1975 Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals. *Humangenetik*. **26**(3): p. 231-43.
- [84]**Klose, J. und U. Kobalz**, 1995 Two-dimensional electrophoresis of proteins: an updated protocol and implications for a functional analysis of the genome. *Electrophoresis*. **16**(6): p. 1034-59.
- [85]**Klose, K.E. und J.J. Mekalanos**, 1997 Simultaneous prevention of glutamine synthesis and high-affinity transport attenuates *Salmonella typhimurium* virulence. *Infect Immun*. **65**(2): p. 587-96.
- [86]**Kocks, C. und P. Cossart**, 1993 Directional actin assembly by *Listeria monocytogenes* at the site of polar surface expression of the actA gene product involving the actin-bundling protein plastin (fimbrin). *Infect Agents Dis*. **2**(4): p. 207-9.
- [87]**Kocks, C., E. Gouin, M. Tabouret, P. Berche, H. Ohayon und P. Cossart**, 1992 *L. monocytogenes*-induced actin assembly requires the actA gene product, a surface protein. *Cell*. **68**(3): p. 521-31.
- [88]**Kocks, C., R. Hellio, P. Gounon, H. Ohayon und P. Cossart**, 1993 Polarized distribution of *Listeria monocytogenes* surface protein ActA at the site of directional actin assembly. *J Cell Sci*. **105 ( Pt 3)**: p. 699-710.
- [89]**Korsak, D., W. Vollmer und Z. Markiewicz**, 2005 *Listeria monocytogenes* EGD lacking penicillin-binding protein 5 (PBP5) produces a thicker cell wall. *FEMS Microbiol Lett*. **251**(2): p. 281-8.
- [90]**Kreft, J.**, 1992 *Listeria monocytogenes* - ein Modell für fakultativ intrazelluläre bakterien. *BioEng*. **1:65-70**.
- [91]**Kreft, J., M. Dumbsky und 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*. **132**(1-2): p. 181-2.
- [92]**Kreft, J. und J.A. Vazquez-Boland**, 2001 *Regulation of virulence genes in Listeria*. *Int J Med Microbiol*. **291**(2): p. 145-57.
- [93]**Kuhn, M. und W. Goebel**, 1994 Induction of cytokines in phagocytic mammalian cells infected with virulent and avirulent *Listeria* strains. *Infect Immun*. **62**(2): p. 348-56.
- [94]**Kuhn, M. und W. Goebel**, 1995 *Molecular studies on the virulence of Listeria monocytogenes*. *Genet Eng (N Y)*. **17**: p. 31-51.
- [95]**Kwaik, Y.A. und O.S. Harb**, 1999 *Phenotypic modulation by intracellular bacterial pathogens*. *Electrophoresis*. **20**(11): p. 2248-58.
- [96]**Lenz, L.L., S. Mohammadi, A. Geissler und D.A. Portnoy**, 2003 *SecA2-dependent secretion of autolytic enzymes promotes Listeria monocytogenes pathogenesis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **100**(21): p. 12432-7.
- [97]**Lenz, L.L. und D.A. Portnoy**, 2002 Identification of a second *Listeria* secA gene associated with protein secretion and the rough phenotype. *Mol Microbiol*. **45**(4): p. 1043-56.
- [98]**Loessner, M.J., K. Kramer, F. Ebel und S. Scherer**, 2002 C-terminal domains of *Listeria monocytogenes* bacteriophage murein hydrolases determine specific recognition

and high-affinity binding to bacterial cell wall carbohydrates. *Mol Microbiol.* **44**(2): p. 335-49.

[99]**Loessner, M.J., C.E. Rees, G.S. Stewart und S. Scherer**, 1996 Construction of luciferase reporter bacteriophage A511::luxAB for rapid and sensitive detection of viable *Listeria* cells. *Appl Environ Microbiol.* **62**(4): p. 1133-40.

[100]**Loessner, M.J., A. Schneider und S. Scherer**, 1995 A new procedure for efficient recovery of DNA, RNA, and proteins from *Listeria* cells by rapid lysis with a recombinant bacteriophage endolysin. *Appl Environ Microbiol.* **61**(3): p. 1150-2.

[101]**Loessner, M.J., A. Schneider und S. Scherer**, 1996 Modified *Listeria* bacteriophage lysin genes (ply) allow efficient overexpression and one-step purification of biochemically active fusion proteins. *Appl Environ Microbiol.* **62**(8): p. 3057-60.

[102]**Lucchini, S., H. Liu, Q. Jin, J.C. Hinton und J. Yu**, 2005 Transcriptional adaptation of *Shigella flexneri* during infection of macrophages and epithelial cells: insights into the strategies of a cytosolic bacterial pathogen. *Infect Immun.* **73**(1): p. 88-102.

[103]**MacDonald, T.T. und P.B. Carter**, 1980 *Cell-mediated immunity to intestinal infection*. *Infect Immun.* **28**(2): p. 516-23.

[104]**Marquis, H., H.G. Bouwer, D.J. Hinrichs und D.A. Portnoy**, 1993 *Intracytoplasmic growth and virulence of Listeria monocytogenes auxotrophic mutants*. *Infect Immun.* **61**(9): p. 3756-60.

[105]**McKay, D.B., M.A. Vazquez, R.W. Redline und C.Y. Lu**, 1992 *Macrophage functions are regulated by murine decidual and tumor extracellular matrices*. *J Clin Invest.* **89**(1): p. 134-42.

[106]**Mengaud, J., S. Dramsi, E. Gouin, J.A. Vazquez-Boland, G. Milon und P. Cossart**, 1991 *Pleiotropic control of Listeria monocytogenes virulence factors by a gene that is autoregulated*. *Mol Microbiol.* **5**(9): p. 2273-83.

[107]**Milohanic, E., R. Jonquieres, P. Cossart, P. Berche und J.L. Gaillard**, 2001 The autolysin Ami contributes to the adhesion of *Listeria monocytogenes* to eukaryotic cells via its cell wall anchor. *Mol Microbiol.* **39**(5): p. 1212-24.

[108]**Milohanic, E., B. Pron, P. Berche und J.L. Gaillard**, 2000 Identification of new loci involved in adhesion of *Listeria monocytogenes* to eukaryotic cells. *European Listeria Genome Consortium. Microbiology.* **146 ( Pt 3)**: p. 731-9.

[109]**Mounier, J., A. Ryter, M. Coquis-Rondon und 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**(4): p. 1048-58.

[110]**Myers, J.T., A.W. Tsang und J.A. Swanson**, 2003 Localized reactive oxygen and nitrogen intermediates inhibit escape of *Listeria monocytogenes* from vacuoles in activated macrophages. *J Immunol.* **171**(10): p. 5447-53.

[111]**Nadon, C.A., B.M. Bowen, M. Wiedmann und K.J. Boor**, 2002 *Sigma B contributes to PrfA-mediated virulence in Listeria monocytogenes*. *Infect Immun.* **70**(7): p. 3948-52.

[112]**Nair, S., C. Frehel, L. Nguyen, V. Escuyer und P. Berche**, 1999 ClpE, a novel member of the HSP100 family, is involved in cell division and virulence of *Listeria monocytogenes*. *Mol Microbiol.* **31**(1): p. 185-96.

- [113] **Nair, S., E. Milošević and P. Berche**, 2000 *ClpC ATPase is required for cell adhesion and invasion of Listeria monocytogenes*. Infect Immun. **68**(12): p. 7061-8.
- [114] **Nelson, D.E., A.S. Ghosh, A.L. Paulson and K.D. Young**, 2002 Contribution of membrane-binding and enzymatic domains of penicillin binding protein 5 to maintenance of uniform cellular morphology of Escherichia coli. J Bacteriol. **184**(13): p. 3630-9.
- [115] **Nelson, D.E. and K.D. Young**, 2001 Contributions of PBP 5 and DD-carboxypeptidase penicillin binding proteins to maintenance of cell shape in Escherichia coli. J Bacteriol. **183**(10): p. 3055-64.
- [116] **Niebuhr, K., T. Chakraborty, M. Rohde, T. Gazlig, B. Jansen, P. Kollner 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**(7): p. 2793-802.
- [117] **O'Farrell, P.H.**, 1975 *High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins*. J Biol Chem. **250**(10): p. 4007-21.
- [118] **Olsen, K.N., M.H. Larsen, C.G. Gahan, B. Kallipolitis, X.A. Wolf, R. Rea, C. Hill and H. Ingmer**, 2005 The Dps-like protein Fri of Listeria monocytogenes promotes stress tolerance and intracellular multiplication in macrophage-like cells. Microbiology. **151**(Pt 3): p. 925-33.
- [119] **O'Riordan, M., M.A. Moors and D.A. Portnoy**, 2003 *Listeria intracellular growth and virulence require host-derived lipoic acid*. Science. **302**(5644): p. 462-4.
- [120] **Patterson, S.D. and G.I. Latter**, 1993 Evaluation of storage phosphor imaging for quantitative analysis of 2-D gels using the Quest II system. Biotechniques. **15**(6): p. 1076-83.
- [121] **Peel, M., W. Donachie and A. Shaw**, 1988 Physical and antigenic heterogeneity in the flagellins of Listeria monocytogenes and L. ivanovii. J Gen Microbiol. **134**(9): p. 2593-8.
- [122] **Phan-Thanh, L. and T. Gormon**, 1997 *Stress proteins in Listeria monocytogenes*. Electrophoresis. **18**(8): p. 1464-71.
- [123] **Phan-Thanh, L., F. Mahouin and S. Alige**, 2000 *Acid responses of Listeria monocytogenes*. Int J Food Microbiol. **55**(1-3): p. 121-6.
- [124] **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**(4): p. 758-63.
- [125] **Pizarro-Cerda, J. and P. Cossart**, 2006 *Subversion of cellular functions by Listeria monocytogenes*. J Pathol. **208**(2): p. 215-23.
- [126] **Portnoy, D.A.**, 1992 Innate immunity to a facultative intracellular bacterial pathogen. Curr Opin Immunol. **4**(1): p. 20-4.
- [127] **Portnoy, D.A., T. Chakraborty, W. Goebel and P. Cossart**, 1992 *Molecular determinants of Listeria monocytogenes pathogenesis*. Infect Immun. **60**(4): p. 1263-7.
- [128] **Portnoy, D.A., R.K. Tweten, M. Kehoe and J. Bielecki**, 1992 Capacity of listeriolysin O, streptolysin O, and perfringolysin O to mediate growth of Bacillus subtilis within mammalian cells. Infect Immun. **60**(7): p. 2710-7.
- [129] **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**(4): p. 1576-80.

[130]**Racz, P., K. Tenner und E. Mero**, 1972 Experimental Listeria enteritis. I. An electron microscopic study of the epithelial phase in experimental listeria infection. *Lab Invest.* **26**(6): p. 694-700.

[131]**Raffelsbauer, D., A. Bubert, F. Engelbrecht, J. Scheinflug, A. Simm, J. Hess, S.H. Kaufmann und 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**(2-3): p. 144-58.

[132]**Ramnath, M., M. Beukes, K. Tamura und J.W. Hastings**, 2000 Absence of a putative mannose-specific phosphotransferase system enzyme IIAB component in a leucocin A-resistant strain of *Listeria monocytogenes*, as shown by two-dimensional sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Appl Environ Microbiol.* **66**(7): p. 3098-101.

[133]**Ramnath, M., K.B. Rechinger, L. Jansch, J.W. Hastings, S. Knochel und A. Gravesen**, 2003 Development of a *Listeria monocytogenes* EGDe partial proteome reference map and comparison with the protein profiles of food isolates. *Appl Environ Microbiol.* **69**(6): p. 3368-76.

[134]**Raveneau, J., C. Geoffroy, J.L. Beretti, J.L. Gaillard, J.E. Alouf und P. Berche**, 1992 Reduced virulence of a *Listeria monocytogenes* phospholipase-deficient mutant obtained by transposon insertion into the zinc metalloprotease gene. *Infect Immun.* **60**(3): p. 916-21.

[135]**Rea, R.B., C.G. Gahan und C. Hill**, 2004 Disruption of putative regulatory loci in *Listeria monocytogenes* demonstrates a significant role for Fur and PerR in virulence. *Infect Immun.* **72**(2): p. 717-27.

[136]**Rouquette, C., C. de Chastellier, S. Nair und 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**(6): p. 1235-45.

[137]**Rouquette, C., M.T. Ripio, E. Pellegrini, J.M. Bolla, R.I. Tascon, J.A. Vazquez-Boland und P. Berche**, 1996 *Identification of a ClpC ATPase required for stress tolerance and in vivo survival of Listeria monocytogenes.* *Mol Microbiol.* **21**(5): p. 977-87.

[138]**Salotra, P., D.K. Singh, K.P. Seal, N. Krishna, H. Jaffe und R. Bhatnagar**, 1995 *Expression of DnaK and GroEL homologs in Leuconostoc esenteroides in response to heat shock, cold shock or chemical stress.* *FEMS Microbiol Lett.* **131**(1): p. 57-62.

[139]**Sanger, J.M., J.W. Sanger und 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**(9): p. 3609-19.

[140]**Schaumburg, J., O. Diekmann, P. Hagendorff, S. Bergmann, M. Rohde, S. Hammerschmidt, L. Jansch, J. Wehland und U. Karst**, 2004 *The cell wall subproteome of Listeria monocytogenes.* *Proteomics.* **4**(10): p. 2991-3006.

[141]**Schuchat, A., B. Swaminathan und C.V. Broome**, 1991 *Epidemiology of human listeriosis.* *Clin Microbiol Rev.* **4**(2): p. 169-83.

- [142] **Schuchat, A., B. Swaminathan und C.V. Broome**, 1991 *Listeria monocytogenes* CAMP reaction. Clin Microbiol Rev. **4**(3): p. 396.
- [143] **Schuller, S., S. Kugler und W. Goebel**, 1998 Suppression of major histocompatibility complex class I and class II gene expression in *Listeria monocytogenes*-infected murine macrophages. FEMS Immunol Med Microbiol. **20**(4): p. 289-99.
- [144] **Seeliger, H.P.R. und D. Jones**, 1986 *Genus Listeria*. Bergey's manual of systematic bacteriology. **Vol 2**: p. p1235-1245.
- [145] **Sheehan, B., C. Kocks, S. Dramsi, E. Gouin, A.D. Klarsfeld, J. Mengaud und P. Cossart**, 1994 *Molecular and genetic determinants of the Listeria monocytogenes infectious process*. Curr Top Microbiol Immunol. **192**: p. 187-216.
- [146] **Smith, G.A., D.A. Portnoy und J.A. Theriot**, 1995 Asymmetric distribution of the *Listeria monocytogenes* ActA protein is required and sufficient to direct actin-based motility. Mol Microbiol. **17**(5): p. 945-51.
- [147] **Stritzker, J., J. Janda, C. Schoen, M. Taupp, S. Pilgrim, I. Gentschev, P. Schreier, G. Geginat und W. Goebel**, 2004 *Growth, virulence, and immunogenicity of Listeria monocytogenes aro mutants*. Infect Immun. **72**(10): p. 5622-9.
- [148] **Theriot, J.A.**, 1992 *Bacterial pathogens caught in the actin*. Curr Biol. **2**(12): p. 649-51.
- [149] **Theriot, J.A. und T.J. Mitchison**, 1992 *Comparison of actin and cell surface dynamics in motile fibroblasts*. J Cell Biol. **119**(2): p. 367-77.
- [150] **Theriot, J.A. und T.J. Mitchison**, 1992 *The nucleation-release model of actin filament dynamics in cell motility*. Trends Cell Biol. **2**(8): p. 219-22.
- [151] **Theriot, J.A., T.J. Mitchison, L.G. Tilney und D.A. Portnoy**, 1992 The rate of actin-based motility of intracellular *Listeria monocytogenes* equals the rate of actin polymerization. Nature. **357**(6375): p. 257-60.
- [152] **Thompson, D.E., J.T. Balsdon, J. Cai und M.D. Collins**, 1992 *Studies on the ribosomal RNA operons of Listeria monocytogenes*. FEMS Microbiol Lett. **75**(2-3): p. 219-24.
- [153] **Tilney, L.G., P.S. Connelly und D.A. Portnoy**, 1990 *Actin filament nucleation by the bacterial pathogen, Listeria monocytogenes*. J Cell Biol. **111**(6 Pt 2): p. 2979-88.
- [154] **Tilney, L.G. und D.A. Portnoy**, 1989 Actin filaments and the growth, movement, and spread of the intracellular bacterial parasite, *Listeria monocytogenes*. J Cell Biol. **109**(4 Pt 1): p. 1597-608.
- [155] **Trost, M., D. Wehmhoner, U. Karst, G. Dieterich, J. Wehland und L. Jansch**, 2005 *Comparative proteome analysis of secretory proteins from pathogenic and nonpathogenic Listeria species*. Proteomics. **5**(6): p. 1544-57.
- [156] **Tullius, M.V., G. Harth und M.A. Horwitz**, 2003 Glutamine synthetase GlnA1 is essential for growth of *Mycobacterium tuberculosis* in human THP-1 macrophages and guinea pigs. Infect Immun. **71**(7): p. 3927-36.
- [157] **Vazquez-Boland, J.A., C. Kocks, S. Dramsi, H. Ohayon, C. Geoffroy, J. Mengaud und 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**(1): p. 219-30.

- [158]**Vazquez-Boland, J.A., M. Kuhn, P. Berche, T. Chakraborty, G. Dominguez-Bernal, W. Goebel, B. Gonzalez-Zorn, J. Wehland und J. Kreft, 2001** *Listeria pathogenesis and molecular virulence determinants*. Clin Microbiol Rev. 14(3): p. 584-640.
- [159]**Wadsworth, S.J. und H. Goldfine, 1999** *Listeria monocytogenes phospholipase C-dependent calcium signaling modulates bacterial entry into J774 macrophage-like cells*. Infect Immun. 67(4): p. 1770-8.
- [160]**Washburn, M.P. und J.R. Yates, 3rd, 2000** *Analysis of the microbial proteome*. Curr Opin Microbiol. 3(3): p. 292-7.
- [161]**Weeks, M.E., D.C. James, G.K. Robinson und C.M. Smales, 2004** *Global changes in gene expression observed at the transition from growth to stationary phase in Listeria monocytogenes ScottA batch culture*. Proteomics. 4(1): p. 123-35.
- [162]**Wiedmann, M., T.J. Arvik, R.J. Hurley und K.J. Boor, 1998** *General stress transcription factor sigmaB and its role in acid tolerance and virulence of Listeria monocytogenes*. J Bacteriol. 180(14): p. 3650-6.
- [163]**Wilkins, M.R., R.D. Appel, J.E. Van Eyk, M.C. Chung, A. Görg, M. Hecker, L.A. Huber, H. Langen, A.J. Link, Y.K. Paik, S.D. Patterson, S.R. Pennington, T. Rabilloud, R.J. Simpson, W. Weiss und M.J. Dunn, 2006** *Guidelines for the next 10 years of proteomics*. Proteomics. 6(1): p. 4-8.
- [164]**Wilkins, M.R., E. Gasteiger, J.C. Sanchez, A. Bairoch und D.F. Hochstrasser, 1998** *Two-dimensional gel electrophoresis for proteome projects: the effects of protein hydrophobicity and copy number*. Electrophoresis. 19(8-9): p. 1501-5.
- [165]**Williams, T., B. Joseph, D. Beier, W. Goebel und M. Kuhn, 2005** *Response regulator DegU of Listeria monocytogenes regulates the expression of flagella-specific genes*. FEMS Microbiol Lett. 252(2): p. 287-98.
- [166]**Wuenscher, M.D., S. Kohler, A. Bubert, U. Gerike und 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(11): p. 3491-501.
- [167]**Yates, J.R., 3rd, J.K. Eng und A.L. McCormack, 1995** *Mining genomes: correlating tandem mass spectra of modified and unmodified peptides to sequences in nucleotide databases*. Anal Chem. 67(18): p. 3202-10.
- [168]**Zhu, H., M. Bilgin und M. Snyder, 2003** *Proteomics*. Annu Rev Biochem. 72: p. 783-812.
- [169]**Zhu, W., J. Venable, C.S. Giometti, T. Khare, S. Tollaksen, A.J. Ahrendt und J.R. Yates, 3rd, 2005** *Large-scale muLC-MS/MS for silver- and Coomassie blue-stained polyacrylamide gels*. Electrophoresis. 26(23): p. 4495-507.

## 8. Anhang

### 8.1 Abkürzungen

A	Adenosin
Abb.	Abbildung
ActA/actA	Aktin-bindender Faktor A/-Gen
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosintriphosphat
B.	Bacillus
BHI	Brain Heart Infusion
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
Da	Dalton
DEPC	Diethylpyrocarbonat
deion.	deionisiert
dest.	destilliert
d.h.	das heißt
DMFA	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Dnase	Desoxyribonuklease
DTT	Dithiothreitol
E.	Escherichia
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
et al.	und andere
EtOH	Ethanol
evtl.	eventuell
F-Aktin	filamentöses Aktin
g	Gramm
G-Aktin	globuläres Aktin
H	Stunde
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinethansulfonsäure

HSPG	Heparansulfat-Proteoglykane
i.d.R.	in der Regel
InIA/inIA	Internalin A/-Gen
Kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
KE	Klett-Einheiten
Km	Kanamycin
kV	Kilovolt
l	Liter
L.	Listeria
LB	Luria-Bertani
LLO/hly	Listeriolysin O/-Gen
log.	logarithmisch
LRR's	Leucin-reiche Repeats
Lsg.	Lösung
LZZ	Lebendzellzahl
μ	mikro (10 <sup>-6</sup> )
m	milli (10 <sup>-3</sup> )
M	Molar
MEM	Minimum Essential Medium
min.	Minute
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
Mpl/mpl	Metalloprotease/-Gen
mRNA	Messenger RNA
MW	Molekulargewicht
n	nano (10 <sup>-9</sup> )
N	Normal
OD...	optische Dichte bei ...nm
o.g.	oben genannt
ORF	Open Reading Frame
p	pico (10 <sup>-12</sup> )
p60/iap	60 kDa-Protein/-Gen
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PC-PLC/plcB	Phosphatidylcholin-spezifische Phospholipase C/-Gen
PCR	Polymerase Chain Reaction
PNK	Polynukleotidkinase
PrfA/prfA	Positiver Regulationsfaktor A/-Gen
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
Rpm	Umdrehungen pro Minute
rpoB	RNA-Polymerase (β-Untereinheit)
RT	Raumtemperatur; Reverse Transkription
S	Sekunde
s.	siehe

---

SDS	Natriumdodecylsulfat
s.o.	siehe oben
SOD/sod	Superoxiddismutase/-Gen
sog.	So genannt
s.u.	siehe unten
Sv	Serovar
T	Thymidin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Tris	Tetramethyl Rhodamine Isocyanat
U	Unit (Einheit)
u.a.	unter anderem
ÜN	über Nacht
ÜNK	Übernachtkultur
UV	Ultraviolett
vgl.	vergleiche
Vol.	Volumen
v/v	„volume to volume“
W	Watt
w/v	„weight to volume“
WT	Wildtyp
z.B..	zum Beispiel
z.T.	zum Teil



# Lebenslauf

---

## **Persönliche Daten:**

Petra Herrmann  
geb. am 08.02.1972 in Künzelsau, deutsch

## **Schule:**

**05/1992** Allgemeine Hochschulreife am Dietrich-Bonhoeffer Gymnasium, Wertheim

## **Berufsausbildung:**

**10/1992–09/1995** Ausbildung zur Krankenschwester am Klinikum der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg

## **Hochschulbildung:**

**10/1995–04/2001** Studium der Biologie an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg mit dem Abschluss **Diplom Biologin Univ.** mit der Gesamtnote „sehr gut“.

- *Mikrobiologie (Hauptfach)*
- *Biochemie (1. Nebenfach)*
- *Zell-und Entwicklungsbiologie (2. Nebenfach)*

**04/2000–04/2001** Anfertigung der Diplomarbeit

### **Diplomarbeit:**

- *„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“*

## **Doktorarbeit:**

**06/2001–09/2004** Anfertigung der Dissertation am Lehrstuhl für Mikrobiologie der Universität Würzburg.

**Dissertation:**

- „Entwicklung und Evaluierung neuer Methoden zur Analyse des Proteoms von *Listeria monocytogenes* in infizierten Wirtszellen“

**Studium:**

**10/2003-11/2005** Anglikum, Englisch  
Studienelement mit Zertifikat am Zentrum für  
Sprachen und Mediendidaktik an der Julius-Maximilians-  
Universität Würzburg.

**Berufliche Tätigkeit:**

**10/2005-05/2008** Clinical Research Associate bei  
Pharmaceutical Research Associates International  
GmbH, Mannheim ([www.praintl.com](http://www.praintl.com)).  
Abschluss des Traineeprogramms "Clinical Research  
Associates Foundations Program" mit Zertifikat.

**06/2008-12/2008** Clinical Research Associate bei  
AstraZeneca GmbH, Wedel ([www.astrazeneca.de](http://www.astrazeneca.de)).

## Publikationen

**Gustavo Domínguez-Bernal, Stefanie Müller-Altrock, Bruno González Zorn, Mariela Scotti, Petra Herrmann, Héctor J.Monzó, Lizeth Lacharme, Jürgen Kreft and José A. Vázquez-Boland**, 2006 A spontaneous genomic deletion in *Listeria ivanovii* identifies LIPI-2, a species-specific pathogenicity island encoding sphingomyelinase and numerous internalins. Mol. Microbiol. 2006 Jan;59 (2):415-32.