

**Entwicklung eines „DNA Delivery“ Systems
auf der Basis von
Virulenz-attenuierten Listerien**



DISSERTATION

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

vorgelegt von

Sabine Pilgrim

aus Wehrda jetzt Marburg

Würzburg 2002

Eingereicht am: 30.10. 2002

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender: Herr Prof. Dr. Hedrich

Gutachter : Herr Prof. Dr. Goebel

Gutachter: Frau Prof. Dr. Schimpl

Tag des Promotionskolloquiums: 05. 02. 2003

Doktorurkunde ausgehändigt am:

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

Neben dem akademischen Grad „Diplom-Humanbiologin Univ.“ habe ich keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

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

Würzburg, den 30.10.2002

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Werner Goebel für die Betreuung und für die ständige Unterstützung bei dieser Arbeit. Mit seiner Begeisterungsfähigkeit trug er wesentlich dazu bei, dass die Arbeit viel Spaß gemacht hat.

Frau Prof. Dr. Schimpl danke ich besonders für die Betreuung meiner immunologischen Projekte und für die Übernahme der Zweitkorrektur.

Bei Herrn Dr. Ivaylo Gentshev möchte ich mich für die freundliche Aufnahme im Labor, für seine Betreuung und für seine ständige Diskussionsbereitschaft bedanken.

Mein großer Dank gilt weiterhin folgenden Personen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

- Herrn Dr. Michael Kuhn für die sehr gute Zusammenarbeit und für konstruktive Diskussionen,
- Herrn Prof. Dr. Kreft und Silke Weber für ihre Hilfsbereitschaft,
- allen Mitarbeitern des Institutes und besonders denen aus Labor C216 für das angenehme Arbeitsklima,
- Birgit Bergmann, Juan Carlos Sepulveda-Arias und Eva Rothenberg für ihre Hilfe bei diversen Experimenten,
- und der elektronenmikroskopischen Abteilung des Biozentrums für die mehr als freundliche Hilfe.

Bedanken möchte ich mich auch bei dem Graduiertenkolleg GK520 „Immunomodulation“ für die finanzielle Unterstützung, sowie bei allen Graduierten für die gemeinsam verbrachten, unterhaltsamen Abende.

Ein ganz liebes Dankeschön geht an meine Eltern Anneliese und Klaus Pilgrim, die mich in allen Bereichen unterstützt haben, und an Markus Beck, der (nicht nur durch das Gießen von ca. 1000 BHI-Platten) wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

INHALTSVERZEICHNIS

1. ZUSAMMENFASSUNG	1
2. EINLEITUNG	
2.1 Bakterielle „DNA delivery“ Systeme	3
2.1.1 DNA-Vakzinierung.....	3
2.1.2 Bakterien als Vektoren von DNA-Vakzinen.....	6
2.2 <i>Listeria monocytogenes</i> als Vektor eines „DNA delivery“ Systems	10
2.2.1 Allgemeine Mikrobiologie.....	10
2.2.2 Pathogenese.....	11
2.2.3 Die experimentelle murine Listeriose.....	12
2.2.4 Immunologie einer <i>L. monocytogenes</i> Infektion.....	14
2.2.5 Infektionszyklus und Virulenzfaktoren.....	15
2.2.6 Listerien-spezifische Bakteriophagen.....	19
2.2.7 Das Protein p60 von <i>L. monocytogenes</i>	20
2.3 Ziel dieser Arbeit	23
3. MATERIAL	
3.1 Bakterienstämme	24
3.2 Plasmide	25
3.3 Oligonukleotide	27
3.4 Versuchstiere	28
3.5 Antikörper	28
3.6 Zellkultur-Medien	29
3.7 Enzyme, Chemikalien und Kits	29
3.8 Verbrauchsmaterial	30
3.9 Geräte	30

4. METHODEN

4.1 Allgemeine Arbeiten mit Bakterien	32
4.1.1 Kultivierung von <i>E. coli</i>- und <i>Listeria</i>- Stämmen	32
4.1.2 Herstellung von Glycerinstocks	33
4.1.3 Transformation von Plasmiden in <i>Listeria</i>	33
4.1.4 Bestimmung der Segregationsstabilität von Plasmiden in <i>Listeria</i>	34
4.1.5 Austausch von Plasmiden in der Deletionsmutante $\Delta trpS/ ptrpS$	34
4.2 Molekularbiologische Arbeiten	34
4.2.1 Klonierung von DNA, Übersicht	34
4.2.1.1 Isolation von genomischer DNA aus Bakterienzellen	35
4.2.1.2 Herstellung von Schnell-Lysat aus <i>E. coli</i> oder <i>Listeria</i> Zellen	35
4.2.1.3 Präparation von Plasmid-DNA	36
4.2.1.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	38
4.2.1.5 Reinigung von DNA aus PCR-Ansätzen	40
4.2.1.6 Verdau von DNA mit Restriktions-Endonukleasen	41
4.2.1.7 Dephosphorelierung von Plasmid-DNA	42
4.2.1.8 Agarose-Gel-Elektrophorese	42
4.2.1.9 Präparation von DNA aus Agarose-Gelen	44
4.2.1.10 Ligation von DNA-Fragmenten in einen Vektor	44
4.2.1.11 Herstellung von kompetenten <i>E. coli</i> -Zellen	45
4.2.1.12 Transformation von Plasmiden in <i>E. coli</i>	45
4.2.1.13 Sequenzierung von DNA	46
4.2.2 Southern Blot Analyse	47
4.2.2.1 Herstellung des DNA-Probengels	47
4.2.2.2 Aufbau des Kapillar-Blots	48
4.2.2.3 Herstellung und Markierung der DNA-Sonde	49
4.2.2.4 Hybridisierung	49
4.2.2.5 Detektion der markierten Sonde	50
4.2.3 Reverse Transkriptions-PCR	50
4.2.3.1 Präparation von RNA	50
4.2.3.2 DNase-Behandlung von RNA	51
4.2.3.3 Reverse Transkription und cDNA-PCR	51
4.2.4 Konstruktion von <i>Listeria</i> Deletionsmutanten	52
4.2.5 Rekombinante PCR-Technik	55
4.3 Proteinanalytische Methoden	56
4.3.1 Präparation bakterieller Proteine für SDS-PAGE	56
4.3.2 SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE)	57
4.3.3 Färbung eines SDS-Polyacrylamid-Gels mit Coomassie Blau	58
4.3.4 Western Blot Analyse	58
4.3.5 Kolonie-Immunoblot	60
4.4 Genexpression und Reinigung der Expressionsprodukte	61
4.4.1 Genexpression im pQE30-Vektor	61
4.4.2 Präparation von löslichen Expressionsprodukten für die Affinitäts- chromatografie	62

4.4.3 Reinigung eines Expressionsproduktes über Nickel-Chelat	63
4.4.4 Endotoxin-Reinigung des Expressionsproduktes	63
4.5 Zweidimensionale Gel-Elektrophorese	64
4.5.1 Proteinextraktion von <i>Listeria</i> -Gesamtproteinen	64
4.5.2 Bestimmung der Proteinkonzentration	65
4.5.3 Auftrennung der Proteine in der ersten Dimension	66
4.5.4 Auftrennung der Proteine in der zweiten Dimension	67
4.5.4.1 Herstellung der SDS-Gele	67
4.5.4.2 Äquilibration von fokussierten IPG-Strips	68
4.5.5 Färbung von 2D-Gele mit Silbernitrat	68
4.6 Elektronenmikroskopie	69
4.6.1 Transmissions-elektronenmikroskopische Präparate von <i>Listerien</i>	69
4.6.2 Transmissions-elektronenmikroskopische Präparate von intrazellulären <i>Listerien</i>	70
4.6.3 Raster-elektronenmikroskopische Präparate von <i>Listerien</i>	71
4.6.4 Immuno-Gold-Markierung von <i>Listerien</i>	72
4.7 Arbeiten mit Zellkulturen	73
4.7.1 Passagieren von Zellen	74
4.7.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen	75
4.7.3 Lebendzellzahlbestimmung mittels Trypanblau-Färbung	76
4.7.4 Herstellung von Bakterienaliquots für Infektionsversuche	76
4.7.5 Infektion verschiedener Zellen mit <i>Listerien</i>	76
4.7.5.1 Adhärenz-Test	78
4.7.5.2 Invasions-Test, „Gentamycin-survival assay“	78
4.7.6 Transfektion von Zellen	79
4.7.7 Färbung von Zellen nach Giemsa	80
4.7.8 Durchflusszytometrie von EGFP-exprimierenden Zellen	80
4.8 In vivo- und Immunologische Arbeiten	81
4.8.1 Infektion von Mäusen mit <i>Listeria</i> -Stämmen	81
4.8.2 Präparation von <i>Listerien</i> aus Milz und Leber	82
4.8.3 Immunisierung von Mäusen mit Antigen	83
4.8.4 Blutentnahme bei der Maus	83
4.8.5 Präparation und Stimulation von Milzzellen	84
4.8.6 Isolation von Dendritischen Zellen mit Hilfe eines Metrizamid-Gradienten	85
4.8.7 Proliferationstest	86
4.8.8 IFN- γ und IL-2 ELISA	87
4.8.9 anti-p60 und anti-KMP-11 ELISA	88
4.9 Spezielle Methoden	89
4.9.1 Immunfluoreszenz Analyse von intrazellulären <i>Listerien</i>	89
4.9.2 Immunfluoreszenz-Analyse von extrazellulären <i>Listerien</i>	90
4.9.3 Kettenzerfallstest	91
4.9.4 Lecithinase-Test	91
4.9.5 Herstellung eines Zymogramms	92

5. ERGEBNISSE

5.1 Attenuierte <i>Listeria</i>-Stämme als Vektoren von „DNA delivery“ Systemen	93
5.1.1 Charakterisierung des Stammes <i>L. monocytogenes</i> Δiap	94
5.1.1.1 Konstruktion der <i>L. monocytogenes</i> Deletionsmutante Δiap	94
5.1.1.2 Nachweis der Expression von p60 in Δiap , mit u. ohne p60-Komplementation <i>in trans</i>	96
5.1.1.3 Konstruktion einer <i>iap</i> ⁺ Revertante zur Komplementation von Δiap <i>in cis</i>	97
5.1.1.4 Zell-Morphologie von <i>L. monocytogenes</i> Δiap	99
5.1.1.5 Kettenzerfall von Δiap mit gereinigtem p60, Wildtyp-Überstandsproteinen oder Ultraschall	102
5.1.1.6 Replikation von Δiap in BHI-Medium und im Zytosol von Makrophagen	104
5.1.1.7 Expression verschiedener Virulenz-Proteine	105
5.1.1.8 Invasion und Adhärenz von Δiap in und an verschiedene Wirtszellen	109
5.1.1.9 Infektion von BALB/c Mäusen mit Δiap	111
5.1.1.10 Intra- und interzelluläre Motilität von Δiap	114
5.1.1.11 Lokalisation von ActA und p60 auf der bakteriellen Oberfläche	118
5.1.1.12 Sekundäre Mutationen in Δiap oder <i>iap</i> ⁺ ?	120
5.1.1.13 Reproduzierbarkeit der Deletion von <i>iap</i> durch Herstellung weiterer Deletionsmutanten	124
5.1.1.14 Analyse von Δiap und <i>iap</i> ⁺ mit 2D-Gel-Elektrophorese	127
5.2 Untersuchungen zum Gentransfer mit <i>Listeria monocytogenes</i> als Vektor	130
5.2.1 Konstruktion eines „balanced lethal“ Systems für <i>Listeria monocytogenes</i>	130
5.2.1.1 Segregationsstabilität verschiedener „shuttle“-Plasmide in <i>Listeria monocytogenes</i>	130
5.2.1.2 Konstruktion des Basis-Plasmides pUNK1	132
5.2.1.3 Klonierung eines funktionellen <i>L. monocytogenes</i> <i>trpS</i> -Gens	134
5.2.1.4 Konstruktion der <i>L. monocytogenes</i> Deletionsmutante $\Delta trpS$ / pFLO- <i>trpS</i>	135
5.2.1.5 Segregationsstabilität und Austausch von Plasmiden in der $\Delta trpS$ -Deletionsmutante	137
5.2.1.6 <i>In vivo</i> -Stabilität von $\Delta trpS$ / pSP0- <i>P_{CMV}</i>	138
5.2.1.7 Konzeption und Konstruktion von Plasmiden für den Transfer und Expression von Genen unter eukaryotischer Promotorkontrolle	138
5.2.2 Charakterisierung der <i>L. monocytogenes</i> Gentransferstämme $\Delta trpS$/ pSP0- <i>P_{CMV}</i>, $\Delta trpS$/ pSP1-<i>P_{CMV}</i> und $\Delta trpS$/ pSP2-<i>P_{CMV}</i>	141
5.2.2.1 Wachstum der Stämme in BHI-Medium	141
5.2.2.2 Stabilität der Gentransfer-Stämme in verschiedenen Medien bzw. Puffern	142
5.2.2.3 Wachstum der Gentransfer-Stämme in verschiedenen Zell-Linien	144
5.2.2.4 TEM-Aufnahmen der intrazellulären Stämme $\Delta trpS$ / pSP0- <i>P_{CMV}</i> , $\Delta trpS$ / pSP1- <i>P_{CMV}</i> und $\Delta trpS$ / pSP2- <i>P_{CMV}</i>	145
5.2.2.5 Infektion von BALB/c Mäusen mit den Gentransfer-Stämmen	146
5.2.3 Untersuchungen zum Gentransfer mit den <i>L. monocytogenes</i> Stämmen $\Delta trpS$/ pSP0-<i>P_{CMV}</i>, $\Delta trpS$/ pSP1-<i>P_{CMV}</i> und $\Delta trpS$/ pSP2-<i>P_{CMV}</i>	147
5.2.3.1 <i>In vitro</i> Gentransfer-Effizienz der Stämme $\Delta trpS$ / pSP0- <i>P_{CMV}</i> , $\Delta trpS$ / pSP1- <i>P_{CMV}</i> und $\Delta trpS$ / pSP2- <i>P_{CMV}</i> nach Infektion verschiedener Zelllinien	147
5.2.3.2 Intrazelluläres Verhalten der Stämme $\Delta trpS$ / pSP0- <i>P_{CMV}</i> , $\Delta trpS$ / pSP1- <i>P_{CMV}</i> und $\Delta trpS$ / pSP2- <i>P_{CMV}</i> nach Infektion verschiedener Zell-Linien	148
5.2.3.3 Können die Stämme $\Delta trpS$ / pSP0- <i>P_{CMV}</i> , $\Delta trpS$ / pSP1- <i>P_{CMV}</i> und $\Delta trpS$ / pSP2- <i>P_{CMV}</i> Aktin polymerisieren?	151
5.2.3.4 Kolokalisation von intrazellulären Bakterien der Stämme $\Delta trpS$ / pSP0- <i>P_{CMV}</i> und $\Delta trpS$ / pSP1- <i>P_{CMV}</i> mit DsRed-exprimierenden Wirtszellen	152
5.2.3.5 Abhängigkeit der <i>in vitro</i> Gentransfer-Effizienz von der Gentamycin-Konzentration	153

5.2.4 Gentransfer mit attenuierten <i>Listeria monocytogenes</i> Stämmen	155
5.2.4.1 Virulenz-Attenuation durch Deletion von <i>actA</i> oder <i>iap</i>	155
5.2.4.2 Konstruktion der <i>L. monocytogenes</i> Deletionsmutanten $\Delta actA \Delta trpS$ / pFLO- <i>trpS</i> und $\Delta iap \Delta trpS$ / pFLO- <i>trpS</i>	156
5.2.4.3 Immunfluoreszenz-Analysen von $\Delta actA \Delta trpS$ und $\Delta iap \Delta trpS$	157
5.2.4.4 Untersuchungen zum Gentransfer mit $\Delta actA \Delta trpS$ und $\Delta iap \Delta trpS$	158
5.2.4.5 Bedeutung der interzellulären Motilität beim Gentransfer.....	159
5.2.5 Gentransfer mit alternativen Phagenlysin-Konstrukten	161
5.2.5.1. Klonierung von P _{hpr} -SP _{actA-<i>ply</i>118} , P _{actA-<i>ply</i>511} und P _{actA-<i>ply</i>511} Δ C.....	162
5.2.5.2. Gentransfer-Effizienz von P _{hpr} -SP _{actA-<i>ply</i>118} , P _{actA-<i>ply</i>511} und P _{actA-<i>ply</i>511} Δ C.....	163
5.2.6 Untersuchungen zum <i>in vivo</i> Gentransfer	165
5.3 Anwendung des „DNA Delivery“ Systems als Vakzine	167
5.3.1 Konstruktion verschiedener KMP-11 Expressionskassetten	168
5.3.2 Immunfluoreszenz-Analyse nach Transfektion von KMP-11 exprimierenden Plasmiden	169
5.3.3 Expression und Aufreinigung von rKMP-11	170
5.3.4 Infektion von BALB/c Mäusen mit KMP-11 transferierenden Listerien	171
5.3.4 Messung der proliferativen Antwort	172
5.3.5 Messung von Zytokinen	173
5.3.6 Analyse der murinen Seren	177
6. DISKUSSION	
6.1 Die Deletionsmutante Δiap unterscheidet sich von den Raumutanten	179
6.2 Δiap lässt sich nicht <i>in trans</i> komplementieren	180
6.3 Die Expression anderer Proteine in Δiap	181
6.4 Die Beteiligung von <i>iap</i> an der Invasion in Wirtszellen	183
6.6 Ist <i>iap</i> ein essentielles Gen?	185
6.5 Ist <i>iap</i> ein Virulenzfaktor von <i>L. monocytogenes</i> ?	186
6.6 Die Lokalisation von ActA auf der Oberfläche von Δiap	187
6.7 Das $\Delta trpS$ „Balanced-lethal“ Plasmid System	189
6.8 Die Rolle des Phagenlysin 118 bei der intrazellulären Freisetzung von DNA	190
6.9 Die Bedeutung der interzellulären Motilität von <i>L. monocytogenes</i> beim <i>in vitro</i> „DNA delivery“	192
6.10 Attenuierte Listerien als Vektoren in „DNA delivery“ Systemen	193
6.11 KMP-11 als Antigen bei der <i>in vivo</i> Freisetzung von Vakzine DNA	194
7. LITERATUR	196
8. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	209
9. ANHANG	211
10. CURRICULUM VITAE	212
11. PUBLIKATIONEN	213

1. Zusammenfassung

Virulenz-attenuierte Bakterien sind geeignete Vektoren für den Transport von Vakzine-DNA in das Zytosol von Antigen-präsentierenden Zellen („DNA delivery“). In dieser Arbeit wurde dazu das intrazelluläre Bakterium *Listeria monocytogenes* verwendet, welches sich im Zytosol von Zellen vermehrt und fortbewegt. Ausgestattet mit einer intrazellulären Lysis-Kassette kann *Listeria in vitro* effektiv Plasmid-DNA in das Zytosol verschiedener Zelltypen freisetzen.

Zur Virulenz-Attenuierung wurde das Gen *iap* im Chromosom des Bakteriums deletiert. Der daraus resultierte Stamm, in Folgenden als Δiap bezeichnet, erwies sich als hoch attenuiert im Modell der murinen Listeriose. Diese Attenuation konnte auf einen Defekt in der Beweglichkeit der Bakterien innerhalb von Wirtszellen zurückgeführt werden, da sich bei diesem Stamm das Protein ActA, das essentiell für die Aktin-basierte Motilität von *L. monocytogenes* ist, fehlerhaft auf der Oberfläche der Bakterien anordnet. Zusätzlich konnte demonstriert werden, dass Δiap in der Zellteilung beeinträchtigt ist und deshalb eine veränderte Morphologie aufweist.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein so genanntes „Balanced-lethal“ System etabliert. Dazu wurde das essentielle Gens *trpS* im Chromosom deletiert, während gleichzeitig eine *trpS*-Expressions-Kassette auf einem Vakzine-Plasmid inseriert wurde. Dieses System gewährleistet, dass das Trägerbakterium dieses Plasmid weder *in vitro* noch *in vivo* verliert. Dies ist besonders wichtig im Hinblick auf eine bakteriolytische Lysis-Kassette, welche ebenfalls auf diesem Plasmid kodiert ist. Es wurden verschiedene Lysis-Kassetten, die alle aus einem *Listeria*-spezifischen Phagenlysin und einem vorangestellten zytosolischen listeriellen Promotor zusammengesetzt waren, miteinander verglichen. Dabei wurde beobachtet, dass die für die Übertragung von Plasmid-DNA in das Zytosol von Wirtszellen wirksamste Phagenlysin-Kassette ($P_{actA-ply118}$) die Bakterien *in vitro* nur partial abtötet, während sie *in vivo* zu einer besonders hohen Attenuation der Bakterien führt.

Unter Verwendung dieses „DNA delivery“ Systems wurden Mäuse oral mit Listerien infiziert, die ein DNA-Vakzine-Plasmid zur Expression des *Leishmania* Antigens KMP-11 trugen. Dabei konnte bei 27 % aller Tiere, die zweimal mit diesen Listerien infiziert worden sind, eine KMP-11 spezifische, proliferative Immunantwort gemessen werden.

Listerien, die einen Defekt in ihrer Motilität besitzen (Δiap , $\Delta actA$), erwiesen sich darin beeinträchtigt, Plasmid-DNA im Zytosol von Zellen freizusetzen. Anhand dieser Stämme konnte gezeigt werden, dass die Fähigkeit von *L. monocytogenes*, sich innerhalb von Zellen zu bewegen und in benachbarte Zellen einzudringen eine wichtige Voraussetzung für einen effizienten Transfer von Plasmid-DNA *in vitro* darstellt.

Summary

Virulence-attenuated bacteria are useful carriers to introduce a DNA vaccine into antigen presenting cells (DNA delivery). To this end, the intracellular bacterium *Listeria monocytogenes* was used in this work, which is able to replicate and spread inside host cells. Hence *Listeriae* are able to efficiently release plasmid DNA within the cytosol *in vitro* when they are provided with a cytosolic lysis cassette. The expression of the antigen by the cell leads to the presentation of antigenic epitopes on the cell's major histocompatibility complex (MHC) class I molecules, due to the antigen being endogenous. This stimulates the activation of CD8⁺ T cells which are important for clearance of tumours, parasites and virus infected cells.

In order to create a virulence-attenuated carrier strain the gene *iap* was deleted in the chromosome of the bacterium. The resulting strain, designated as Δiap , was shown to be highly attenuated in mice. This was due to a defect of the intracellular motility since ActA, a protein which is necessary for actin-based motility of *Listeria*, was localised incorrectly at the bacterial surface. Additionally, it was demonstrated that Δiap is impaired in cell division which leads to an altered cell morphology.

In this work a so-called “balanced-lethal” plasmid system was established. The essential gene *trpS* was deleted from the chromosome of *L. monocytogenes* and a *trpS* transcription unit was inserted in a vaccine DNA plasmid thus ensuring that no plasmid loss happens *in vitro* and also within the host organism. This is in particular important in terms of a bacteriolytic lysis cassette which is also encoded by the plasmid. Different lysis cassettes were tested consisting of a *Listeria*-specific phage lysin and an intracellular promoter of *Listeria*. The cassette P_{actA}-*ply118* was found to be most effective due to its DNA delivery capacity but it mediates only a partial lysis of the intracellular bacteria. However, this cassette leads to a high attenuation of *Listeria* in mice.

Using this DNA delivery system mice were orally infected with *Listeria* harbouring a KMP-11 expression plasmid. 27 % of animals infected twice exhibited a specific proliferative response to the leishmanial antigen KMP-11.

Listeriae with a defect in their spreading capacity (Δiap , $\Delta actA$) were impaired in the cytosolic release of plasmid DNA. With these strains it was demonstrated, that spreading is an important prerequisite for *L. monocytogenes* to be an efficient DNA delivery carrier *in vitro*.

2. Einleitung

2.1 Bakterielle „DNA delivery“ Systeme

Bakterielle „DNA delivery“ Systeme (Gentransfer-Systeme) stellen eine neuartige Strategie dar, DNA-Vakzine *in vivo* mit Hilfe von bakteriellen Trägern zu ihren Zielorten, wie u.a. das Zytosol von Antigen-präsentierenden Zellen (APC), zu transportieren. Für den Transport der Vakzine-DNA eignen sich besonders attenuierte intrazelluläre Pathogene wie das Bakterium *Listeria monocytogenes*. Zur übersichtlicheren Einführung in das Thema werden zunächst die Grundlagen der DNA-Vakzinierung näher erläutert.

2.1.1 DNA-Vakzinierung

Konventionelle Vakzine werden aus attenuierten oder abgetöteten Erregern, aus einem modifizierten Produkt (Toxoid) oder aus Bestandteilen eines Erregers (wie z.B. den Kapseln) hergestellt. Bei der Anwendung von nicht-lebenden Vakzinen müssen wiederholte und relativ hohe Dosen appliziert werden, wobei hauptsächlich humorale Immunantworten generiert werden und die erworbene protektive Immunität nicht lange anhält. Bei der Verwendung von lebenden attenuierten Erregern werden dagegen verhältnismäßig niedrige Dosen zur Induktion von humoralen sowie Zell-vermittelten Immunantworten benötigt, wobei die Protektion sehr viel länger anhalten kann. Erfolgreiche Vakzine gegen einige Infektionserreger wie z.B. HIV, Herpes Virus, intrazelluläre Parasiten oder gegen Tumore müssen aber noch entwickelt werden. Dabei sind die wichtigsten Voraussetzungen für solche Vakzine, dass diese sicher sind, dass sie möglichst auch über den endogenen Weg prozessiert werden und dass neben einer humoralen Immunantwort auch zytotoxische T-Zellen (CTL) aktiviert werden, welche die infizierten oder malignen Zellen abtöten können.

Wolff *et al.* konnten 1990 erstmals demonstrieren, dass die direkte intramuskuläre Injektion von Plasmid-DNA, welche verschiedene Gene für Reporter-Proteine kodiert, die Expression dieser Proteine in Muskelzellen induzieren kann. Dazu musste diese DNA in den Zellkern dieser Zellen gelangt sein, wo dann die Transkription der Reporter-Gene stattgefunden hat. Diese Beobachtung konnte von Tang *et al.* um den Aspekt erweitert werden, dass eine intradermale Applikation von DNA-beladenen Goldprojektilen mit Hilfe einer „gene gun“ in Mäusen eine spezifische humorale Immunantwort induzieren kann, wenn das Antigen auf der Plasmid-DNA kodiert wird (Tang *et al.*, 1992).

Auch spätere Arbeiten (Ulmer *et al.* 1993, Robinson *et al.*, 1993) trugen dazu bei, die DNA-Vakzinierung als alternative Methode zur klassischen Vakzinierung mit attenuierten oder abgetöteten Erregern oder der Vakzinierung mit einzelnen Proteinantigenen („subunits“) zu etablieren, indem sie demonstrierten, dass DNA-Vakzinierungen protektive humorale sowie zelluläre Immunantworten in verschiedenen Tiermodellen auslösen können. Tabelle 1.1 zeigt eine Zusammenfassung des Potentials der DNA-Vakzinierung im Vergleich zu klassischen Immunisierungsmethoden:

		DNA- Vakzine	attenuierte Lebendvakzine	„subunit“- Vakzine
Immunantwort	humoral (B-Zellen):	+++	+++	+++
	zellulär (CD4 ⁺):	+++ T _H 1	+/- T _H 1	+/- T _H 1
	zellulär (CD8 ⁺):	++	+++	-
Antigenpräsentation		MHC Kl. I & II	MHC Kl. I & II	MHC Kl. I & II
Immunol. Gedächtnis	humoral:	+++	+++	+++
	zellulär:	++	+++	+/-
Herstellung	Entwicklung/ Produktion:	++++	+	++
	Kosten:	+++	+	+
	Transport/ Lagerung:	+++	+	+++
Sicherheit		+++	++	++++

Tabelle 1.1: Vergleich verschiedener Vakzine-Techniken (modifiziert nach Gurunathan *et al.*, 2000).

DNA Vakzine bestehen aus gereinigter bakterieller Plasmid-DNA, welche gewöhnlich einen Replikationsursprung und ein Antibiotika-Resistenz-Gen zur Klonierung und Vermehrung in Gram-negativen Wirtsbakterien wie *E. coli* aufweist (Abb. 1.1). Am häufigsten werden dafür die

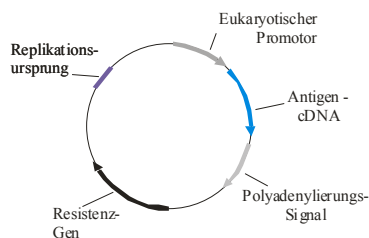


Abbildung 1.1: Schematischer Aufbau einer Plasmid-DNA Vakzine.

Resistenz-Gene für Kanamycin und Ampicillin (*bla*) verwendet, wobei letzteres nicht für eine Anwendung am Menschen zugelassen ist (Gurunathan *et al.*, 2000). Zur Expression des Antigens, welches als cDNA auf der Plasmid-DNA kodiert wird, können starke eukaryotische Promotoren wie der Zytomegalievirus „immediate early“ Promotor (P_{CMVIE}), der frühe SV40 Promotor (P_{SV40}) oder der β -Aktin-Promotor (Niwa *et al.*, 1991) verwendet werden.

Zusätzlich kann die Expression des Antigens durch ein vorangestelltes Intron wie das Intron A (Chapman *et al.*, 1991) gesteigert werden. Zur Stabilisierung der mRNA wird eine Polyadenylierungs-Sequenz verwendet. Durch eine derart

ausgestattete Transkriptionseinheit kann, nachdem das Plasmid in den Zellkern gelangen konnte, die cDNA mit hoher Effizienz von der Wirtszelle exprimiert werden.

Ein wichtiger Vorteil von bakterieller Plasmid-DNA besteht darin, dass diese immunstimulatorische Sequenzen (ISS) enthält, welche die natürliche Immunität des Wirtes beeinflussen. Solche Sequenzen bestehen aus nicht-methylierten Cytidin-Phosphat-Guanosin (CpG) –Nukleotiden, welche durch zwei 5'-Purine und zwei 3'-Pyrimidine flankiert werden (Yamamoto *et al.*, 1992, Sato *et al.*, 1996). Diese kommen in bakteriellen Genomen 20-mal häufiger vor wie im Genom von Säugetieren. Zusätzlich sind weniger als 5 % der Cytosin-Reste der CpG-Motive in bakterieller DNA methyliert, während 70-90 % dieser Reste in eukaryotischer DNA methyliert sind (Cardon *et al.*, 1994).

CpG-Motive können zum einen direkt B- und T-Zellen stimulieren (Krieg *et al.*, 1995, Bendigs *et al.*, 1999) und zum anderen Antigen-präsentierende Zellen aktivieren (Stacey *et al.*, 1996, Jakob *et al.*, 1998). Dabei kommt es zur erhöhten Produktion der Zytokine IL-6, IL-12, TNF- α , IFN- γ und IFN- α (Klinman *et al.*, 1996, Halpern *et al.*, 1996, Sato *et al.*, 1996).

Nach intramuskulärer oder intradermaler „gene gun“ Applikation kann die Antigen-kodierende Plasmid-DNA sowohl in somatischen (Muskel-) als auch teilweise in Antigen-präsentierenden Zellen nachgewiesen werden (Wolff *et al.*, 1990, Raz *et al.*, 1994, Condon *et al.*, 1996), wobei beide Zelltypen das Antigen exprimieren und über den endogenen Weg im Kontext mit MHC Klasse I Molekülen präsentieren können. Aber vornehmlich die Dendritische Zellen (DC) scheinen die Immunantwort auf ein Antigen nach einer DNA Vakzinierung auszulösen. Es konnte gezeigt werden, dass DC sowohl selbst-exprimiertes Antigen (Codon *et al.*, 1996) als auch von somatischen Zellen exprimiertes Antigen über MHC-Klasse I Moleküle präsentieren können (Ulmer *et al.*, 1996). Letzterer Mechanismus wird als „crosspriming“ bezeichnet, wobei postuliert wird, dass exogen aufgenommene Antigene ebenfalls durch einen nicht ganz geklärten Mechanismus über MHC Klasse I Moleküle präsentiert werden können (Kovacsovic-Bankowski und Rock, 1995, Reis e Sousa und Germain, 1995).

DNA Vakzine können sowohl spezifische Antikörper als auch zytotoxische T-Zellen und CD4+ T-Helfer-Zellen induzieren, wobei das Zytokinprofil dieser Zellen stark von der Applikationsart abhängt. So scheint eine intramuskuläre Injektion von Plasmid-DNA hohe Mengen an IL-2 und IFN- γ zu induzieren, was zu einer T_H1-ähnlichen Immunantwort führt während eine „gene gun“ Applikation eine T_H2-ähnliche Antwort auslöst (Donnelly *et al.*, 1997). Zusätzlich korreliert die Generierung von IgG2a Antikörpern in der Maus mit der intramuskulären Applikation, während der vorherrschende Isotyp nach einer „gene gun“ Injektion IgG1 ist (Pertmer *et al.*, 1996).

Neben den am besten untersuchten Applikationswegen (intramuskulär bzw. intradermal mittels „gene gun“) wurden eine Reihe anderer Applikationsarten studiert, wie intranasale, intravaginale und intratracheale Anwendungen, Applikationen über Aerosole oder über verschiedene Träger.

Als Trägerpartikel für DNA-Vakzine wurden neben den Goldprojektilen der „gene gun“-Methode auch Liposomen, Cochleaten (spiralförmige Liposomen-Derivate), polymere Mikropartikel sowie attenuierte virale oder bakterielle Erreger etabliert.

Als potenzielle Gefahren der DNA-Vakzinierung werden u.a. die Integration der Plasmid-DNA in das Genom der transfizierten Zelle, die Induktion von anti-DNA-Antikörpern, die Entwicklung von Autoimmunkrankheiten durch Immunantworten auf transfizierte Zellen oder die Induktion einer Toleranz anstelle der Induktion einer Immunantwort diskutiert.

2.1.2 Bakterien als Vektoren von DNA-Vakzinen

Intrazelluläre Bakterien wie *Shigella flexneri*, *Salmonella typhimurium* und *Listeria monocytogenes* oder auch *Yersinia enterocolitica* und genetisch aufgerüstete *E. coli* Stämme besitzen das Potential, Plasmid-DNA in das Zytosol von Wirtszellen zu transportieren, welche daraufhin das auf dem Plasmid kodierte Antigen exprimieren. Diese Methode wird u.a. auch als Bactofektion bezeichnet (Powell *et al.*, 1999). Man kann diese Fähigkeit auch zur *in vivo* Transfektion von Antigen-präsentierenden Zellen mit DNA-Vakzinen nutzen, wobei besonders enteroinvasive Erreger einen großen Vorteil besitzen, da diese nach oraler Applikation die immunologisch relevanten Zielzellen über den Magen-Darm-Trakt erreichen können.

Enteroinvasive Pathogene können aber nicht nur von Antigen-präsentierenden Zellen (APC) phagozytiert werden, sondern sie vermögen auch verschiedene somatische Zellen wie z.B. Darmepithelzellen zu infizieren. Shigellen und Listerien können dabei aus dem Phagosom entkommen, während Salmonellen in diesem Kompartiment überleben und replizieren können (Finlay und Falkow, 1997). Daher können Antigene potenziell sowohl in APC als auch in nicht-professionell phagozytischen Zellen exprimiert werden.

Eine wichtige Voraussetzung für die *in vivo* Anwendbarkeit eines bakteriellen Erregers als Vakzine-Vektor ist dessen angepasste Virulenz, so dass er nach Applikation keinerlei Krankheitsbild verursacht und möglichst rasch wieder aus dem Organismus eliminiert wird.

S. flexneri*, *S. typhimurium*, *E. coli* und *Y. enterocolitica

Der erste attenuierte Bakterien-Stamm, der als Träger eines eukaryotischen Expressions-Plasmides verwendet worden ist, war *Shigella flexneri* 15D (Sizemore *et al.*, 1995). Dieses Bakterium besitzt eine Deletion im Gen *asd*, welches eine Aspartat- β -Semialdehyd-Dehydrogenase kodiert. Dieses Enzym ist essentiell für die Synthese des bakteriellen Zellwand-Bestandteils Diaminopimelinsäure

(DAP). Bakterien, die mit einem pCMV β -Plasmid ausgestattet waren, konnten *in vitro* Babyhamster-Nierenzellen und *in vivo* Kornea-Gewebe des Meerschweinchens mit diesem Plasmid transfizieren, und diese Zellen exprimierten innerhalb von 24 Stunden die auf dem Plasmid kodierte β -Galaktosidase. Dabei schienen die Bakterien auf Grund ihrer gestörten Zellwandsynthese durch die *asd*-Mutation das Plasmid im Zytosol der Zellen freizusetzen. In weiteren Arbeiten konnte außerdem demonstriert werden, dass eine intranasale Gabe dieser Bakterien eine spezifische proliferative Antwort von Milzzellen und die Bildung von Antikörpern induzieren kann (Sizemore *et al.*, 1997).

Mit dem Invasin von *Y. pseudotuberculosis* ausgestattete *E. coli* Stämme können ebenfalls Expressions-Plasmide in verschiedene Zell-Linien transportieren, wobei gezeigt werden konnte, dass die Aufnahme dieser Bakterien in phagosomale Kompartimente essentiell für die Expression der Plasmid-kodierten Gene ist (Grillot-Courvalin *et al.*, 1998). Zusätzlich wurde demonstriert, dass ein *E. coli* Stamm, welche das Poren-bildende listerielle Toxin Listeriolysin O (LLO) exprimiert, noch effizienter Plasmid-DNA freisetzen kann; überraschenderweise befanden sich derart modifizierte Bakterien dennoch im phagosomalen Kompartiment. Es wurde daher diskutiert, dass die Plasmid-DNA durch LLO-induzierte Poren verstärkt in das Zytosol gelangen konnte. Diese Arbeiten zeigten zum einen, dass Bakterien zum Transfer von eukaryotischer Plasmid-DNA invasiv sein müssen und zum anderen, dass potenziell auch der Transfer von Plasmid-DNA in das Phagosom der Zelle ausreicht, damit diese zur weiteren Expression in den Zellkern gelangen kann.

Auch der attenuierte *Salmonella typhimurium* Stamm SL7207, welcher durch eine *aroA*-Mutation unfähig zur Synthese von aromatischen Aminosäuren ist, kann dem Immunsystem effizient nach oraler Applikation Antigen-kodierende Plasmid-DNA zuführen (Darji *et al.*, 1997), wobei als Antigene ActA und LLO von *L. monocytogenes* verwendet wurden. Obwohl Salmonellen nicht aus dem Phagosom ihrer Wirtszellen entkommen können, konnten nach Infektion Antigen-spezifische zytotoxische T-Zellen, T_H1-ähnliche Helferzellen und spezifische Antikörper vom IgG2a Isotyp nachgewiesen werden, was eine Translokation der Plasmid-DNA in den Zellkern mit nachfolgender Expression des Antigens voraussetzt. Außerdem konnten Mäuse durch wiederholte orale Infektionen mit *S. typhimurium*, welche ein eukaryotisches LLO-Expressions-Plasmid transportierten, gegen eine lethale Infektion mit *L. monocytogenes* geschützt werden. Der Weg, über den die Plasmid-DNA zur Expression in den Zellkern der Wirtszelle gelangte, wurde in dieser Arbeit jedoch nicht aufgeklärt.

Ähnliche Ergebnisse konnten auch mit einem *Yersinia enterocolitica* Stamm erzielt werden, wobei auf den verwendeten DNA-Vakzine-Plasmiden Antigene von *Brucella abortus* kodiert waren (Al-Mariri *et al.*, 2002). Nach intragastrischer Applikation dieser Yersinien in Mäuse konnten zum einen spezifische Antikörper-Titer (IgG2a > IgG1) und T_H1-ähnliche Immunantworten gemessen und zum anderen Protektion gegen eine Infektion mit *B. abortus* vermittelt werden.

Listeria monocytogenes

Listeria monocytogenes scheint ebenfalls ein potenziell guter Vektor für DNA-Vakzine zu sein, da sich dieses Bakterium, wie in Kapitel 2.2 ausführlich beschrieben, aus dem Phagosom seiner Wirtszelle befreien kann und im sich Zytoplasma rasch vermehrt. Zudem kann es nach oraler Applikation sehr schnell immunologisch relevante Organe wie Peyer'sche Platten, mesenteriale Lymphknoten und die Milz erreichen. Außerdem bietet *L. monocytogenes* als Gram-positives Bakterium den Vorteil gegenüber Gram-negativen Bakterien, dass es keine toxischen Lipopolysaccharide (LPS) trägt, welche mit der Synthese von Plasmid-kodierten Antigenen durch die Wirtszellen interferieren könnten (Dietrich *et al.*, 1999).

Die ersten *in vitro* Arbeiten wurde mit einem attenuierten *L. monocytogenes* Stamm ($\Delta 2$) durchgeführt, der Deletionen in den Genen *mpl*, *actA* und *plcB* aufwies (Dietrich *et al.*, 1998). Dieser Stamm erreichte in Mäusen eine um 3 Log-Stufen verringerte LD₅₀, was auf eine hohe Virulenz-Attenuation hindeutet. Damit dieser Stamm zur Freisetzung im Zytoplasma der Wirtszelle lysiert, wurde er mit einer Lysis-Kassette ausgestattet, die aus dem Gen für das Phagenlysin 118 (siehe 2.1.6) bestand, dem der Promotor für ActA vorangestellt war ($P_{actA-PLY118}$). Da dieser Promotor besonders stark in Zytoplasma der Zelle aktiv ist, versprach man sich von diesem Konstrukt eine zielgerichtete zytoplastische Lysis der Bakterien.

In den murinen Makrophagen-Zell-Linien J774A.1 und P388D.1 konnte eine teilweise Lysis der Bakterien durch das Phagenlysin beobachtet werden. Ausgestattet mit einem eukaryotischen EGFP-Expressions-Plasmid konnten Listerien ohne Lysis-Kassette einigen wenigen Zellen der Linie P388D.1 eine EGFP-Expression vermitteln, während Bakterien, welche unter dem Einfluss der Lysis-Kassette standen, 10x mehr EGFP-exprimierende Zellen erzeugen konnten. Zusätzlich konnte die Präsentation eines Ovalbumin-Epitopes (OVA257-264) auf P388D.1-Makrophagen demonstriert werden, nachdem diese Zellen mit Listerien infiziert worden waren, welche ein OVA-Expressions-Plasmid trugen.

Aber auch die Integration von eukaryotischen Expressions-Plasmiden in das Genom der Wirtszelle wurde im Rahmen dieser Arbeiten beobachtet, was ein potenzielles Risiko zur Malignität beinhaltet.

Eine andere Arbeitsgruppe konnte den Transport von eukaryotische Expressions-Plasmiden in das Zytoplasma von Wirtszellen erreichen, indem sie *L. monocytogenes* mit Hilfe des Antibiotikums Tetracyclin im Zytoplasma abtötete und dadurch desintegrierte (Hense *et al.*, 2001). Im Rahmen dieser Arbeit konnte auch gezeigt werden, dass *L. monocytogenes* zur Ausführung dieses Transfers zum einen invasiv sein und zum anderen aus dem phagosomalen Kompartiment entkommen muss. Während sich verschiedene nicht-professionell phagozytische Zell-Linien moderat transfizieren ließen, so schienen primäre Makrophagen fast unzugänglich für einen *Listeria*-vermittelten Gentransfer zu sein.

Diese Beobachtung konnte auch von Grillot-Courvalin *et al.* gemacht werden, welche den *in vitro* Gentransfer von EGFP-Expressions-Plasmiden mittels wildtypischen Stämmen von *L. monocytogenes*, *S. flexneri* und *S. typhimurium* miteinander verglichen (Grillot-Courvalin *et al.*, 2002). In dieser Arbeit wurde *L. monocytogenes* als der effizienteste *in vitro* Vektor zur Übertragung von eukaryotischer Plasmid-DNA in nicht-professionell phagozytische Zellen beschrieben.

Der erste Ansatz zum *in vivo* Transfer von eukaryotischen Expressions-Plasmiden in Wirtszellen wurde von Spreng *et al.* gezeigt: In dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass nach einer intraperitonealen Applikation des *L. monocytogenes* Stammes $\Delta 2$, welche mit oben erwähnter Phagenlysin-Kassette ausgestattet war, EGFP-Expressions-Plasmide von Peritonealmakrophagen aufgenommen worden waren, die anschließend das EGFP exprimierten (Spreng *et al.*, 2000). Bislang konnte aber weder die Expression eines Plasmid-kodierten Proteins nach oraler oder intravenöser Applikation von *L. monocytogenes* noch die Induktion einer Immunantwort durch eine DNA-Vakzine demonstriert werden, welche durch dieses Bakterium in den Wirtsorganismus transportiert worden ist.

Abbildung 1.2 fasst die Möglichkeiten der verschiedenen enteroinvasiven attenuierten Pathogene zusammen, eukaryotische Expressions-Plasmide in Antigen-präsentierende Zellen zu transportieren:

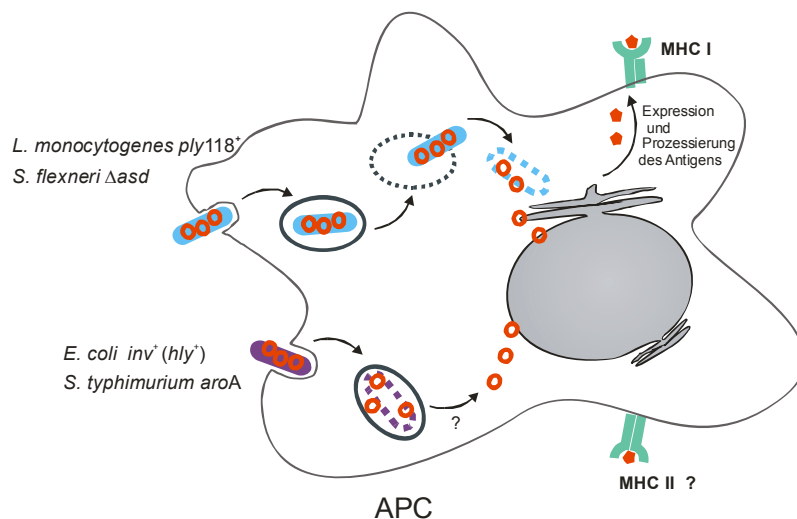


Abb. 1.2: Transport von DNA-Vakzinen in das Zytosol von Antigen-präsentierenden Zellen (APC) durch verschiedene attenuierte invasive Bakterien.

2.2 *Listeria monocytogenes* als Vektor eines „DNA delivery“ Systems

Listeria monocytogenes ist das klassische intrazelluläre Pathogen der Immunologie. Da sie in Gegensatz zu Shigellen eine Vielzahl von Labortieren infizieren zu können, stellen Listerien für die Infektionsforschung ein nahezu ideales Modellsystem sowohl für die Analyse von intrazellulären Infektionen wie auch für die Aufklärung von Immunabwehrmechanismen dar. Auf Grund seiner Fähigkeit, aus dem Phagosom ins Zytosol einer Wirtszelle zu entkommen, ist *Listeria monocytogenes* außerdem ein viel versprechender Vektor bei der Übertragung von eukaryotischen Expressions-Plasmiden in das Zytosol von Wirtszellen.

2.2.1 Allgemeine Mikrobiologie

Die Spezies *Listeria monocytogenes* gehört zu einer Gruppe von Gram-positiven Bakterien, welche eng mit *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterococcus*, *Streptococcus* und *Staphylococcus* verwandt ist (Rocourt, 1999). *Listeria spp.* sind fakultativ anaerobe, bewegliche Stäbchen, die weder Kapseln noch Sporen ausbilden können. Die Beweglichkeit ist bei 22°C besonders ausgeprägt. Bei dieser Temperatur werden peritriche Geißeln gebildet, welche bei 37°C reprimiert sind. *L. monocytogenes* wird als Oxidase-negativ, Katalase-positiv, Äsculin-positiv, CAMP-positiv und beta-hämolytisch diagnostiziert.

Listerien können außerhalb des Wirtskörpers überleben und sich vermehren und dadurch aus einer Vielzahl von Umweltquellen isoliert werden, wie z.B. dem Erdreich, Wasser, Abwasser, Nahrungsmitteln und aus menschlichem und tierischem Fäzes (Seeliger, 1961). Zusätzlich kann das Bakterium mit einer Häufigkeit von 5-10 % im Darm gesunder Menschen nachgewiesen werden (Gray und Killinger, 1966) und wird daher als opportunistischer pathogener Saprophyt betrachtet.

Bakterien des Spezies *Listeria monocytogenes* wurden erstmals 1926 von E. G. D. Murray, R. A. Webb und M. B. R. Swann als ätiologisches Agens einer durch schwere lokale bzw. systemische Infektionen verursachten Krankheit von Nagetieren beschrieben, die zuerst als mononukleäre Leukozytose und später als Listeriose bezeichnet worden ist. Von den sechs *Listeria species* sind *L. monocytogenes* und *L. ivanovii* als potenziell pathogen klassifiziert. *Listeria monocytogenes* kann sowohl den Menschen als auch andere verschiedene Säugetiere, Reptilien und Vögel infizieren. Die ersten Fälle einer humanen Listeriose wurden 1929 in Dänemark bekannt (Nyfelt, 1929).

Listeriose tritt beim Menschen nur sporadisch auf, erst in den letzten seit Anfang der 80er Jahre wurden vermehrt epidemische Ausbrüche dieser Krankheit mit einer Mortalitätsrate von bis zu 30 % (Lorber, 1997) in Nordamerika und Europa beobachtet (Schuchat *et al.*, 1991). Alle Ausbrüche konnten auf eine Kontamination von Nahrungsmitteln mit *L. monocytogenes* verschiedener

Serovare (besonders Sv1/2a, Sv1/2b und 4b) zurückgeführt werden, wodurch die Listeriose sich als eine wichtige, durch Nahrungsmittel übertragene Infektionskrankheit etabliert hat.

Listerien tolerieren einen weiten Temperaturbereich und können bei 1,5 bis 50°C wachsen (Junttila *et al.*, 1988, Walker und Stringer, 1987), wobei ihr Temperaturoptimum bei 30-37°C liegt. Zudem können sie sich bei hohen Salzkonzentrationen und niedrigen pH-Werten noch vermehren. Selbst längere Perioden des Trocknens und Gefrierens mit anschließendem Auftauen werden von diesem Bakterium toleriert, so dass Listerien konventionelle Nahrungsmittel-Konservierende Techniken überleben können (Lammerding und Doyle, 1990, Donnelly, 1994, Lou und Yousef, 1999).

Schnelle und zuverlässige Nachweise von *L. monocytogenes* erfolgen derzeit über 16S rRNA-Analyse, DNA/DNA-Hybridisierung mit *Listeria*-spezifischen Sonden, Antikörper-Detektion oder DNA-Amplifikation mittels PCR (Schuchat *et al.*, 1991, Bubert *et al.*, 1992, Kreft, J., 1992, Bubert *et al.*, 1994).

2.2.2 Pathogenese

Obwohl Listerien in der Natur weit verbreitet sind, ist die humane Listeriose eine seltene Infektion bei immunkompetenten Individuen. Die meisten Listeriose Patienten haben einen physiologischen oder pathologischen Defekt ihrer T-Zell-vermittelten Immunabwehr; Risikogruppen für Listeriose sind daher schwangere, neugeborene und ältere Menschen sowie Erwachsene mit einem geschwächtem Immunsystem und verschiedenen anderen zu Grunde liegenden Primärerkrankungen.

Da kontaminierte Nahrungsmittel die wichtigste Quelle einer Infektion mit *Listeria monocytogenes* sind, scheint der Gastrointestinaltrakt die primäre Eintrittsstelle des Bakteriums in den Wirtsorganismus zu sein (Abb. 1.3). Studien an gastrisch infizierten Meerschweinchen ergaben, dass die Bakterien die Darmbarriere durchqueren, indem sie die Enterozyten des Darmepithels invadieren und sich darin vermehren (Racz *et al.*, 1972). Diese Art der Invasion scheint zumindest auch für die humane Listeriose gültig zu sein, da *L. monocytogenes* ebenfalls seine Aufnahme in die humane Enterozyten-ähnliche Zell-Linie Caco-2 induzieren kann (Gaillard *et al.*, 1987). Bei einer listeriellen Infektion von Ratten und Mäusen wird dagegen eine andere Infektionsroute diskutiert (siehe 2.2.3).

Listerien, welche die Darmbarriere überquert haben, werden über die Lymphe oder das Blut zu den mesenterialen Lymphknoten, der Leber und der Milz transportiert (Marco *et al.*, 1992, Pron *et al.*, 1998), wobei unklar ist, wie viele Bakterien innerhalb von Zellen und wie viele eigenständig in diese Organe gelangen. In der Leber wird die Mehrheit der Bakterien zunächst abgetötet, gefolgt von einer anschließenden starken Vermehrung der Überlebenden, wobei lokale Mikroabszesse gebildet werden.

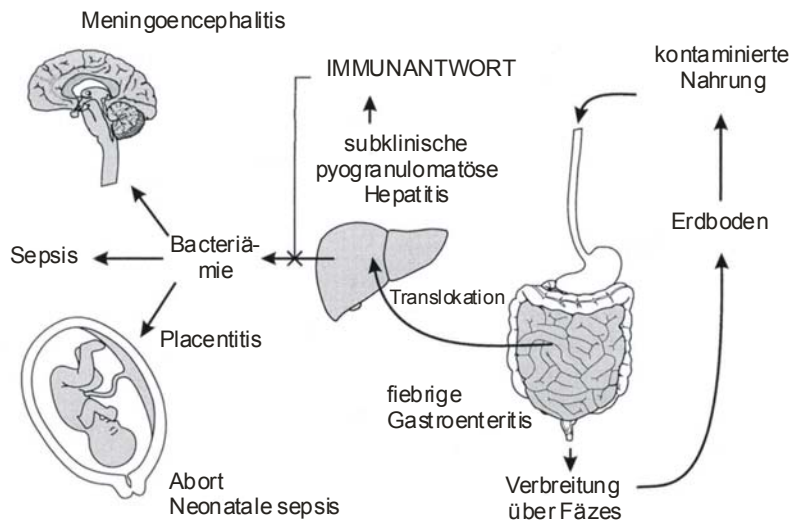


Abbildung 1.3: Pathogenese einer Infektion mit *Listeria monocytogenes* (modifiziert nach Vazquez-Boland *et al.*, 2001).

Die Etablierung der Infektion in der Leber ist dabei entscheidend für den weiteren Verlauf der Listeriose.

Zusätzlich zu den beschriebenen Organen kann *L. monocytogenes* den Fetus durch die hämatogene Überquerung der Plazentaschranke infizieren. Eine Infektion des zentralen Nervensystems äußert sich in einer Infektion der Meningen, wobei häufig auch im Hirnparenchym Infektionsherde zu finden sind (Nieman und Lorber, 1980, Lorber, 1997).

Typische Verlaufsformen einer Listeriose sind zum einen Meningoenzephalitis (in 55-70 % aller Fälle bei nicht Schwangeren) und Meningitis mit einer Mortalitätsrate um 20 % und zum anderen Sepsis (15-50 % aller Fälle) mit einer Mortalitätsrate von bis zu 70 % bei immun-geschwächten Individuen. Des Weiteren kann sich eine Listeriose als Gastroenteritis, grippeähnliche Symptome oder lokale Abszesse manifestieren. Eine Infektion während der Schwangerschaft kann zu Tot- oder Frühgeburten bzw. auch zu einer septisch oder meningitisch verlaufenden Erkrankung des Neugeborenen führen.

Faktoren wie die Empfänglichkeit des Wirtes, die aufgenommene Infektionsdosis, die Azidität des Magensaftes und die Virulenz des Erregers können dabei die klinische Manifestation erheblich beeinflussen.

2.2.3 Die experimentelle murine Listeriose

Die experimentelle Listeriose in der Maus, die 1962 von G. B. Mackaness eingeführt worden ist, diente als Prototyp eines Modells einer Infektion durch intrazelluläre Bakterien.

Im Vergleich zur humanen Listeriose und zur gastrischen Infektion von Meerschweinchen konnte in verschiedenen Studien nach oraler Infektion von Mäusen als auch Ratten mit *L. monocytogenes* keine Invasion des Darmepithels beobachtet werden. Die Bakterien wurden dagegen vorwiegend in den Peyer'schen Platten lokalisiert (MacDonald und Carter, 1980, Marco *et al.*, 1992, Marco *et al.*, 1997), wobei sie nicht über die in diesen Arealen liegenden M-Zellen zu invadieren scheinen (Daniels *et al.*, 2000). Erst kürzlich konnte dokumentiert werden, dass Dendritische Zellen aus den Peyer'schen Platten als Vektoren für Listerien dienen, welche die Bakterien aus dem Darmlumen heraus über das Darmepithel translozieren und in tiefere Gewebe transportieren können (Pron *et al.*, 2001). Bei dieser Art der Translokation scheinen die Dendritischen Zellen „tight junction“ Proteine zu exprimieren. Damit öffnen sie die „tight junctions“ der Darmepithelzellen und können anschließend Dendriten ins Darmlumen zu senden, um dort die Bakterien aufnehmen (Rescigno *et al.*, 2001).

Experimentelle Infektionen von Mäusen über die intravenöse Route haben gezeigt, dass die Bakterien sehr schnell nach Infektion kaum mehr im Blut nachweisbar sind, sondern zu 90 % in der Leber und auch in der Milz angesammelt werden (Mackaness, 1962, Conlan und North, 1991, Cousens und Wing, 2000). Die allgemeine Vorstellung war, dass die Mehrheit der Bakterien von den in der Leber residierenden Kupffer'schen Sternzellen in den ersten 6 Stunden abgetötet werden (Ebe *et al.*, 1999).

Neue Studien scheinen dem zu widersprechen: Phagozytose durch Kupffer-Sternzellen scheint nicht der prinzipielle Mechanismus zu sein, durch den Listerien dezimiert werden, sondern diese scheinen sich eher an den Sternzellen anzulagern, um dann durch angelockte Neutrophile phagozytiert zu werden (Gregory und Wing, 2002), wobei beide Zelltypen proinflammatorische Faktoren (TNF- α , IL-1 β , IL-6, MIP-1 α , MIP-1 β , MIP-2) sezernieren. Die mit Bakterien beladenen Neutrophilen werden anschließend durch Kupffer-Sternzellen phagozytiert und verdaut. Listerien replizieren in der Leber vornehmlich in den Hepatozyten, wo sie einen vollständigen intrazellulären Infektionszyklus vollziehen können und sich in benachbarte Zellen ausbreiten.

Die akute Phase der *Listeria* Infektion wird von polymorphkernigen Neutrophilen (PMNs) kontrolliert (Rogers und Unanue, 1993). Diese wandern, angelockt durch chemische Botenstoffe an die Orte der Infektion, wobei Mikroabszesse durch die Elimination von infizierten Hepatozyten entstehen (Conlan und North, 1991). Die infizierten Hepatozyten selbst unterlaufen, unabhängig von der Infiltration durch die PMNs, ein Apoptoseprogramm (Rogers *et al.*, 1996).

In Mäusen ist die LD₅₀ nach oraler Infektion relativ hoch ($> 10^9$ Bakterien) (Audurier *et al.*, 1980, Okamoto *et al.*, 1994), bei intravenöser Applikation von BALB/c Mäusen hingegen liegt die LD₅₀ nur bei ca. 8×10^3 Bakterien (ZKBS, 1999) bzw. bei 10^4 Bakterien nach Infektion von C57BL/6 Mäusen (Engelbrecht *et al.*, 1996). Dieser gravierende Unterschied kann wiederum auf die Resistenz von murinen Darmepithelzellen gegen *L. monocytogenes* zurückgeführt werden.

2.2.4 Immunologie einer *L. monocytogenes* Infektion

Das heute verfügbare Wissen über die Immunologie der Listeriose wurde fast ausschließlich mit Hilfe des Modells der experimentellen murinen Listeriose erarbeitet.

In die Immunantwort gegen *Listeria monocytogenes* sind sowohl angeborene als auch erworbene Abwehrmechanismen involviert, wobei die Zell-vermittelte Immunität eine wesentliche Rolle spielt. Aber auch Antikörper sind nach neuesten Studien an der Vermittlung von Immunität gegen dieses intrazelluläre Bakterium beteiligt.

Die angeborene Immunantwort gegen *Listeria* umfasst eine Vielzahl von Zelltypen und Zytokinen, wobei polymorphkernige Neutrophile (PMNs) in den ersten 24 Stunden der Infektion infizierte apoptotische Hepatozyten und dadurch freigesetzte Bakterien in der Leber wesentlich eliminieren (Rogers *et al.*, 1996).

Ebenso wichtig bei der frühen Phase der Infektion ist die Interaktion zwischen Makrophagen und NK-Zellen (Unanue, 1997). Mit Listerien infizierte Makrophagen produzieren TNF- α und IL-12. Diese beiden Zytokine zusammen induzieren die Sekretion von INF- γ aus NK-Zellen und die volle Aktivierung von Makrophagen, welche mit erhöhten Leveln von MHC I- und MHC II-Molekülen (Bancroft *et al.*, 1991) sowie der Freisetzung von Stickstoff-Oxiden (Beckerman *et al.*, 1993) antworten. Zusätzlich wurde beobachtet, dass auch CD8 α^+ Dendritische Zellen aus der Milz INF- γ als Antwort auf eine *Listeria* Infektion produzieren (Ohteki *et al.*, 1999). IL-1 und IL-6 spielen ebenfalls eine Rolle bei der frühen Phase der *Listeria* Infektion, wobei die Produktion dieser Zytokine mit der Antwort der PMNs assoziiert ist (siehe 2.1.3).

Die adaptive Immunantwort gegen *Listeria* ist abhängig von T-Lymphozyten, wobei angenommen wird, dass Effektor- und Gedächtniszellen vom T_H1-Typ überwiegen. Aber auch IL-4 produzierende T-Zellen können am Beginn einer *Listeria*-Infektion (Kaufmann *et al.*, 1997) oder in verschiedenen Geweben im Verlauf einer Infektion gemessen werden (Marzo *et al.*, 2002).

Da das Bakterium während der Infektion sowohl in Phagosomen als auch im Zytosol von professionellen Antigen-präsentierenden Zellen anwesend ist, werden listerielle Epitope von MHC Ia-Molekülen (Pamer *et al.*, 1991, Sijts *et al.*, 1996), MHC II-Molekülen (Safley *et al.*, 1991, Sanderson *et al.*, 1995) und auch vom MHC Ib Molekül H2-M3 (Lenz *et al.*, 1996, Gulden *et al.*, 1996) präsentiert, wodurch CD4 $^+$ und CD8 $^+$ T-Zellen aktiviert werden. Dies resultiert in einer völligen Eliminierung der Pathogene aus dem Wirt, gleichzeitig werden Gedächtnis-T-Zellen generiert, welche eine schnellere Immunantwort auf eine Sekundärreaktion auslösen können.

Dominante listerielle H2-K²-restringierte Epitope, welche von CD8 $^+$ T-Zellen erkannt werden, stammen von den sezernierten Proteinen p60 (Peptide 449-457, 217-225), Listeriolysin (LLO, 91-99) und von einer Metalloprotease (Mpl, 84-92) ab, wobei das LLO-Epitop zwar mit der

niedrigsten Dichte auf infizierten Antigen-präsentierenden Zellen präsentiert wird, dafür aber die die größte Anzahl an spezifischen CD8⁺ T-Zellen generiert (Pamer *et al.*, 1991, Harty *et al.*, 1995, Busch *et al.*, 1998, 1999).

Die Effektormechanismen, mit denen sich CD8⁺ T-Zellen an einer anti-listeriellen Immunantwort beteiligen, bestehen zum einen aus einer induzierte Apoptose in infizierten Hepatozyten durch einen Perforin-vermittelten Mechanismus (Kagi *et al.*, 1994) und zum anderen aus einem Perforin- und Fas-unabhängigen Mechanismus, in welchen TNF- α involviert ist (White und Harty, 1998). Zusätzlich konnte demonstriert werden, dass die CD8⁺ T-Zell-vermittelte Immunantwort kein INF- γ benötigt (Harty und Bevan, 1995).

Listeria-spezifische CD4⁺- und CD8⁺ T-Zellen können beide unabhängig voneinander Immunität vermitteln (Rakhmilevich, 1994), obwohl die jeweiligen Effektormechanismen in diesen Studien noch nicht ganz verstanden sind. Ladel *et al.* demonstrierten 1994, dass die koordinierte Interaktion von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen wichtig für eine vollständige Immunantwort gegen *L. monocytogenes* ist.

Einige Studien (Gentshev *et al.*, 1992, Ochsenbein *et al.*, 1999, Edelson *et al.*, 1999) konnten zeigen, dass protektive Antikörper ebenfalls Immunität gegen eine *Listeria* Infektion vermitteln können. Zum einen konnten von *S. typhimurium* sezernierte Antikörper, die gegen das Protein p60 von *L. monocytogenes* gerichtet sind, teilweise Protektion gegen *Listeria* vermitteln (Gentshev *et al.*, 1992) und zum anderen konnte *Listeria*-spezifisches IgM (aber kein IgG) im Serum von naiven Mäusen nachgewiesen werden (Ochsenbein *et al.*, 1999). Tiere, die einen Defekt in der Bildung von IgM haben, zeigten eine starke Verschiebung der listeriellen Belastung in infizierten Organen (5- bis 10-mal mehr Bakterien in Leber bzw. 79-mal weniger Bakterien in der Milz). Zudem wurde gezeigt, dass LLO-spezifische, neutralisierende Antikörper Protektion gegen *Listeria* vermitteln (Edelson *et al.*, 1999).

2.2.5 Infektionszyklus und Virulenzfaktoren

Infektionszyklus

L. monocytogenes ist ein invasives Pathogen, welches zum einen eine Reihe von phagozytischen Zellen wie Makrophagen (Mackanness, 1962) und Dendritische Zellen (Guzman *et al.*, 1995) infiziert und zum anderen seine Internalisierung in eine Vielzahl von Zelltypen induzieren kann, welche normalerweise nicht phagozytisch sind. Dazu gehören epitheliale Zellen (Gaillard, *et al.*, 1987), Hepatozyten (Wood *et al.*, 1993), Fibroblasten (Kuhn *et al.*, 1988), endotheliale Zellen (Drevets *et al.*, 1995) und verschiedene Arten von Nervenzellen (Dramsi *et al.*, 1998).

Das Eindringen in die Wirtszelle beginnt mit einer Interaktion des Bakteriums mit Rezeptoren in der Zytoplasma-Membran, die das Bakterium schrittweise einhüllt (Abb. 1.4). Dieser Prozess unterscheidet sich vom so genannten „membrane ruffling“, welches *Salmonella* und *Shigella* beim Eintreten in die Wirtszelle auslöst, was zu deren Makropinozytose führt (Isberg und Tran Van

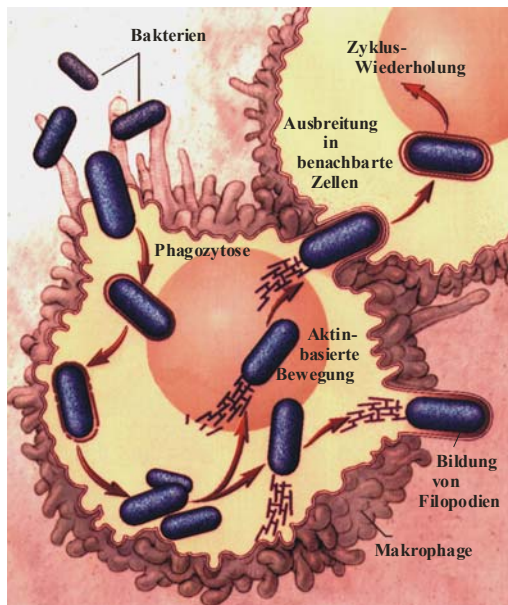


Abbildung. 1.4: Der Infektionszyklus von *L. monocytogenes* (<http://www.med.ufl.edu/biochem/DLPURICH/Listeria.html>).

Nhieu, 1994). Der Aufnahmemechanismus von *Listeria*, der dem Invasin-vermittelten Eindringen von *Yersinia* ähnlich ist, wird auch als „zipper“-Mechanismus bezeichnet, im Unterschied zum „trigger“-Mechanismus von *Salmonella* und *Shigella* (Ireton und Cossart, 1998).

Nach der Aufnahme in die Zelle befinden sich die Listerien zunächst in einem Phagosom. Bereits 30 Minuten nach Internalisierung beginnen die Bakterien jedoch, die phagosomale Membran zu lysieren (Gaillard *et al.*, 1987) und innerhalb von zwei Stunden befinden sich ca. 50 % der intrazellulären Bakterien im Zytosol (Tilney und Portnoy, 1989).

Im Zytosol der Wirtszelle kann sich *L. monocytogenes* mit einer Generationszeit von ca.

einer Stunde vermehren (Gaillard *et al.*, 1987, Portnoy *et al.*, 1988). Gleichzeitig beobachtet man die Ausbildung eines ungeordneten Aktinsaumes um die einzelnen Bakterien, welcher innerhalb von ca. zwei Stunden nach Internalisierung zu einem Aktinschweif umgeordnet wird. Dieser Aktinschweif befindet sich dabei immer am so genannten alten Pol des Bakteriums und kann eine Länge von bis zu 40 μm erreichen. Das polymerisierte Aktin besteht dabei aus langen, axial angeordneten Filamenten, welche durch kurze, wahllos angeordnete Filamente vernetzt sind.

Durch den polaren Aufbau der Aktinfilamente am Bakteriennpol des Aktinschweifes werden die Bakterien mit einer mittleren Geschwindigkeit von 0,3 $\mu\text{m/s}$ durch das Zytosol geschoben, wobei der Schweif immer an derselben Position verbleibt, während sich das Bakterium am Ursprung des Schweifes durch ständige Neupolymerisation des Aktins durch das Zytosol bewegt. Da die Bewegung der Bakterien im Zytosol ungerichtet verläuft, erreichen einige Bakterien die Zellmembran. Dort induzieren sie die Ausbildung Pseudopodien-artiger Protrusionen, wobei sich das Bakterium an der Spitze einer Ausstülpung befindet.

Die Pseudopodien penetrieren benachbarte Zellen und werden von diesen wiederum durch einen Phagozytosevorgang aufgenommen, wodurch ein so genanntes sekundäres Phagosom entsteht, das von einer Doppelmembran umschlossen wird. Innerhalb kürzester Zeit kann sich *Listeria* durch einen weiteren Lysisvorgang aus dieser Vakuole befreien und in das Zytosol der neu infizierten

Zellen entkommen, wonach der Infektionszyklus wiederholt werden kann, resultierend in einer interzellulären Ausbreitung des Bakteriums (Tilney und Portnoy, 1989, Mounier *et al.*, 1990, Dabiri *et al.*, 1990, Therriot *et al.*, 1992, Sechi *et al.*, 1997, Robbins *et al.*, 1999).

Virulenzfaktoren

In die Internalisierung von *L. monocytogenes* in Wirtszellen sind mindestens zwei bakterielle Invasine involviert: Internalin A (InlA) (Gailard *et al.*, 1991) und Internalin B (InlB), wobei humanes E-Cadherin als zellulärer Rezeptor für Internalin A dient (Mengaud *et al.*, 1996) (Abb. 1.5). Murines und Ratten- E-Cadherin dagegen bindet nicht an Internalin A (Lecuit *et al.*, 2001). Auch das Protein p60 wurde bislang als ein mit der Invasion assoziiertes Protein betrachtet (Kuhn und Goebel, 1989, Hess *et al.*, 1995).

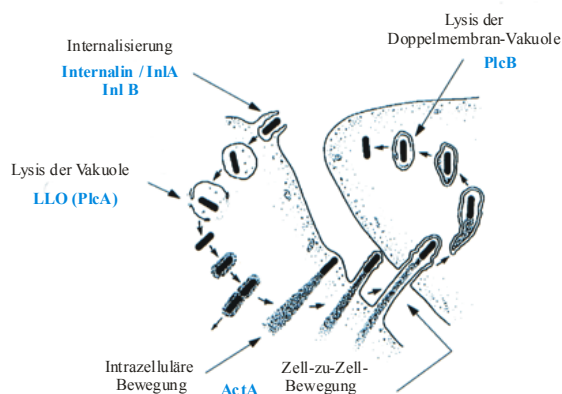


Abbildung. 1.5: Rolle der Virulenzfaktoren von *L. monocytogenes* während des intrazellulären Infektionszyklus (adaptiert n. Tilney und Portnoy, 1989).

Die Lysis der die Bakterien umgebenden Phagosomenmembran wird vom Listeriolysin O (LLO) vermittelt, einem sezernierten Porenformenden Toxin (Gaillard *et al.*, 1987), welches vom Gen *hly* kodiert wird. Zusätzlich zu seiner Membranlyisierenden Funktion kann LLO in murinen Dendritischen Zellen Apoptose induzieren (Guzman *et al.*, 1996) und wirkt als inflammatorischer Stimulus, indem es Endothelzellen (Drevets *et al.*,

1998, Kayal *et al.*, 1999) und Neutrophile (Sibeliuss *et al.*, 1999) aktiviert. Zudem ist auch die bakterielle Phosphatidylinositol-Phospholipase C (PlcA) in einem geringeren Ausmaß an der Lysis der phagosomalen Membran beteiligt (Camilli *et al.*, 1991).

Zur intrazellulären Bewegung im Zytosol der Wirtszellen und zur Ausbreitung in benachbarte Zellen benötigt *L. monocytogenes* ActA (Domann *et al.*, 1992, Kocks *et al.*, 1992), ein Prolinreiches Protein von 610 Aminosäuren. Mutanten, in denen das ActA-Protein inaktiviert ist, formen intrazelluläre Mikrokolonien und sind nicht mehr in der Lage, sich in benachbarte Zellen fortzubewegen. Diese Mutanten sind daher stark in ihrer Virulenz attenuiert. Die Ursache dieser eingeschränkten Motilität ist darin zu suchen, dass ActA eine essentielle Rolle bei der Polymerisation von Wirtszell-Aktin spielt.

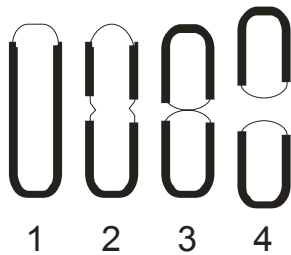


Abbildung. 1.6: ActA-Lokalisation auf der Oberfläche von *L. monocytogenes* während der verschiedenen Zellteilungsphasen (adaptiert nach Kocks *et al.*, 1993).

ActA ist ein Oberflächen-assoziiertes Protein und mit seiner C-terminalen hydrophoben Region in der bakteriellen Membran verankert. Dabei akkumuliert ActA besonders stark am so genannten alten Pol der Zelle, während es am durch die Zellteilung entstandenen neuen Pol vollständig fehlt (Kocks *et al.*, 1993). Die polare Verteilung von ActA während des listeriellen Zellzyklus ist schematisch in Abb. 1.6 dargestellt. An diesem ActA-reichen Pol findet ebenfalls die Aktinpolymerisation und die damit

einhergehende Formierung eines Aktinschweifes statt, wobei ActA aber nur am Pol der Bakterien und nicht in dem polymerisierten Aktinschweif lokalisiert ist (Kocks *et al.*, 1993, Niebuhr *et al.*, 1993). Erst durch diese einseitige ActA-Lokalisation, Aktinpolymerisation und Schweifbildung ist es den Bakterien möglich, sich in die entgegengesetzte Richtung durch das Zytosol zu bewegen. Eine gestörte bzw. unpolare ActA-Verteilung auf der Oberfläche der Bakterien kann daher zu deren Immobilität führen (Brehm, 1995).

Ein weiteres Virulenz-assoziiertes Protein ist eine Phosphatidylcholin-spezifische Phospholipase C (PlcB), welche neben LLO für die effiziente Lyse der Doppelmembran-Vakuole bei der Ausbreitung der Bakterien in benachbarte Zellen notwendig ist (Vázquez-Boland *et al.*, 1992). PlcB wird dabei von der Zink-abhängigen Metalloprotease (Mpl) oder einer noch unbekanntem Cysteinprotease der Wirtszelle von seiner inaktiven (pro-PlcB) in eine aktive Form überführt (Marquis *et al.*, 1995, 1997). Des Weiteren kann PlcB in einigen Zell-Linien wie Henle 407 (Marquis *et al.*, 1995) und HEp-2 (Hense *et al.*, 2001) eine LLO-unabhängige Freisetzung der Bakterien aus dem primären Phagosom vermitteln.

Die meisten dieser hier beschriebenen Virulenz-Gene sind in einer Pathogenitätsinsel (LIPI-1) (Abb. 1.5) von ca. 10 kb auf dem Chromosom von *L. monocytogenes* kodiert (Abb. 1.7), welche in nicht-pathogenen *Listeria spp.* nicht existiert (Gouin *et al.*, 1994). Die Gene, die InlA und InlB kodieren, sind zusammen in einem anderen Operon lokalisiert. Alle bekannten Virulenz-Gene werden unter teilweiser oder absoluter Kontrolle des pleiotrophen Aktivatorproteins PrfA transkribiert (Mengaud *et al.*, 1991, Chakraborty *et al.*, 1992). Dieses Protein ist ein Mitglied der CAP/FnR-Familie der Transkriptionsaktivatoren und besitzt ein dem Transkriptionsregulator CAP von *E. coli* ähnliches „helix-turn-helix“-Motif (Sheehan *et al.*, 1996).

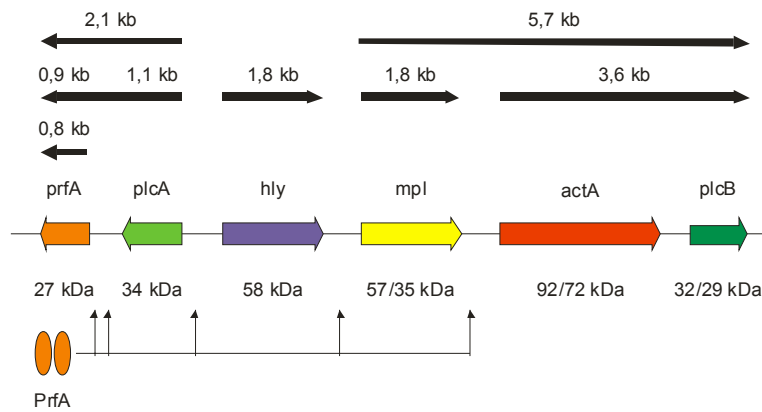


Abbildung 1.7:
Pathogenitätsinsel LIPI-1 von *L. monocytogenes*. Die schwarzen Pfeile kennzeichnen die verschiedenen mRNAs, welche nach der PrfA-vermittelten Aktivierung der verschiedenen Promotoren transkribiert werden

PrfA kann unter bestimmten Bedingungen reprimiert werden, wodurch die Transkription der PrfA-abhängigen Virulenzfaktoren ebenfalls unterdrückt wird. Zum einen wird die Transkription von *prfA* (besonders der *plcA-prfA* bicistronischen mRNA) und von PrfA-abhängigen Virulenz-Genen (Leimeister-Wächter *et al.*, 1992) sowie die Translation des PrfA Proteins (Renzoni *et al.*, 1997) bei Temperaturen unter 30°C stark reprimiert. Zum anderen kann das β -Glukosid Cellobiose ebenfalls sowohl die Transkription PrfA-abhängiger Gene (Park *et al.*, 1993, Klarsfeld *et al.*, 1994) als auch die Transkription der bicistronischen *plcA-prfA* mRNA effizient reprimieren (Renzoni *et al.*, 1997). Im Gegensatz zur Temperaturhemmung werden bei der Anwesenheit von Cellobiose normale Mengen an PrfA, aber verringerte Mengen an PlcA, LLO und ActA exprimiert (Park *et al.*, 1993, Renzoni *et al.*, 1997), wodurch PrfA unter bestimmten Bedingungen zwar anwesend aber inaktiv sein kann.

2.2.6 Listerien-spezifische Bakteriophagen

Es sind eine Reihe von *L. monocytogenes*-spezifischen Bakteriophagen beschrieben worden, von denen u.a. die Phagen A118 und A511 näher charakterisiert worden sind (Loessner und Busse, 1990). Der Phage A118 gehört zu den Siphoviridae (Morphotyp B1) und befällt vornehmlich die Serovare 1/2, während der Phage A511 ein Myovirus (Morphotyp A1) ist und die meisten *L. monocytogenes* Serovare lysieren kann. Als Rezeptoren für die Adsorption der Bakteriophagen an die Bakterienzelle wurden bislang einige Teichonsäure-Bestandteile wie Glukosamin oder Rhamnose identifiziert (Wendlinger *et al.*, 1996).

Phagenlysine (Endolysine) sind Enzyme, welche die bakterielle Zellwand hydrolysieren können. Sie werden während der späten Phase der Genexpression im lytische Zyklus der Virusreplikation synthetisiert. Ihre Aktivität ist dabei abhängig von dem Transport über die bakterielle Zytoplasmamembran, was ihnen durch die Aktivität eines Membran-durchlöchernden Holin-

Proteins ermöglicht wird (Young, 1992). Phagenlysine können in kürzester Zeit den bakteriellen Murein-Sacculus komplett degradieren, wodurch die neu generierten Phagen aus den Bakterien freigesetzt werden.

Das Phagenlysin 118 des Phagen A118 ist ein 30,8 kDa großes Protein, welches als L-Alanyl-D-Glutamat-Peptidase charakterisiert worden ist (Loessner *et al.*, 1995). Es besitzt eine enzymatisch aktive Domäne in den 140 Aminosäuren der N-terminalen Region, während die die C-terminalen 182 Aminosäurereste die Bindung an einen polar verteilten, aber nicht identifizierten Liganden in der bakteriellen Zellwand vermitteln (Loessner *et al.*, 2002). Phagenlysin 511, ein 36,5 kDa Protein, besitzt dagegen die Spezifität einer N-Acetylmuramoyl-L-Alanin-Amidase. Beide Lysine scheinen andere Bakterien nicht zu lysieren und können daher in *E. coli* überexprimiert werden (Loessner *et al.*, 1995).

2.2.7 Das Protein p60 von *L. monocytogenes*

L. monocytogenes bildet mit einer niedrigen Frequenz (ca. 10^{-4}) spontane Mutanten, deren Kolonien auf Agarplatten einen rauen Phänotyp aufweisen. Dieser Phänotyp kommt dadurch zustande, weil die Zellen dieser Mutanten aus langen Filamenten bestehen, wodurch die Ränder dieser Kolonien stark gezackt erscheinen. Mit Hilfe einiger dieser so genannten Raumutanten war es Kuhn und Goebel 1989 möglich, ein Protein von *Listeria monocytogenes* zu charakterisieren, welches in diesen Raumutanten in sehr viel geringeren Mengen als in wildtypischen Listerien sezerniert wird. Dieses Protein zeigte in der SDS-PAGE ein Molekulargewicht von 60 kDa und wurde daher p60 genannt.

Rolle bei der Internalisierung von *L. monocytogenes*

Die langen Filamente dieser Raumutanten sind aus einzelnen, aneinanderhängenden Bakterienzellen zusammengesetzt und besitzen eine stark herabgesetzte Invasivität für die murine Fibroblasten-Zell-Linie 3T6 (Kuhn und Goebel, 1989). Diese Invasivität wird drastisch erhöht, wenn den filamentösen Bakterienketten der Raumutante RIII gereinigtes p60 zugesetzt wird, wodurch diese in sehr viel kleinere Zellketten zerfallen. Durch eine Ultraschallbehandlung kann ebenfalls ein Zerfall der langen Zellketten ausgelöst werden, aber derart behandelte Bakterien werden nicht mit einer erhöhten Effizienz von 3T6-Zellen aufgenommen. Es wurde daher postuliert, dass p60 mit der Invasion von *L. monocytogenes* in Wirtszellen assoziiert ist, das p60-kodierende Gen wurde daher *iap* für „invasion associated protein“ genannt.

Für die Zell-Linie Caco-2 konnten diese Beobachtungen zunächst jedoch nicht bestätigt werden. Auch bei der Infektion dieser Zellen erwies sich die Raumutante RIII zunächst als weitaus weniger

invasiv als der Wildtyp, jedoch konnte die Invasivität sowohl durch eine Zugabe von gereinigtem p60 als auch durch eine Ultraschall-Behandlung wieder hergestellt werden (Bubert *et al.*, 1992).

Hess *et al.* demonstrierten 1995, dass mit Plasmid-kodiertem p60 ausgestattete Bakterien von *S. typhimurium* SL7207 verstärkt in eine murine Hepatozyten-Zell-Linie sowie in primäre Makrophagen (BMM) aufgenommen werden, wobei beim letzteren Zelltyp eine Fc-Rezeptor-vermittelte Aufnahme ausgeschlossen werden konnte. Im Gegensatz dazu konnten Kolb-Mäurer *et al.* 2001 zeigen, dass humane Dendritische Zellen (MoDC) Bakterien von *L. monocytogenes* über eine Fc-Rezeptor-vermittelte Endozytose aufnehmen, bei der anti-p60-Antikörper eine wichtige Rolle spielen.

Ein weiterer Hinweis auf die Rolle des p60 bei der Invasion von *L. monocytogenes* in Wirtszellen scheint auch der Befund zu sein, dass rekombinantes p60 spezifisch an Caco-2 Zellen bindet (Park *et al.*, 2000).

Das Gen *iap*

Das p60 kodierende Gen *iap* konnte 1990 identifiziert und sequenziert werden (Köhler *et al.*, 1990). Plasmid-kodiertes p60 verursachte nach Expression in der Raumutante RIII und in *B. subtilis* DB104 einen signifikanten Zerfall der filamentösen Bakterienketten, und p60 aus dem Überstand von *L. monocytogenes* konnte die Zellen von *M. lysodeiktitikus* in einem Zymogramm lysieren (Wuenschel *et al.*, 1993). Daher konnte postuliert werden, dass das Protein p60 eine Mureinhydrolase unbekannter Substratspezifität ist, welche in einem späteren Schritt der Zellteilung von *Listeria* involviert zu sein scheint.

Da ersten Versuche, das Gen *iap* durch Deletions-Mutagenese zu inaktivieren, scheiterten, wurde die Hypothese aufgestellt, dass p60 ein essentielles „housekeeping“ Protein ist (Wuenschel *et al.*, 1993). J. Bielecki publizierte 1994 dagegen eine p60-negative Insertionsmutante, welche stark reduzierte Mengen an p60 exprimiert. Diese Insertionsmutante bildet raue Kolonien sowie filamentöse Bakterienketten aus.

In der Raumutante RIII, welche stark reduzierte Mengen an p60 exprimiert, konnten wildtypische Mengen an *iap*-spezifischer mRNA nachgewiesen werden (Köhler *et al.*, 1991). Auch eine Überexpression von Plasmid-kodiertem p60 war in RIII nicht möglich, obwohl ein Anstieg an *iap*-mRNA gemessen werden konnte. Daher wurde angenommen, dass die Expression von p60 auf einem post-transkriptionellen Level kontrolliert wird (Köhler *et al.*, 1991). Lenz und Portnoy veröffentlichten dazu kürzlich, dass einige Raumutanten einen Defekt in der Expression eines zweiten *secA* Genes (*secA2*) aufweisen (Lenz und Portnoy, 2002). Dieses Gen ist direkt neben *iap* auf dem Chromosom lokalisiert, wird aber in entgegengesetzter Richtung kodiert. *SecA2*-Mutanten scheinen p60 zwar in gleicher Menge wie wildtypische Bakterien zu exprimieren, die Menge an

sezerniertem p60 ist in diesen Stamm jedoch verringert. Daher könnte diese Art von Mutation durchaus eine post-transkriptionelle Kontrolle sezernierter Proteine darstellen.

Struktur des Proteins p60

Die abgeleitete Aminosäuresequenz des p60 Proteins besteht aus 484 Resten, wobei die 27 N-terminalen Aminosäuren die Signalsequenz bilden (Abb. 1.8). Das Protein p60 besitzt einen isoelektrischen Punkt von 9,3 (Kuhn und Goebel, 1989), welcher mit einem hohen Anteil an positiv geladenen Lysin- und Argininresten zu erklären ist. Diese hohe Ladung scheint auch die Ursache für den erheblichen Unterschied zwischen theoretischen (50,7 kDa) und experimentellem Molekulargewicht (60 kDa) zu sein.

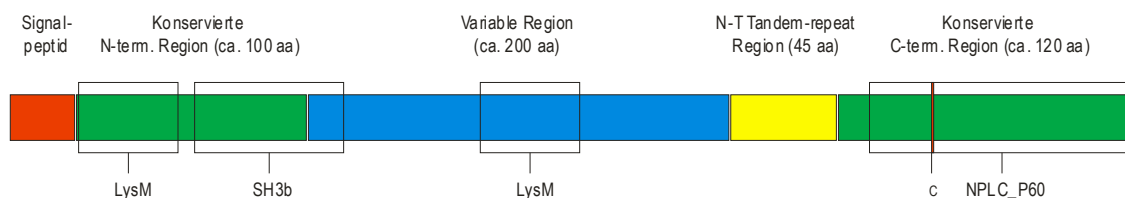


Abbildung. 1.8: Schematische Darstellung des p60 Proteins von *L. monocytogenes*. Die farbigen Boxen stellen Regionen dar, welche in den P60-ähnlichen Proteinen aller *Listeria spp.* lokalisiert sind. Die ungefüllten Boxen kennzeichnen konservierte Pfam Domänen (Protein families database of alignments and HMMs, Sanger Institute, UK) von *L. monocytogenes* p60.

Dem p60 entsprechende Proteine konnten in allen *Listeria spp.* nachgewiesen werden, dabei sind vor allem die N-terminale (ca. 100 aa) und die ca. 120 aa umfassende C-terminale Region in allen p60 Proteinen dieser Spezies konserviert. Besonders auffällig im p60 Protein von *L. monocytogenes* ist eine 45 aa umfassende „Tandem-repeat“-Region, die sich aus 19 paarweisen Wiederholungen der Aminosäuren N und T zusammensetzt, welche ein „PSK“-Motiv umgeben. Dieses Motiv findet man auch in den meisten anderen p60 Proteinen anderer *Listeria* Spezies, allerdings variiert bei diesen die Anzahl der „NT-repeats“ sehr stark (Bubert *et al.*, 1992).

P60 besitzt eine C-terminal gelegene NPLC_60 Domäne noch unbekannter Funktion, welche oft in Lipoproteinen gefunden wird. Die letzten 120 Aminosäuren sind zudem in vielen anderen Proteinen unbekannter Funktion von zahlreichen Bakterien-Arten konserviert, wobei besonders das Motiv „FDCSG“ sehr häufig gefunden wird. Dabei konnte der Cysteinrest in diesem Motiv mit der hydrolytischen Aktivität von p60 korreliert werden (Wuenschel *et al.*, 1993).

Im Genom von *L. monocytogenes* EGD-e (Glaser *et al.*, 2001) konnte eine Reihe p60-ähnlicher Leserahmen (*spl*, lmo0394, lmo1104) lokalisiert werden, welche auffällige Sequenzhomologien in ihren C-Termini zum C-Terminus von p60 besitzen (siehe auch Abb. 5.23). Von diesen Leserahmen wurde bislang nur das Genprodukt von *spl*, als Protein p45 bezeichnet, näher charakterisiert (Schubert *et al.*, 2000). Die Aminosäuresequenz des sezernierten Proteins p45 weist

55 % Ähnlichkeit und 38 % Identität zu der des Proteins p60 auf. Zudem konnte mit Hilfe eines Zymogrammes demonstriert werden, dass dieses Protein die Fähigkeit besitzt, die Zellwände von *L. monocytogenes* (aber nicht die von *M. lysodeikticus*) zu lysieren.

2.3 Ziel dieser Arbeit

Das in dieser Arbeit angestrebte Ziel war, Virulenz-attenuierte *L. monocytogenes* Stämme so zu optimieren, dass sie eukaryotische Expressions-Plasmide effektiv in dem Zytosol von Wirtszellen freisetzen („DNA delivery“). Aus dieser Arbeit heraus wurde weiter untersucht, ob ein solcher *Listeria* Stamm dazu benutzt werden kann, *in vivo* eine DNA-Vakzine in das Zytosol von Antigen-präsentierenden Zellen zu transportieren, damit eine Zell-vermittelte Immunantwort gegen das Vakzine-Antigen etabliert werden kann.

In der diesem Projekt vorangegangenen Arbeit wurden eukaryotische Expressions-Plasmide mit Hilfe des attenuierten *L. monocytogenes* Stammes $\Delta 2$ *in vitro* in dem Zytosol von Wirtszellen freigesetzt, indem die Bakterien mit einer Phagenlysin-Kassette ($P_{actA-ply118}$) ausgestattet wurden, welche sie zielgerichtet im Zytosol der Zelle lysierte (Dietrich *et al.*, 1998). Da diese Lysis nicht vollständig war, wurden u.a. alternative Lysis-Kassetten daraufhin getestet, ob sie die Effizienz der Plasmid-Freisetzung erhöhen können.

Zusätzlich wurde vermutet, dass nicht alle Listerien im Zytosol der Wirtszelle abgetötet werden, weil ein Teil der Bakterien das Expressions-Plasmid verliert, wobei die Phagenlysin-Kassette ebenfalls auf diesem Plasmid kodiert ist. Daher wurde ein neuartiges „balanced-lethal“ Plasmid-System konstruiert, welches gewährleistet, dass *L. monocytogenes* weder *in vitro* noch *in vivo* ein transformiertes Plasmid wieder verliert, ohne dabei selbst eliminiert zu werden.

Des weiteren wurde der Mechanismus der Freisetzung von Plasmid-DNA durch *Listeria* im Wirtszell-Zytosol untersucht, da dies zur Optimierung einer *in vivo* DNA-Vakzinierung mit *L. monocytogenes* als Vektor beitragen könnte.

Zur Untersuchung des Potentials von *L. monocytogenes* als Transportvehikel für eine DNA-Vakzine wurde ein Antigen-Expressions-Plasmid unter Verwendung einer passenden Antigen-cDNA konstruiert. Anschließend würde man die mögliche Induktion einer Immunantwort nach oraler Applikation des Plasmid-tragenden Bakteriums untersuchen. Zusätzlich wurden für eine *in vivo* Anwendung verschiedene Virulenz-Attenuationen durch die Deletion bekannter Virulenz-Gene von *L. monocytogenes* charakterisiert und auf ihre Eignung als Vektoren in diesem so genannten „DNA delivery“ System getestet.

3. Material

3.1 Bakterienstämme

Bezeichnung	Beschreibung	Herkunft
<i>L. monocytogenes</i> EGD	Sv 1/2a	S.H.E. Kaufmann
<i>L. monocytogenes</i> EGD-e	Sv 1/2a, EGD-Derivat	Glaser <i>et al.</i> , 2001
<i>L. monocytogenes</i> EGD Δiap	Δiap Deletionsmutante	diese Arbeit
<i>L. monocytogenes</i> EGD Rev 1	$iap\Delta A908$ Revertante	diese Arbeit
<i>L. monocytogenes</i> EGD iap^+	iap^+ Revertante	diese Arbeit
<i>L. monocytogenes</i> EGD-e Δiap II	Δiap Deletionsmutante II	diese Arbeit
<i>L. monocytogenes</i> EGD iap^+ II	iap^+ Revertante	diese Arbeit
<i>L. monocytogenes</i> EGD-e Δiap III	Δiap Deletionsmutante II	diese Arbeit
<i>L. monocytogenes</i> EGD iap^+ III	iap^+ Revertante	diese Arbeit
<i>L. monocytogenes</i> RIII	Sv 1/2a Raumutante	J. Potel
<i>L. monocytogenes</i> EGD Wtr8	EGD Sv 1/2a Raumutante	diese Arbeit
<i>L. monocytogenes</i> $\Delta actA$	$actA^-$	Hauf <i>et al.</i> , 1997
<i>L. monocytogenes</i> EGD-e $\Delta trpS$ / $ptrpS$	$\Delta trpS$, $ptrpS$	diese Arbeit
<i>L. monocytogenes</i> EGD-e $\Delta actA$ $\Delta trpS$ / $ptrpS$	$\Delta actA$, $\Delta trpS$, $ptrpS$	diese Arbeit
<i>L. monocytogenes</i> EGD-e Δiap $\Delta trpS$ / $ptrpS$	Δiap , $\Delta trpS$, $ptrpS$	diese Arbeit
<i>E. coli</i> DH10b	F', $mcrA$, $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$, $\Phi 80dlacZ\Delta M15$, $\Delta lacX74$, $endA1$, $recA1$, $deoR$, $\Delta(ara, leu)7697$, $araD139$, $galU$, $galK$, $nupG$, $rpsL$, λ^-	Fa. Invitrogen (Gibco)
<i>E. coli</i> M15[pREP4]	Nal^S , Str^S , Rif^S , Thi^- , Lac^- , Ara^+ , Gal^+ , Mtl^- , F^- , $RecA^+$, Uvr^+ , Lon^+ , $lacI$	Fa. QIAGEN
<i>B. subtilis</i> DB104	his , $nprE18$, $nprR2$, $\Delta aprA3$	R. Doi

3.2 Plasmide

Bezeichnung	Beschreibung	Herkunft / Referenz
pCMV β	Amp ^R (<i>bla</i>), <i>oriE1</i> , P _{CMV} , SV40 SD/SA, <i>lacZ</i> , SV40 poly A	Fa. Clontech, GenBank Accession # U02451
pQE30	Amp ^R (<i>bla</i>), N-terminaler 6xHis tag	Fa. QIAGEN
pEGFP-1	f1 <i>ori</i> , P _{amp} , SV40 <i>ori</i> , [P _{SV40} , Kan ^R /Neo ^R , HSV TK poly A], <i>oriE1</i> , [EGFP, SV40 poly A]	Fa. Clontech
pDsRed-N1	SV40 <i>ori</i> , [P _{SV40} , Kan ^R /Neo ^R , HSV TK poly A], <i>oriE1</i> , [P _{CMV IE} , DsRed1, SV40 poly A]	Fa. Clontech
pUC18	Amp ^R (<i>bla</i>), P _{lacZ} - multiple Klonierungsstelle - <i>lacZ</i> , <i>oriE1</i>	
pMK4	Amp ^R (<i>bla</i>), Cm ^R (<i>cat</i>), rep Bac. R-plasmid incomp.group 8, <i>oriE1</i> , <i>lacZ</i>	Sullivan <i>et al.</i> , 1984
pIL253	Em ^R (<i>ermAM</i>), <i>ori pAMβ1</i> , <i>repD</i> , <i>repE</i> ,	Simon and Chopin, 1988
pHPS9	Em ^R (<i>ermAM</i>), Cm ^R (<i>cat</i>), rep pTA1060, <i>oriE1</i> , P59, <i>cat86::lacZα</i>	Haima <i>et al.</i> , 1990
pERL-3	Em ^R (<i>ermAM</i>), Km ^R , <i>oriE1</i> , <i>ori pAMβ1</i> , <i>repD</i> , <i>repE</i> ,	Hartl, 1990
pLSV1	Mutageneseplasmid, Em ^R (<i>ermAM</i>), <i>ori</i> _{Gram⁻} , <i>ori</i> _{TS}	Wünscher <i>et al.</i> , 1991
pRP9	Cm ^R	De Rossi <i>et al.</i> , 1994
P _{actA} - <i>gfp</i>	P _{actA} -GFP (mut2)	Dietrich <i>et al.</i> , 1998
pUC18ActPr118	pUC18 x P _{actA} - <i>ply118</i>	Dietrich, 1998
pFLO1	Tc ^R (<i>tet</i>), <i>oriE1</i> , <i>oriU</i> , <i>repU</i> (pLSV16xpUC19)	Dietrich, 1998
pFLO118	pFLO1 x P _{actA} - <i>ply118</i>	Steigerwald, 1998
pHPL511	<i>ply511</i>	M. Loessner
P _{hpr} - <i>gfp</i>	P _{hpr} -GFP (mut2)	M. Beck
pQE30-KMP	KMP-11 Expressions-Plasmid	C. Berberich
pBSK-KMP3	KMP-11 (<i>Leishmania major</i>)	C. Berberich
pFLO-trpS	pFLO1 x <i>trpS</i> (<i>SalI</i>)	diese Arbeit
pFLO-trpS-6His	pFLO1 x <i>trpS</i> -6His (<i>SalI</i>)	diese Arbeit
pLSV-deltrpS-AB	Δ <i>trpS</i> -Mutageneseplasmid, pLSV1 x deltrpS-AB (<i>Bam</i> HI, <i>Eco</i> RI)	diese Arbeit
pLSVactAdelAB	Δ <i>actA</i> -Mutageneseplasmid, pLSV1 x actAdelAB (<i>Bam</i> HI, <i>Eco</i> RI)	diese Arbeit
pLSV-C2+D	Δ <i>iap</i> -Mutageneseplasmid, pLSV1 x C2+D (<i>Bam</i> HI, <i>Eco</i> RI)	diese Arbeit
pLSV-C2iapD	Rev1 Mutagenese-Plasmid, <i>iap</i> Δ A908	diese Arbeit
pLSV-repair	<i>iap</i> ⁺ Mutagenese-Plasmid	diese Arbeit
pUNK1	Em ^R (<i>ermAM</i>) <i>ori pAMβ1</i> , <i>repD</i> , <i>repE</i> , <i>oriE1</i>	diese Arbeit

(Fortsetzung)

Bezeichnung	Beschreibung	Herkunft / Referenz
pUNK-P _{CMV}	pUNK1 x P _{CMV} [P _{CMV} , SV40 SD/SA, NotI, SV40 poly A] (PstI/SalI)	diese Arbeit
pUNK-P _{CMV} P _{actA-<i>ply</i>118}	pUNK-P _{CMV} (SmaI/SalI) x P _{actA-<i>ply</i>118} (Ecl136II/SalI)	diese Arbeit
pUNK-P _{CMV} P _{actA-SP_{actA-<i>ply</i>118}}	pUNK-P _{CMV} (SmaI/SalI) x P _{actA-SP_{actA-<i>ply</i>118}} (Ecl136II/SalI)	diese Arbeit
pSP0	pUNK1 x <i>trpS</i> (SalI)	diese Arbeit
pSP0-P _{CMV}	pUNK-P _{CMV} x <i>trpS</i> (SalI)	diese Arbeit
pSP1-P _{CMV}	pUNK-P _{CMV} P _{actA-<i>ply</i>118} x <i>trpS</i> (SalI)	diese Arbeit
pSP2-P _{CMV}	pUNK-P _{CMV} P _{actA-SP_{actA-<i>ply</i>118}} x <i>trpS</i> (SalI)	diese Arbeit
pSP0-P _{CMV} EGFP2	pSP0-P _{CMV} x EGFP2 [EGFP ohne <i>Sma</i>] (NotI)	diese Arbeit
pSP4-P _{CMV} EGFP2	pSP0-P _{CMV} EGFP2 x P _{<i>hpr</i>-SP_{actA-<i>ply</i>118}} (<i>Psp</i> AI)	diese Arbeit
pSP0-P _{CMV} DsRed	pSP0-P _{CMV} x DsRed (NotI)	diese Arbeit
pSP1-P _{CMV} DsRed	pSP1-P _{CMV} x DsRed (NotI)	diese Arbeit
pSP5-P _{CMV} EGFP2	pSP0-P _{CMV} EGFP2 x P _{actA-<i>ply</i>511} (<i>Psp</i> AI)	diese Arbeit
pSP6-P _{CMV} EGFP2	pSP0-P _{CMV} EGFP2 x P _{actA-<i>ply</i>511ΔC} (<i>Psp</i> AI)	diese Arbeit
pSP1-P _{CMV} KMP	pSP1-P _{CMV} x KMP (NotI)	diese Arbeit
pSP1-P _{CMV} tPA-KMP	pSP1-P _{CMV} x tPA-KMP (NotI)	diese Arbeit
pSP1-P _{CMV} ENH-tPA-KMP	pSP1-P _{CMV} ENH x tPA-KMP (NotI)	diese Arbeit
pSP1-P _{βAktin} tPA-KMP	pSP1-P _{βAktin} x tPA-KMP (NotI)	diese Arbeit
pQE30-p60	p60His-Expressions-Plasmid	diese Arbeit
pSP0 P _{CMV} EGFP	pSP0 P _{CMV} x <i>egfp</i> (NotI)	Stritzker, 2001
pSP1 P _{CMV} EGFP	pSP1 P _{CMV} x <i>egfp</i> (NotI)	Stritzker, 2001
pSP2 P _{CMV} EGFP	pSP2 P _{CMV} x <i>egfp</i> (NotI)	Stritzker, 2001
pSP1-P _{βAktin} EGFP		C. Schoen
pSP1 P _{CMV} ENH-EGFP		C. Schoen

3.3 Oligonukleotide

(Restriktions-Stellen sind unterstrichen)

Bezeichnung	Sequenz
oriE1-EcoRI-for	5'-AAA AAA <u>GAA TTC</u> GCC AGC AAA AGG CCA GGA-3'
oriE1-EcoRI-rev	5'-AAA AAA <u>GAA TTC</u> ACT GAG CGT CAG ACC CCG-3'
trpS-Sall-for	5'-TGT TAT <u>GTC GAC</u> TAG TAT TTT ATG-3'
trpS-Sall-6His-rev	5'-AAA AAA <u>GTC GAC</u> TCA TTA ATG ATG ATG ATG ATG ATG TTT TCT GCG TTT ACG GCC AA-3'
trpS-Sall-rev	5'-GGT AAC <u>GTC GAC</u> GTG GAA ATT AAA-3'
deltrpS-A-for	5'-AAG AAA TGT <u>GGA TCC</u> GAA TTA CTA TTT-3'
deltrpS-A-rev	5'-AGT TTA CAA <u>CCC GGG</u> TTG TCA ATC ACA-3'
deltrpS-B-for	5'-CGA TGT TAC <u>CCC GGG</u> TTG CTT TAG AAT-3'
deltrpS-B-rev	5'-AAT TAG GAG <u>GAA TTC</u> AAA ATG AAA AAA-3'
trpS-check-for	5'-GAC GAA CAT GCT ATT ACG GTT-3'
trpS-check-rev	5'-AAT AGT TGC TGG TGG ATC AAG-3'
DsRed-NotI-for	5'-GGT ACC <u>GCG GCC GCG</u> GGA TCC ACC GG-3'
DsRed-NotI-rev	5'-AGA GTC <u>GCG GCC GCT</u> ACA GGA-3'
pUNK-Em-rev	5'-CCA ATT TCG TAA ACG GTA TCG G-3'
pFLO-Tc-rev	5'-TAT CAG AGG GAA CAG GTA TTG-3'
trpS-for	5'-GCT AAC TAT CTA TTC GGT TAT-3'
trpS-rev	5'-AAT TGT CCA CTA GGT TGA ATT-3'
p60DELforC2	5'-TCA TCA <u>GGA TCC</u> TGT CTC ATT-3'
p60DELrevC	5'-TAA CTC <u>CCC GGG</u> CTA AAG AGG-3'
p60DELforD	5'-ATG AAA <u>CCC GGG</u> GTA TGA TGA-3'
p60DELrevD	5'-AGC GTA <u>GAA TTC</u> TAG ACT GTA-3'
actA-delAfor	5'-AAA AAA <u>GGA TCC</u> AAT CGC TTC CAC TCA CAG AGG-3'
actA-delArev	5'-AAA AAA <u>CCC GGG</u> CAC TTA TAC TCC CTC CTC GTG-3'
actA-delBfor	5'-AAA AAA <u>CCC GGG</u> AAT AAT TAA AAA CAC AGA ACG-3'
actA-delBrev	5'-AAA AAA <u>GAA TTC</u> CCT TGA GCT ATT TGT TTA TCG-3'
EGFP2-NotI-for	5'-GGT ACC <u>GCG GCC GCG</u> GGA TCC ACC GGT CGC CA-3'
EGFP1-NotI-rev	5'-AGA GTC <u>GCG GCC GCT</u> TTA CTT GTA CAG CTC G-3'
P4-for	5'-AAG GAA <u>CCC GGG</u> AAT TAT TTG GGA AGC CCA-3'
P4-rev	5'-AAA TCT GTT TAA TCC CAC TAT AAT TTT CCT TTC AAG TG-3'
L4-for	5'-CAC TTG AAA GGA AAA TTA TAG TGG GAT TAA ACA GAT TT-3'
L1-rev	5'-GAG GGC <u>CCC GGG</u> CTA AAT CTT TTT AAC AAA C-3'
PactA-SmaI	5'-AAA AAT <u>CCC GGG</u> TTA CCG ATG CGA AAA AAG CGC-3'
511B	5'-CTC TAC GGT ATA TTT TAC CAT TTA TAC TCC CTC CTC GTG-3'
511A	5'-CAC GAG GAG GGA GTA TAA ATG GTA AAA TAT ACC GTA GAG-3'
ply511-SmaI	5'-ATA TAT <u>CCC GGG</u> TTA TTT TTT GAT AAC TGC TCC-3'
ply511ΔC-SmaI	5'-AAA AAA <u>CCC GGG</u> TTA AGG TTT AGG TGC TGG TGT-3'
KMP-A	5'-GTA CCC <u>GCG GCC</u> GCA ATT CCC GGG GAT CG-3'
KMP-B	5'-CTC GTA CGT GGT GGC CAT GGT GAC TTC TTT TTT GCT-3'
KMP-C	5'-AGC AAA AAA GAA GTC ACC ATG GCC ACC ACG TAC GAG-3'
KMP-D	5'-AAA AAA <u>GCG GCC GCT</u> TAC TTG GAC GGG TAC TG-3'
KMP-E	5'-TCT CTT CAT TGC ATC CAT GGT GAC TTC TTT TTT GCT-3'
KMP-F	5'-AGC AAA AAA GAA GTC ACC ATG GAT GCA ATG AAG AGA-3'
KMP-G	5'-CTC GTA CGT GGT GGC CAT GCT GGG CGA AAC GAA GAC TGC-3'
KMP-H	5'-GTC TTC GTT TCG CCC AGC ATG GCC ACC ACG TAC GAG-3'
tpa-5'	5'-AGC AAA AAA GAA GTC ACC ATG GAT GCA ATG AAG AGA GGG CTC TGC TGT GTG CTG CTG CTG TGT GGA GCA GTC TTC GTT TCG CCC AGC-3'
tpa-3'	5'-CTC GTA CGT GGT GGC CAT GCT GGG CGA AAC GAA GAC TGC TCC ACA CAG CAG CAG CAC ACA GCA GAG CCC TCT CTT CAT TGC ATC CAT-3'
p60-A	5'-GTT CAC AAA GTT CAG CCT GTT-3'
p60-D3	5'-GAC CGG CGA CGA AAT CGT CTT-3'
iap-repair-for	5'-ATT TGC <u>GGA TCC</u> AAC AAT CGC ATC CGC-3'
iap-repair-rev	5'-TAC GGA <u>GAA TTC</u> CCA AAT AGT GTC ACC-3'
p60His-for	5'-AAA AAA <u>GGA TCC</u> AGC ACT GTA GTA GTC GAA-3'
p60His-rev	5'-AAA AAA GTC GAC TTA TAC GCG ACC GAA GCC-3'
iap-RNA-for	5'-CAA CAA TCG CAT CCG CAA GCA-3'

(Fortsetzung)

Bezeichnung	Sequenz
iap-RNA-rev	5´-AAG CCC AAA TAG TGT CAC CGC-3´
Sod-N	5´-CTT ATG ATG CTT TGG AGC-3´
Sod-C	5´-GTT CCC AAA CAT CTA AGC-3´
iap76-for	5´-TCT ATT TTA GAA GAT CAA CAA AAT G-3´
iap-76-rev	5´-GCT GCA CGG AAT GCA TAA GAA-3´
iap-84-for	5´-CAA CGG CTG ATG TAA ATG TTC-3´
iap84-rev	5´-TTG TGT CAT ATT TTA CGC CGT-3´

3.4 Versuchstiere

Für Infektions-Experimente wurden 6 Wochen alte, weibliche BALB/c Mäuse (BALB/cAnNCrI der Fa. Charles River bzw. BALB/cOlaHsd der Fa. Harlan Winkelmann) verwendet.

3.5 Antikörper

Primäre Antikörper:

- K3A7, monoklonaler Antikörper gerichtet gegen das Epitop "QQKAPTAPKE" von *L. monocytogenes* p60 (Rowan *et al.*, 2000), erhalten von A. Bubert, Darmstadt
- murines Antiserum, gerichtet gegen Lysat von *L. monocytogenes* NCTC 7973, G. Dietrich
- polyklonales Kaninchen-Antiserum, gerichtet gegen *L. monocytogenes* ActA (Pfeuffer *et al.*, 2000)
- polyklonales Kaninchen-Antiserum, gerichtet gegen *L. monocytogenes* Listeriolysin, J. Kreft
- polyklonales Maus-Antiserum, gerichtet gegen *L. monocytogenes* PlcB, M. Kuhn, (Pilgrim *et al.*, 2002)
- polyklonales Kaninchen-Antiserum, gerichtet gegen *L. monocytogenes* InlA, Affinitäts-gereinigt, J. Wehland
- polyklonales Kaninchen-Antiserum, gerichtet gegen *L. monocytogenes* InlB, Affinitäts-gereinigt, J. Wehland
- L2L2, monoklonaler Antikörper gerichtet gegen p45 von *L. monocytogenes* ATCC 19117, F. Fiedler, (Schubert *et al.*, 2000)
- Anti-Kinetoplastid Membrane Protein-11 (KMP-11) mAb ascites, Fa. Cedarlane Lab.
- Tetra-His Antikörper, Fa. QIAGEN
- PE anti mouse-CD11c(HL3), Fa. Pharmingen

Sekundäre Antikörper:

- Peroxidase-conjugated AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG (H+L), Fa. Dianova
- Peroxidase-conjugated AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG, Fcγ Fragment Specific (minimal cross reaction to Human, Bovine, and Horse Serum Proteins), Fa. Dianova
- Anti-mouse IgG (whole molecule) –FITC from goat, Fa. Sigma

- Anti-rabbit IgG (whole molecule) –FITC from goat, Fa. Sigma

3.6 Zellkultur-Medien

- Fa. Invitrogen (Gibco):
- RPMI 1640 mit L-Glutamin
 - Trypsin/EDTA-Lösung
 - Minimum Essential Medium – Eagle with Earl's Salts w/o L-Glutamine & NaHCO₃, 10x Konzentrat
 - L-Glutamin, 200 mM, (100x)
 - MEM non-essential amino acids, 100x
 - MEM Natriumpyruvat, 100 mM
 - Natriumbicarbonat, 7,5 %
 - Dulbecco's Mod Eagle Medium, w/o NaPyruvat, with 4500 mg/l Glucose, with Pyridoxine HCL
- Fa. Biochrom KG:
- Fötales Kälberserum

3.7 Enzyme, Chemikalien und Kits

Standard-Chemikalien, Nährmedien und Antibiotika wurden von den Firmen Merck (Darmstadt), BD Difco, Roth, Serva Electrophoresis und Sigma verwendet. Spezielle Produkte sind wie folgt aufgelistet:

- Fa. Ambion: "DNA-freeTM Kit"
- Fa. Amersham Pharmacia Biotech:
- ImmobilineTM DryStrip, pH 4-7, 18 cm
 - IPG-Puffer pH 4-7
 - EttanTM IPGphorTM Isoelectric Focusing System
 - Hoefer DALT System (DALT Electrophoresis Tank, DALT Multiple Gel Caster)
 - GFXTM Micro Plasmid Prep Kit
 - Restriktionsendonukleasen, One-Phor-All *PLUS*
 - ECLTM direct nucleic acid labelling and detection system
- Fa. Beckton Dickinson: BD MicrotainerTM SST
- Fa. BD Biosciences Clontech:
- pCMV β , Expressionsvektor
 - DsRed-N1, Expressionsvektor
- Fa. BD Biosciences Pharmingen:
- „BD OptEIATM Mouse IL-2 Set“
 - „BD OptEIATM Mouse IFN- γ Set“
 - „Pharmingen's Assay Diluent“
 - „TMB Substrate Reagent Set“
- Fa. Bio-Rad:
- Bio-Rad Protein assay
 - „SDS PAGE Molecular Weight Standards, Broad range“
 - „Prestained Precision Protein Standards, Broad range“
- Fa. Fresenius Kabi Deutschland GmbH: Ampuwa® für Spülzwecke
- Fa. GLW: 5ml- und 15ml- Glashomogenisatoren
- Fa. ICN: [Methyl-³H]-Thymidine, 6,7 Ci/mmol, 248 GBq/mmol

Fa. Invitrogen:	<ul style="list-style-type: none"> • 1 kb DNA Leiter • T4-DNA-Ligase, 1U/μl, incl. 5x T4-DNA-Ligase-Puffer • DNAzol™
Fa. Macherey-Nagel:	NucleoBond® PC 100 Kit
Fa. MBI Fermentas:	Calf Intestine Alkaline Phosphatase, 1U/μl, incl. Puffer
Fa. Merck KGaA:	Benzonase, ≥ 25 U/ μl
Fa. Molecular Probes:	Alexa Fluor™ 488 Ziege anti-Kaninchen IgG(H+L) Konjugat
Fa. PeqLab:	Biotechnologie GmbH:E.Z.N.A. Bacterial RNA Kit
Fa. Perbio:	Detoxi-Gel™ Endotoxin Removing Gel
Fa. Perkin Elmer:	ABI Prism™ Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit
Fa. Promega:	<i>Pfu</i> -Polymerase, incl. 10x Puffer
Fa. QIAGEN:	<ul style="list-style-type: none"> • QIAquick® PCR Purification Kit • „ImmunEasy™ Mouse Adjuvant“
Fa. Roth:	Lysozym aus Hühnereiweiss
Fa. Stratagene:	„ProStar™ First Strand RT-PCR-Kit“

3.8 Verbrauchsmaterial

Elektroporationsküvetten, 50x2mm	Fa. EQUIBIO
Nitrozellulosemembran „Hybond™-C extra“	Fa. Amersham Pharmacia Biotech
Nylonmembran „Hybond™-N“	Fa. Amersham Pharmacia Biotech
Röntgenfilme x-ray Retina, XBA	Fotochemische Werke GmbH
Blotting Papier, 330 g/m²,GB33	A. Hartenstein Labor & Medizintechnik GmbH
Schreddergefäße „Lysing Matrix B“	Fa. Q-BIOgene
Maxisorb-Platten, 96F	Fa. Nunc
Zell-Siebe, 70 μm	Fa. BD Labware

3.9 Geräte

Autoklaven	Fa. Webeco
Brutschrank	Fa. Heraeus
Schüttelwasserbad	Fa. GFL
Heizblöcke	Fa. Liebisch
Elektroporationsgerät „Gene Pulser™“	Fa. BIO-RAD
Elektrophorese-Kammern	Fa. BIO-RAD

ELISA-Reader	Fa. Molecular Devices
Fluoreszenzmikroskop	DM R, DM IRB, Fa. Leica
Kameras	Fa. Princeton Instruments, Fa. Diagnostics Instruments
Klett-Photometer	900-3, Fa. Klett-Summerson
Kritischer-Punkt-Trockner CPD 030	Fa. BAL-TEC
Kühlzentrifugen	Sorvall RT6000, Fa. DuPont; Megafuge, Fa. Heraeus
Tisch-Kühlzentrifuge	5417R, Fa. Eppendorf
Magnetrührer	Fa. Gerhardt
Mikrowelle	Fa. Siemens
Netzgeräte	Fa. Pharmacia Biotech
Raster-Elektronenmikroskop DSM 962	Fa. Zeiss
Transmissions-Elektronenmikroskop EM 10	Fa. Zeiss
Durchflusszytometer Epics XL	Fa. Beckman Coulter
PCR-Gerät	Fa. Techne
pH-Meter	Fa. WTW
Photometer	Ultrospec III, Fa. Pharmacia Biotech
Röntgenfilmentwickler	Fa. Kodak
Pipetten	Fa. Gilson, Fa. Eppendorff
Schüttelwasserbad	Fa. GFL
Schreddergerät „Fast Prep FP120“	Fa. Q-BIOgene
Sterilbänke	Lamina Air, Fa. Heraeus
Taumelgerät	Fa. Heidolph
Tischzentrifuge	Fa. Heraeus
UV-Stratalinker 2400	Fa. Stratagene
UV-Leuchtschirm	Fa. Vilber Coumat
Videoprinter	Fa. Misubishi
Vortex-Gerät	Vibrofix, Fa. Janke & Kunkel
Vakuum-Zentrifuge	Eppendorf Concentrator 5301
Waagen	Fa. Sartorius, Fa. Mettler

4. Methoden

4.1 Allgemeine Arbeiten mit Bakterien

4.1.1 Kultivierung von *E. coli*- und *Listeria*- Stämmen

E. coli-Stämme werden für Klonierungsarbeiten in LB-Medium und zur Expression von Proteinen in 2YT-Medium kultiviert. *Listeria*-Stämme werden in BHI-Medium herangezogen.

LB-Medium (Luria-Bertani-Medium):

10g	Select-Peptide 140
5g	Hefe Extrakt
10g	Natriumchlorid
ad 1l	H ₂ O _{deion.}

2YT-Medium:

16g	Select-Peptide 140
10g	Hefe Extrakt
10g	Natriumchlorid
ad 1l	H ₂ O _{deion.}

BHI-Medium:

37g	Hirn-Herz Glukose Bouillon
ad 1l	H ₂ O _{deion.}

Zur Herstellung von Agarplatten wird den jeweiligen Medien 15 g/l Agar-Agar zugesetzt. Alle Medien werden 20 min bei 121°C autoklaviert. Bakterienkulturen, die unter Selektionsdruck wachsen müssen, werden unterschiedliche Antibiotika (Tabelle 4.1) zugesetzt:

Antibiotikum	Stammlösung	Endkonzentration in <i>E. coli</i> - Kulturen	Endkonzentration in <i>Listeria</i> - Kulturen	Zwischenkultivierung nach Transformation
Ampicillin	100 mg/ml in H ₂ O	100 µg/ml	-	1 h (<i>E. coli</i>)
Chloramphenicol	30 mg/ml in Ethanol	30 µg/ml	5-10 µg/ml	1 h (<i>E. coli</i>) 1-2 h (<i>L. m.</i>)
Erythromycin	100 mg/ml in Ethanol	600 µg/ml	5 µg/ml	3 h (<i>E. coli</i>) 6 h (<i>L. m.</i>)
Kanamycin	25 mg/ml in H ₂ O	25 µg/ml	15 µg/ml	1 h (<i>E. coli</i>) 2-3 h (<i>L. m.</i>)
Tetracyclin	20 mg/ml in 50% Ethanol	20-30 µg/ml	5-10 µg/ml	1 h (<i>E. coli</i>) 2-3 h (<i>L. m.</i>)

Tabelle 4.1: Verwendung verschiedener Antibiotika bei *E. coli* und *L. monocytogenes* Kulturen.

4.1.2 Herstellung von Glycerinstocks

Sowohl *Listeria*- als auch *E. coli*-Stämme werden über Nacht in Medium kultiviert. Nachdem die Kultur mit 25 % (v/v) sterilem Glycerin in Endkonzentration gemischt worden ist, wird sie in sterilen Reaktionsgefäßen bei -80°C eingefroren.

4.1.3 Transformation von Plasmiden in *Listeria*

Listeria monocytogenes besitzt keine natürliche Kompetenz für die Aufnahme von Plasmiden. Die Bakterienzellen können aber durch eine kurze Behandlung mit dem Antibiotikum Penicillin G (Benzylpenicillin) mäßig kompetent gemacht werden. Penicillin G blockiert in der Wachstumsphase der Bakterien die Quervernetzung des Mureins durch die Inhibition von Transpeptidasen, so dass der Mureinsacculus falsch aufgebaut und für Plasmide durchgängig wird. Eine Übernachtskultur der Bakterien wird 1:50 in BHI-Medium verdünnt und bis ca. 90 KE kultiviert. Nach Zugabe von $5\ \mu\text{g/ml}$ Penicillin G lässt man die Bakterien bis 120-130 KE wachsen. Oftmals erreicht die Kultur diese Klettwerte nach der Zugabe des Antibiotikums nicht mehr. In diesem Fall werden die Bakterien für eine Stunde nach der Zugabe von Penicillin G geschüttelt, dann 10 min bei 6000 g und 4°C abzentrifugiert, zweimal in einem 1/10 des Kulturvolumens eiskaltem SMHEM gewaschen und in 1/100 des Kulturvolumens SMHEM aufgenommen. 100 μl -Aliquots dieser nun kompetenten Listerien können bei -80°C bis zur Transformation gelagert werden.

Die Transformation von Listerien wird mittels Elektroporation durchgeführt. Dazu werden 100 μl kompetente Bakterien und 1-2 μg Plasmid-DNA bei 4°C in eine Elektroporations-Küvette gegeben und bei 100 Ohm, 25 μFd und 2,25 kV elektroporiert. Für eine erfolgreiche Transformation sollte dabei die Zeitkonstante τ etwa 2 ms nicht unterschreiten. Sofort nach der Transformation wird 1 ml vorgewärmtes BHI-Medium ohne Antibiotikum zu den Bakterien gegeben, dann lässt man diese je nach Resistenzmarker des Plasmides für die in Tabelle 4.1 angegebene Zeitspanne bei 37°C bis zur Produktion des Resistenz-vermittelnden Proteins schütteln. Anschließend wird die Kultur kurz abzentrifugiert und auf BHI-Platten mit Antibiotikum ausplattiert. Auf Grund der nur mäßigen Transformations-Effizienz können mit dieser Methode zwar Plasmide, aber keine Ligationsansätze erfolgreich transformiert werden, d.h. eine direkte Klonierung mit *Listeria* als Wirt ist nicht möglich.

SMHEM:	952	mM	Saccharose
	3,5	mM	MgCl ₂
	7	mM	HEPES, pH 7,2

4.1.4 Bestimmung der Segregationsstabilität von Plasmiden in *Listeria*

Nach der Elektrotransformation des Plasmides in *L. monocytogenes* Zellen wird aus diesen Bakterien eine Übernachtskultur in BHI mit dem entsprechenden Antibiotikum hergestellt. Aus dieser Kultur heraus werden die Bakterien zweimal täglich 1:100 in BHI-Medium ohne Antibiotika passagiert und bei 37°C kultiviert. Anschließend kann nach zwei verschiedenen Methoden verfahren werden: (A) Zu verschiedenen Zeitpunkten wird eine geeignete Verdünnung der Kultur auf eine BHI-Agarplatte ausplattiert und über Nacht inkubiert. Anschließend werden die einzelnen Kolonien auf eine zweite Platte mit dem entsprechenden Antibiotikum überführt. (B) Zu verschiedenen Zeitpunkten plattiert man eine geeignete Verdünnung der Kultur parallel auf eine Platte mit und ohne Antibiotikum aus. Bei beiden Verfahren wird die Anzahl der Kolonien auf der Platte mit Antibiotikum in Relation zu der Anzahl der Kolonien auf der Platte ohne Antibiotikum gesetzt.

4.1.5 Austausch von Plasmiden in der Deletionsmutante $\Delta trpS/ ptrpS$

Plasmide, welche die Transkriptionseinheit *trpS* tragen (*x-trpS*, *y-trpS*), können in dem *L. monocytogenes* Stamm $\Delta trpS/ ptrpS$ gegeneinander ausgetauscht werden, solange sie unterschiedliche Resistenzmarker tragen. Dazu wird *y-trpS* durch Elektroporation in den Stamm $\Delta trpS/ x-trpS$ transformiert und mit dem Resistenzmarker des Plasmides *y-trpS* selektioniert. Anschließend sollte von einer positiv selektionierten Kolonie eine Übernachtskultur angelegt werden, welche in einer geeigneten Verdünnung auf eine BHI-Platte mit dem Antibiotikum zur Selektion von *y-trpS* ausplattiert wird. Nach Kultivierung dieser Platte überführt man 10 Kolonien auf BHI-Agar mit beiden Antibiotika. Klone, welche auf diesem doppelt-selektionierenden BHI-Agar nicht gewachsen sind, haben das Plasmid *x-trpS* verloren und werden als $\Delta trpS/ y-trpS$ betrachtet.

4.2 Molekularbiologische Arbeiten

4.2.1 Klonierung von DNA, Übersicht

Die Klonierung von Genen bzw. von Genfragmenten lässt sich durch die Kombination verschiedener molekularbiologischer Techniken gestalten. Man konstruiert zwei spezifische

Oligonukleotide zur Amplifizierung des gewünschten Gens oder Fragmentes und amplifiziert dieses mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) unter Verwendung von genomischer DNA bzw. des kompletten Gens in einem Plasmidvektor als Matrize.

Das gereinigte PCR-Fragment wird mit spezifischen Restriktions-Endonukleasen verdaut und in einen mit denselben Enzymen linearisierten Plasmidvektor inseriert. In diesem Vektor kann das Fragment mit Hilfe von Wirtszellen wie z.B. *E. coli* sowohl repliziert als auch exprimiert werden.

4.2.1.1 Isolation von genomischer DNA aus Bakterienzellen

DNAzol™ ist ein komplettes Fertig-Reagenz zur Isolation von genomischer DNA aus festen und flüssigen Proben tierischen und pflanzlichen Ursprungs. Es enthält eine Mischung aus Guanidinthiocyanat und verschiedenen Detergenzien, welche RNA hydrolysiert und selektiv DNA aus dem Zellysat präzipitiert (Chomczynski *et al.*, 1997). Während der DNA-Isolation werden ca. 25-50 mg Bakterienpellet in 1 ml DNAzol™ homogenisiert (und zwar am besten vorsichtig mit abgeschnittenener Pipettenspitze), eventuelle Rückstände bei 10.000 g abzentrifugiert und anschließend die DNA mit 0,5 ml 100% (v/v) Ethanol präzipitiert. Nach einem Waschschrift mit 1 ml 95% Ethanol sollte die DNA zuerst getrocknet und dann in 8 mM NaOH gelöst werden. Nachdem man nochmals unlösliche Produkte abzentrifugiert hat, kann die DNA direkt für PCR (siehe 4.2.1.4) oder Southern-Blot Analyse (siehe 4.2.2) verwendet werden.

Zur Isolierung von chromosomaler DNA aus *Listeria spp.* wird der DNAzol™ -Behandlung ein zusätzlicher Lysisschritt vorangestellt. Dazu wird das Bakterienpellet in 0,98 ml TE-Puffer und 0,02 ml Lysozym-Lösung resuspendiert. Anschließend inkubiert man die Bakterien bei 37°C solange, bis sie weiß und verklumpt erscheinen (ca. 15 min). Nach Abzentrifugation und Verwerfen des Überstandes wird die DNA nach dem oben beschriebenen Rezept isoliert.

Lysozym-Lösung:	100	mg/ml	Lysozym
TE-Puffer:	10	mM	Tris-HCl, pH 8,0
	1	mM	EDTA, pH 8,0

4.2.1.2 Herstellung von Schnell-Lysat aus *E. coli* oder *Listeria* Zellen

Möchte man für eine PCR-Reaktion genomische oder Plasmid-DNA als Matrize verwenden, so genügt oftmals an Stelle einer sauberen DNA-Präparation ein aus den Bakterien hergestelltes

Schnell-Lysat. Dabei wird eine kleine Pipettenspitze an Bakterienmaterial in 50 µl MQ-H₂O resuspendiert und bei 110°C im Heizblock gekocht. *E. coli* Zellen lassen sich einfacher aufschließen als Listerien, daher reicht bei *E. coli* eine 5-minütige Erhitzung aus, während man Listerien 10 min lang kochen sollte. Anschließend wird die Präparation zur Abkühlung kurz auf Eis gestellt und für 10 s abzentrifugiert. 1-3 µl des Lysates sollten sofort in den PCR-Ansatz pipettiert werden.

4.2.1.3 Präparation von Plasmid-DNA

Zur Isolation von Plasmid-DNA, die in *E. coli* repliziert worden ist, kann man sich verschiedener Techniken bedienen. Kleinere Mengen an Plasmid-DNA, die sich zum Screenen und Sequenzieren eignen, kann man nach einer standardisierten Prozedur gewinnen, der Plasmid-DNA Minipräparation mit Hilfe des „GFX™ Micro Plasmid Prep Kits“ (Fa. Amersham Pharmacia Biotech). Diese basiert auf einer modifizierten Methode der alkalischen Lyse von Bakterien (Birnboim und Doly, 1979). Das Prinzip dieser Methode beruht auf einer selektiven alkalischen Denaturierung von hochmolekularer chromosomaler DNA, während kovalent geschlossene zirkuläre DNA in der kurzen Lysiszeit weitgehend doppelsträngig bleibt. Nach der Neutralisation renaturiert die chromosomale DNA unter Bildung eines Pellets, während die Plasmid-DNA löslich im Überstand zu finden ist. Diese kann anschließend mit hoher Salzkonzentration an eine Glasfasermatrix selektiv adsorbiert und mit niedriger Salzkonzentration eluiert werden.

Zur Isolation größerer Mengen an ultrareiner Plasmid-DNA wird die Plasmid-DNA Midi-Präparation nach einem Protokoll der Fa. NucleoBond® angewandt (NucleoBond® PC 100 Kit). Diese Prozedur ähnelt der Minipräparation bezüglich der alkalischen Lyse, die Plasmid-DNA wird aber unter niedriger Salzkonzentration über eine NucleoBond® AX100 -Säule an ein selektives Ionenaustauscher-Harz adsorbiert. Unter ansteigender Salzkonzentration werden dann Proteine, RNA und andere Verunreinigungen entfernt und die Plasmid-DNA eluiert, welche durch einen nachfolgenden Präzipitationsschritt mit Isopropanol wird letztendlich entsalzt und ankonzentriert wird.

Folgende Lösungen werden zur Plasmid-DNA-Präparation verwendet:

Puffer S1 (Resuspensionspuffer):	50	mM	Tris-HCl, pH 8,0
	10	mM	EDTA
	100	µg/ml	RNase A, pH 8,0
Puffer S2 (Lysispuffer):	200	mM	Natriumhydroxid

	1	%	SDS
Puffer S3 (Neutralisationspuffer):	2,8	M	Kaliumacetat, pH 5,1
Puffer N2 (Äquilibriumspuffer):	100	mM	Tris-PO ₄ , pH 6,3
	900	mM	Kaliumchlorid
	15	%	Ethanol
Puffer N3 (Waschpuffer):	100	mM	Tris-PO ₄ , pH 6,3
	1150	mM	Kaliumchlorid
	15	%	Ethanol
Puffer N5 (Elutionspuffer):	100	mM	Tris-PO ₄ , pH 8,5
	1000	mM	Kaliumchlorid
	15	%	Ethanol

Analog der „Procedure B: Purification from 2-3 ml of culture“ des GFX™ Micro Plasmid Prep Kits für die Plasmid-DNA Minipräparation benötigt man 2-3 ml einer in Selektionsmedium herangezogenen Übernachtskultur von *E. coli*. Die Bakterien werden kurz bei 10000 g abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 300 µl Lösung I (ohne Rezeptangabe) resuspendiert. Nach Zugabe von 300 µl Lösung II muss man das Röhrchen sofort 4-bis 6-mal über Kopf drehen. Zur Neutralisation des Ansatzes werden nach 5 min 600 µl Lösung III hinzupipettiert und vorsichtig gemischt. Dann zentrifugiert man 10 min bei 10000 g ab, gibt den Überstand auf eine GFX-Säule und zentrifugiert wieder für 30-60 s. Dann erfolgt ein Waschschriff mit 600 µl Waschpuffer und eine anschließende Trockenzentrifugation der Säule. Durch die Zugabe von 50 µl MQ-H₂O auf die Matrix kann die DNA durch eine kurze Zentrifugation eluiert werden. Mit Hilfe dieser Prozedur lässt sich bis ca. 20 µg Plasmid-DNA isolieren.

Zur Präparation von Plasmid-DNA in größeren Mengen werden 30-50 ml einer in Selektionsmedium kultivierten *E. coli* –Übernachtskultur abzentrifugiert und das Pellet in 4 ml Puffer S1 resuspendiert.

Lysiert wird auch hier durch Zugabe von 4 ml Puffer S2 und das Reaktionsgefäß wird 4- bis 6-mal invertiert. Nach 5 Minuten gibt man 4 ml vorgekühlten Neutralisationspuffer S3 zur Mischung, mixt wieder vorsichtig durch Drehen des Reaktionsgefäßes und inkubiert auf Eis für 10 Minuten. Durch eine nachfolgende Zentrifugation bei 6000 g und 4°C sammelt sich die Plasmid-DNA im Überstand an, welcher über einen Faltenfilter in die mit 2 ml Puffer N2 voräquilibriumierte NucleoBond® AX100 -Säule dekantiert wird. Anschließend wird zweimal mit je 4 ml Puffer N3

gewaschen. Die Elution erfolgt durch eine zweimalige Elution mit je 1ml Puffer N5, welche mit jeweils 0,7 ml Isopropanol gefällt wird. Durch eine 30-minütige Zentrifugation bei 4°C wird die DNA pelletiert, der Überstand vorsichtig verworfen und das Pellet mit kaltem 70%-igem Ethanol gewaschen. Nach kurzer Vakuumtrocknung wird die DNA in 50-100 µl MQ-H₂O gelöst.

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus Listerien funktioniert, wenn auch nicht mit der gleichen Ausbeute, analog den oben vorgestellten Methoden. Zusätzlich muss zu Lösung I als auch zu Puffer S1 2 mg/ml Lysozym zugegeben werden, und die Bakterien sollten bis zu einer Stunde in diesen Lösungen bei 37°C inkubiert werden.

4.2.1.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR ist eine *in vitro* Technik, mit der man gezielt DNA-Abschnitte, die von zwei bekannten DNA-Sequenzen eingerahmt werden, vervielfältigen kann (Saiki, R.K. *et al.*, 1985). Als Starthilfe benötigt man für die Amplifizierung der DNA Oligonukleotide (Primer). Dabei handelt es sich um kurze, einzelsträngige DNA-Moleküle, die komplementär zu den Enden einer definierten Sequenz der DNA-Matrize sind. Eine DNA-Polymerase verlängert unter den richtigen Reaktionsbedingungen und in Gegenwart von Desoxynukleosid-triphosphaten (dNTPs) die Primer entlang der einzelsträngigen, denaturierten DNA-Matrize und synthetisiert so neue DNA-Stränge, deren Sequenz komplementär zur Matrize sind. All diese DNA-Moleküle liegen am Ende der Reaktion als Doppelstränge vor. Um diese Synthese zu wiederholen, muß man die doppelsträngige DNA erneut durch Hitze aufschmelzen und nach Abkühlen der Mischung die Primer wieder binden lassen. Sobald die richtige Temperatur für die Enzymreaktion erreicht ist, verlängert die DNA-Polymerase die Primer. Jede zusätzliche Strangsynthese bedeutet eine neue Vermehrungsrunde. Dabei dienen auch die neu synthetisierten DNA-Stränge als Matrize und tragen so dazu bei, daß mit jedem neuen Zyklus die Konzentration der vervielfältigten Ziel-Sequenzen ansteigt. Die PCR-Produkte enthalten an ihren Enden die Oligonukleotid-Sequenzen der Primer.

Die u.a. hier verwendete *Taq*-DNA Polymerase ist eine rekombinante, thermostabile 94 kD DNA Polymerase, die von einem modifizierten Gen der *Thermus aquaticus* DNA Polymerase abstammt (Lawyer *et al.*, 1989). Sie gehört zu den hochprozessiven DNA Polymerasen, was bedeutet, daß sie eine hohe Anzahl von Nukleotiden (2.000-4.000 pro Minute) in die DNA einbaut, bevor sie von der Matrize abfällt. Außerdem hat die *Taq*-DNA Polymerase durch eine 5'→3' Exonukleaseaktivität Reparaturfunktionen. Der PCR-Reaktionsansatz mit *Taq*-DNA Polymerase wird folgendermaßen errechnet:

Taq-Reaktionsmix (50 µl):

Oligonukleotide (1 µg/µl):	je	0,25-0,5 µl	
Matrize:		50 ng	genomische DNA oder
		5 ng	Plasmid-DNA
10x PCR Puffer :		5 µl	
dNTP-Mix (20 mM):		0,5 µl	Endkonzentration: 200 µM
Magnesiumchloridlösung (50 mM):		1,5 µl	Endkonzentration: 1,5 mM
<i>Taq</i> -DNA Polymerase (5 U/µl):		1	Einheit / 1kb PCR-Produkt in MQ-H ₂ O

Zusammensetzung des 10x PCR Puffers:	200	mM	Tris-HCl, pH 8,4
	500	mM	Kaliumchlorid

Zusammensetzung des dNTP-Mix:	20	mM	dATP
	20	mM	dCTP
	20	mM	dGTP
	20	mM	dTTP

Zur fehlerfreien Amplifikation von Genen oder DNA-Fragmenten, welche in einem Plasmid kloniert werden sollen, empfiehlt es sich, eine DNA Polymerase mit „Proofreading“-Aktivität zu verwenden. Die *Pfu*-DNA Polymerase ist ein aus *Pyrococcus furiosus* aufgereinigtes, thermostabiles Enzym, welches im Gegensatz zur *Taq*-DNA Polymerase zusätzlich eine 3'→5' Exonukleaseaktivität („Proofreading“) besitzt (Lundberg, K.S. *et al.*, 1991). Allerdings besitzt die *Pfu*-DNA Polymerase eine langsamere Extensionsrate, sie amplifiziert ca. 1kb in 2 Minuten.

Pfu-Reaktionsmix (100 µl):

Oligonukleotidprimer (1 µg/µl)	je	0,5-1 µl	
Matrize:		50-100 ng	genomische DNA oder
		5-10 ng	Plasmid-DNA
10x PCR Puffer :		10 µl	
dNTP-Mix (20 mM):		1 µl	Endkonzentration: 200 µM
Magnesiumsulfatlösung (100 mM):		0-10 µl	Endkonzentration: 2 mM – 12 mM
<i>Pfu</i> -DNA Polymerase (3 U/µl):		1	Einheit / 1kb PCR-Produkt in MQ-H ₂ O

Zusammensetzung des 10x *Pfu*-DNA

Polmerase Puffers:	200	mM	Tris-HCl, pH 8,8
--------------------	-----	----	------------------

100	mM	Kaliumchlorid
100	mM	Ammoniumsulfat
20	mM	Magnesiumsulfat
1	mg/ml	BSA
1	%	Triton X-100

Die erforderlichen PCR-Zyklen setzen sich gewöhnlich aus drei Schritten zusammen, dem Schmelzen der DNA bei 94°C, um komplementäre Stränge voneinander zu trennen, dem Anlagern der Primer an die ssDNA bei 37-65°C, um die Polymerisation zu initiieren (annealing) und dem Primer-Extensionsschritt bei dem für die *Taq*-DNA Polymerase spezifischen Temperaturoptimum von 72°C. Zu Beginn der PCR-Zyklen kann man noch einen anfänglichen Schmelzschritt zur vollständigen Denaturierung der Matrizen-DNA vorausschicken. Am Ende der PCR ist es vorteilhaft, noch einen 5-minütigen Syntheseschritt anzuhängen, damit die Polymerase alle Stränge zu Ende synthetisieren kann.

Gewählte PCR-Zeiten und Temperaturen:

Initialer Schritt:	3 min	94°C	1 Zyklus
Denaturierung:	1 min	94°C	} 30 Zyklen
Primeranlagerung:	1 min	50-60°C	
Primerverlängerung:	1 min* bzw. 2 min** pro 1kb	72°C	
letzter Schritt:	5 min	72°C	1 Zyklus

*: *Taq*-DNA Polymerase, **: *Pfu*-DNA Polymerase

4.2.1.5 Reinigung von DNA aus PCR-Ansätzen

Bevor man die in der PCR amplifizierte DNA für weitere Klonierungsschritte verwenden kann, müssen noch die übrigen Komponenten des PCR-Ansatzes entfernt werden, da die Enzyme, die in den Folgeschritten Verwendung finden, nur in einem speziellen Milieu arbeiten. Dazu wird eine Prozedur der Firma QIAGEN® angewandt: die QIAquick PCR Reinigung. Dabei wird die zu reinigende DNA in Gegenwart einer hohen Konzentration chaotropher Salze über eine Kieselgelsäule gegeben, wo sie adsorbiert wird, während Verunreinigungen wie Salze, Enzyme, nicht inkorporierte Nukleotide, Oligonukleotide, Farbstoffe und Detergenzien die Membran passieren (Vogelstein und Gillespie, 1979). Die Hauptmenge an Salzen wird dann durch den Ethanol-haltigen PE-Waschpuffer nochmals entfernt und die DNA mit MQ-H₂O eluiert. Bei der

Reinigungsprozedur gibt man 5 Volumenteile Puffer PB zum PCR-Ansatz. Dieses Gemisch wird über eine QIAquick Kieselgel-Säule gegeben und bei 3000 g abzentrifugiert. Anschließend wäscht man mit 750 µl Puffer PE und zentrifugiert zweimal bei 10.000 g, wobei man zwischendurch den Durchlauf verwirft. Zuletzt wird mit 50 µl MQ-H₂O eluiert. Die Firma QIAGEN macht im übrigen keine Angaben über die Zusammensetzung der Puffer PB und PE.

4.2.1.6 Verdau von DNA mit Restriktions-Endonukleasen

Restriktions-Endonukleasen binden spezifisch an doppelsträngige DNA und schneiden diese in oder neben einer Erkennungssequenz, der Restriktionsschnittstelle. Diese speziellen Enzyme stammen generell aus Prokaryoten und werden von diesen benutzt, fremde DNA wie u.a. Bakteriophagen-DNA zu degradieren. Die eigene genomische DNA wird dadurch geschützt, indem Nukleotide innerhalb der Restriktionsstelle methyliert werden. Die Enzyme werden in drei Typen klassifiziert: Typ I- und Typ III- Enzyme besitzen Methylierungs- und Spaltungsaktivität in einem Protein, während Typ II- Restriktionsendonukleasen nur spalten und eine separate Methylase dieselbe Erkennungssequenz modifiziert. In der Molekulabiologie benutzt man deshalb routinemäßig vorwiegend Typ II- Enzyme.

Der Hauptanteil dieser Enzyme erkennt eine spezifische Sequenz, die vier, fünf oder sechs Nukleotide lang ist und eine palindrome Symmetrie hat. Diese kann, je nach Enzym, mit glatter Schnittstelle oder mit überstehenden einzelsträngigen Enden geschnitten werden. Jedes Enzym schneidet optimal in einem bestimmten Milieu, das durch einen Puffer hergestellt wird. Die Firma Amersham Pharmacia Biotech bietet Restriktionsendonukleasen in Verbindung mit dem 10fach konzentrierten One-Phor- ALL Puffer Plus an, welchen man in einer Endkonzentration von 0,5fach bis 2fach einsetzen kann.

Sollen PCR-Fragmente mit anhängenden Schnittstellen für Restriktionsenzyme und die für die Klonierung dieser Fragmente zu verwendenden Plasmid-Vektoren mit zwei verschiedenen Enzymen geschnitten werden, so kann man mit beiden Enzymen gleichzeitig schneiden, wenn diese gleich gut in demselben Puffer aktiv sind oder hintereinander, wenn jedes Enzym ein anderes Milieu benötigt. Üblicherweise benutzt man das Enzym als erstes, welches bei der niedrigeren Salzkonzentration wirksam ist, anschließend puffert man für das zweite Enzym um. Man wählt den Ansatz so, daß man erst die Hälfte des PCR-Ansatzes verdaut bzw. 1-3 µg des zu linearisierenden Vektors verwendet, 1/20-1/5 des Ansatzvolumens für den 10fachen One-Phor-All Puffer reserviert und 1 µl des ersten oder von beiden Enzymen dazugibt. Der Ansatz wird dann mindestens 90 min bei 37°C oder über Nacht bei RT verdaut. Wird danach ein zweites Enzym verwendet oder eine Dephosphorylierung angeschlossen, so wird nach der ersten Inkubation ein Deaktivierungsschritt von 10 min bei 70°C angeschlossen, dann umgepuffert und mit dem zweiten Enzym verdaut.

4.2.1.7 Dephosphorelierung von Plasmid-DNA

Damit ein durch Restriktionsverdau linearisierter Vektor sich nicht wieder religiert, wird er mit einer Alkalischen Phosphatase behandelt. Die zu diesem Zweck verwendete Alkalische Phosphatase (Calf Intestine Alkaline Phosphatase, CIP, Fa. MBI Fermentas, 1U/ μ l) ist eine Phosphatase, welche als Substrat DNA, RNA oder Proteine verwendet. Bei der Reaktion wird die DNA an den 5'-phosphorelierten Enden dephosphoreliert.



Dadurch kann theoretisch nur das nicht dephosphorelierte Fragment mit den linearisierten Vektorenden ligiert werden. Zur Dephosphorelierung verwendet man den gesamten Vektorverdau, gibt 1/10 des Endvolumens an 10x CIP-Puffer hinzu und 1 μ l CIP. Dann inkubiert man 30 min bei 37°C. Die Aktivität der Alkalischen Phosphatase kann durch eine 15-minütige Inaktivierung bei 85°C gestoppt werden.

10x CIP-Puffer:	100	mM	Tris-HCl, pH 7,5
	100	mM	Magnesiumchlorid

4.2.1.8 Agarose-Gel-Elektrophorese

Die Agarose-Gel-Elektrophorese ist eine einfache und hocheffektive Methode, um DNA aufzutrennen, zu analysieren und zu präparieren. Mit den Standard-Agarose-Gelen kann man DNA-Fragmente einer Größenordnung von ca. 0,5 kb bis 30 kb auftrennen, je nachdem, welchen Gehalt an Agarose das Gel besitzt:

Agarose (%)	Auflösungsvermögen			
0,5	30	bis	1	kb
0,7	12	bis	0,8	kb
1,0	10	bis	0,5	kb
1,2	7	bis	0,4	kb
1,5	3	bis	0,2	kb

Zur Herstellung eines Agarose-Gels werden verschieden große horizontale Gelbetten verwendet, in denen man entweder 50 ml, 150 ml oder 300 ml Gel-Lösung gießen kann. Die Agarose wird zusammen mit einem Elektrophoresepuffer aufgeköcht. Der hier verwendete TBE-Puffer ist ein Tris/Borat-Puffer, der üblicherweise im Labor für analytische und präparative Gele gleichermaßen benutzt wird. Um die DNA später im Gel sichtbar zu machen, wird in das flüssige Gel noch

Ethidiumbromid hinzugesetzt, welches eine planare Seitengruppe besitzt, die mit den gestapelten Basen der Nukleinsäuren interkaliert, sich also in die DNA einlagert. Wenn es mit UV-Licht angestrahlt wird, fluoresziert Ethidiumbromid bei 560 nm rot-orange.

Bevor das nach dieser Rezeptur hergestellte Gel erstarrt, wird es in ein abgedichtetes Gelbett gegossen, in das man vorher einen Gelkamm zur Ausbildung von Probenaschen eingesetzt hat. Nach Erkalten des Gels entfernt man den Kamm und setzt das Gel in die mit TBE-Puffer gefüllte Gelkammer ein, wobei man darauf achten muß, daß der Puffer das Gel etwas überdeckt. Die DNA-Proben müssen vor dem Auftragen mit 1/10 des Endvolumens an 10x Probenpuffer für Agarose-Gele versehen werden. Dieser Puffer enthält vor allem Saccharose, um die Probe schwerer zu machen, und Farbstoffe für eine einfachere Handhabung. Anschließend läßt man die Probe bei 90-120 Volt durch das Gel laufen. Parallel zur Probe sollte man einen DNA-Marker auftragen, um später die Größe einer DNA-Bande feststellen zu können. Will man die DNA aus dem Gel präparieren, so kann man die Bande nach Lauf mit einem sterilen Skalpell ausschneiden und die DNA aus dem Gel extrahieren.

Gelvolumen	Ethidiumbromid (10mg/ml)	Spannung
50 ml	4 µl	90 Volt
150 ml	8 µl	120 Volt
300 ml	12 µl	150 Volt

10x TBE-Puffer:	0,9	M	Tris
	0,9	M	Borsäure
	0,025	M	EDTA
Gel- und Laufpuffer:	1x		TBE-Puffer
10x Probenpuffer für Agarose-Gele:	4	M	Harnstoff
	50	%	Saccharose
	0,1	M	EDTA
	0,1	%	Bromphenolblau
	0,1	%	Xylenxyanol
DNA-Marker:	1	VT	1 Kb DNA Leiter (1,0 µg/µl)
	1	VT	10x Probenpuffer f. Agarose-Gele
	8	VT	MQ-H ₂ O

4.2.1.9 Präparation von DNA aus Agarose-Gelen

Hat man eine DNA-Bande aus einem Agarose-Gel ausgeschnitten, so muß diese aus dem Gel herauspräpariert werden. Die Extraktion von DNA aus Agarose-Gelen funktioniert nach dem gleichen Prinzip wie die Reinigung von DNA aus PCR-Ansätzen, nur muß man einen Arbeitsschritt voransetzen: Nachdem man das ausgeschnittene Gelstückchen gewogen hat, werden drei Volumenteile Puffer QG zu einem Volumenteil Gel gegeben, wobei mg gleich μl zu setzen ist. Dann wird das Gel 10-15 min bei 50°C unter Schütteln im Puffer eingeschmolzen und ein Volumenteil Isopropanol zur Probe gemischt. Der Ansatz wird über eine QIAquick Kieselgelsäule zentrifugiert, mit $750 \mu\text{l}$ Puffer PE gewaschen, trocken zentrifugiert und mit $50 \mu\text{l}$ MQ- H_2O eluiert. Diese Prozedur ist dem QIAquick Gel Extraktionsprotokoll von QIAGEN entnommen. Für den Puffer QG ist kein Rezept veröffentlicht.

Die hier beschriebene Reinigungsprozedur ist oftmals viel effektiver als die Reinigung von DNA aus PCR-Ansätzen, da man die gewünschte DNA nicht nur von Proteinen und Salzen, sondern auch von unerwünschter DNA mit differierender Laufhöhe befreit.

4.2.1.10 Ligation von DNA-Fragmenten in einen Vektor

DNA-Ligasen katalysieren die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen benachbarten $5'$ -Phosphat- und $3'$ -Hydroxyl-Enden in doppelsträngigen DNA-Ketten. Dadurch können u. a. Einzelstrangbrüche in doppelsträngiger DNA repariert werden und vor allen Dingen DNA-Restriktionsfragmente mit glatten oder homologen überstehenden Enden ligiert werden. Die T4-DNA-Ligase ist das Produkt des Gens 30 des Phagen T4 und kann aus phagen-infizierten *E. coli*-Zellen aufgereinigt werden. Für seine Aktivität benötigt es ATP als Cofaktor. T4-DNA-Ligase ist außerdem besonders hitzelabil. Man wählt einen Ligationsansatz so, daß man den im Vergleich zum Vektor 4- bis 5fachen molaren Überschuß an Fragment einsetzt. Zum Ansatz kommen $1/10$ des Ansatzvolumens an $10\times$ Ligationspuffer und $1\mu\text{l}$ T4-DNA-Ligase hinzu. Die Ligation funktioniert sehr gut in einem Volumen von $15 \mu\text{l}$, bei 15°C und Inkubation über Nacht. Neben den normalen Ligationsansätzen sollte man als Ligationskontrolle einen Ansatz mitinkubieren, der anstelle des Fragmentes MQ- H_2O enthält.

T4-DNA-Ligase:	1	U / μl	
5x-T4-DNA-Ligase-Puffer:	250	mM	Tris-HCl, pH 7,6
	50	mM	Magnesiumchlorid
	5	mM	DTT

5	mM	ATP
25	%(w/v)	Polyethylen-Glycol 8000

4.2.1.11 Herstellung von kompetenten *E. coli*-Zellen

Als kompetent bezeichnet man den Status von Bakterien- oder Hefezellen, fremde DNA aufnehmen zu können. Es gibt verschiedene Wege, *E. coli* kompetent zu machen. Zum einen erreicht man das durch Kalziumchlorid, was eine gute Transformationseffizienz erzielt und nach der Herstellung kompetenter Zellen eine anschließende Lagerung erlaubt. Später können diese zur Hitzeschock-Transformation benutzt werden. Zur Herstellung der kompetenten *E. coli*-Zellen wird eine Übernachtskultur von einer möglichst frischen Platte angelegt. Von dieser Kultur werden dann 1 ml in 100 ml vorgewärmtes LB-Medium überimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4-0,6 wachsen gelassen. Anschließend zentrifugiert man die Zellen 10 Minuten bei 3.000 g und 4°C in vorgekühlten Gefäßen ab und resuspendiert das Pellet in 1/5 Volumen eiskaltem 0,1 M Kalziumchlorid. Nachdem die Suspension 20-30 Minuten auf Eis stand, wird wieder abzentrifugiert und in 1/25 Volumen eiskaltem 0,1 M Kalziumchlorid resuspendiert. Dann stellt man die Suspension 45-60 min auf Eis. Vor dem Einfrieren bei -80°C wird noch 25% Glycerin hinzugegeben.

Ein zweite Methode, *E. coli* Zellen zu transformieren, ist die Elektroporation. Für diese Art der Anwendung müssen die Bakterien wie folgt kompetent gemacht werden: Eine *E. coli* Übernachtskultur wird 1:100 in LB-Medium verdünnt und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5-0,8 (entspricht ca. 110 KE) kultiviert. Dann stellt man 50 ml der Kultur für 15-30 min auf Eis und zentrifugiert sie anschließend für 10 min bei 5000 g und 4°C ab. Das Pellet wird daraufhin in 50 ml eiskalter Glycerin-Lösung resuspendiert und wieder abzentrifugiert. Nach zweimaliger Wiederholung dieses Waschschrittes mit 25 ml und 10 ml Glycerin-Lösung werden die Bakterien letztendlich in 500 µl Glycerin-Lösung aufgenommen und als 100 µl –Aliquots bei -80°C bis zur Elektro-Transformation eingefroren.

Glycerin-Lösung: 10 %(v/v) Glycerin in H₂O_{deion.}

4.2.1.12 Transformation von Plasmiden in *E. coli*

Bei der hier angewandten Methode der Hitzeschock-Transformation wird Plasmid-DNA mit den kompetenten *E. coli*-Zellen auf Eis gemischt, wobei die DNA wahrscheinlich an die Zellen

adhäriert. Nach kurzem Hitzeschock werden die Plasmid-Moleküle dann von manchen Zellen aufgenommen (Cohen et al.,1972). Zur Transformation von ligierten Plasmiden mischt man auf Eis 6 µl Ligationsansatz zu 200 µl kompetenten *E. coli* Zellen und inkubiert für 30 min. Für den Hitzeschock hält man die Suspension für 45 s in ein Wasserbad von 42°C und kühlt sie anschließend für 2 min auf Eis ab. Nach Zugabe von 1 ml vorgewärmtem LB-Medium läßt man den Ansatz für eine Stunde bei 37°C schütteln. Durch Abzentrifugieren kann man die Suspension ankonzentrieren und somit die gesamten Zellen auf zwei LB-Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum verteilen. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C wachsen nur diejenigen Zellen, welche ein Plasmid mit dem entsprechenden Resistenzgen tragen.

Die Zeit, welche die frisch transformierten Zellen in LB-Medium ohne Antibiotikum kultiviert werden müssen, richtet sich hierbei nach der Art des zu verwendenden Antibiotikums (siehe Tabelle 4.1). Werden *E. coli* Zellen mit einem Erythromycin-Resistenz-Plasmid transformiert, so kann eine weitere Kultivierung auf BHI-Platten für die Transformationseffizienz von Vorteil sein.

Die Elektrotransformation ist effizienter bei *E. coli* als die Hitzschocktransformation und eignet sich daher besonders für die Transformation von Plasmiden, welche größer als 10 kb sind. 100 µl kompetente Zellen werden mit 0,05-0,1 µg Plasmid-DNA oder 6 µl eines Ligationsansatzes in einer Elektroporations-Küvette bei 4°C gemischt und bei 200 Ohm, 25 µF und 2,25 kV transformiert (Zeitkonstante τ ca. 4 ms, ansonsten war die Transformation nicht effizient). Nach der Zugabe von 1 ml vorgewärmtem LB-Medium und einer Zwischenzüchtung (siehe Tabelle 4.1) bei 37°C zentrifugiert man die Bakterien kurz ab und verteilt sie zur weiteren Kultivierung in unterschiedlicher Menge auf zwei Agarplatten mit Antibiotikum.

4.2.1.13 Sequenzierung von DNA

Die zu sequenzierende, reine DNA wird mit „Big Dye“ aus dem „ABI Prism™ Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit“, Oligonukleotidlösung (0,02 µg/µl) und MQ-H₂O auf 10 µl Endvolumen für die Sequenzierungsreaktion verdünnt. Nach der Sequenzierungs-PCR kann man die DNA fällen, indem man 2 µl 3 M Natriumacetatlösung, pH 4,6, und 50 µl 95 % (v/v) Ethanol zugibt und den Ansatz für 10 min auf Eis stellt. Nach einer 30-minütigen Ultrazentrifugation bei 4°C wird das DNA-Pellet vorsichtig mit 250 µl 70 % (v/v) Ethanol gewaschen, anschließend in einer Vakuumentrifuge getrocknet und die getrocknete DNA in 12 µl „Template suppression reagent“ resuspendiert. Die Sequenzierung der DNA wurde als Serviceleistung in einem Labor des Lehrstuhls für Zoologie mit Hilfe eines DNA-Sequenzierungsgerätes der Fa. Applied Biosystems durchgeführt.

Sequenzierungsansatz:	100-200	ng	Plasmid-DNA oder
	60	ng	PCR-Produkt
	2	μ l	„Big Dye“
	1	μ l	Oligonukleotid (0,02 μ g/ μ l)
	ad 10	μ l	MQ-H ₂ O
Sequenzierungs-PCR:	10 s	96°C	
	5 s	50°C	
	4 min	60°C, 25 Zyklen	

4.2.2 Southern Blot Analyse

Southern-Blotting nennt man den Transfer von DNA-Fragmenten von einem Elektrophorese-Gel auf eine Membran (Southern, 1975). Nach der Immobilisation können DNA-Fragmente mit Hilfe von Hybridisierungs-Techniken detektiert werden, die mit der eingesetzten Sonde, z.B. in Form von Peroxidase-markierten Oligonukleotiden, homolog sind. Mit dieser Methode läßt sich beispielsweise genomische DNA auf die Präsenz bestimmter Gene analysieren.

4.2.2.1 Herstellung des DNA-Probengels

1-10 μ g der zu untersuchenden DNA wird mit 1-3 μ l Restriktionsenzym sorgfältig über Nacht bei RT gespalten und parallel zu einer DNA-Leiter auf einem TBE-Agarose-Gel (siehe 4.2.8) aufgetrennt. Nach asymmetrischer Markierung des Gels kann man es neben einem Fluoreszenzlineal fotografieren, damit später detektierte Banden ihrer Molekülgröße zugeordnet werden können. Anschließend wird das Gel mit H₂O_{deion.} gespült und einmal in 10fachem Gelvolumen Fixierungslösung für 20-30 min bei RT fixiert, wodurch größere DNA-Stränge für einen besseren Transfer zerkleinert werden. Um Kratzer an der Unterseite des Gels zu vermeiden, sollte es dabei mit der Oberseite nach unten in die Schale gelegt werden. Nach einem weiteren Spülschritt in H₂O_{deion.} wird das Gel zweimal für 20 min in 10fachem Gelvolumen Denaturierungslösung geschüttelt, mit H₂O_{deion.} gespült und zuletzt zweimal 20 min in 10fachem Gelvolumen Neutralisierungslösung inkubiert. Dabei macht die Denaturierungslösung die DNA einzelsträngig. Nachdem das Gel nochmals mit H₂O_{deion.} gespült worden ist, kann es in den Blot eingebaut werden.

Fixierungslösung:	0,25	M	HCl
Denaturierungslösung:	1,5	M	NaCl
	0,5	M	NaOH
Neutralisierungslösung:	1,5	M	NaCl
	0,5	M	Tris-HCl, pH 7,5
20x SSC:	3	M	NaCl
	0,3	M	Natriumcitrat-Dihydrat, pH 7,0

4.2.2.2 Aufbau des Kapillar-Blots

In eine horizontale Gel-Elektrophorese-Apparatur wird auf die Plattform ein in 20x SSC getränktes Blotting Papier gelegt, welches mit seinen Enden in ein Reservoir mit 20x SSC-Lösung hängt (Abb. 4.1). Darauf wird das Gel luftblasenfrei mit der Oberseite nach unten plaziert, gefolgt von einer Nylon-Membran in gleicher Größe. Auf diese Anordnung werden nun nacheinander drei mit 20x SSC befeuchtete, auf Gelgröße geschnittene Blotting Papiere, drei trockene Blotting Papiere, ein Stapel mit trockenen Papiertüchern und eine Glasplatte gelegt. Zur Beschwerung des Blots eignet sich hervorragend ein Sigma-Katalog, und zuletzt wird der Aufbau mit einer Wasserwaage horizontal austariert.

Die durch den Aufbau entstandenen Kapillarkräfte ziehen die DNA über Nacht aus dem Gel in die Membran. Nach Abbau des Blots werden die Geltaschen zur Orientierung auf dem Blot nachgezeichnet, der Blot in 2x SSC gespült und kurz angetrocknet. Mit Hilfe eines UV-Stratalinkers kann die DNA zweimal durch Wahl des „autocrosslink“ Programms auf der Membran fixiert werden.

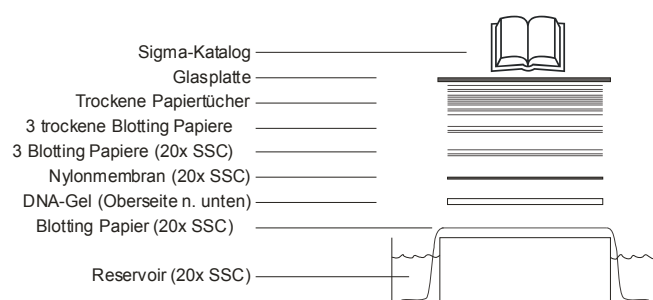


Abbildung 4.1:

Aufbau eines Kapillar-Blots für Southern Blot Analyse.

4.2.2.3 Herstellung und Markierung der DNA-Sonde

Die Sonden-DNA wird mit entsprechenden Oligonukleotiden mittels PCR amplifiziert, wobei eine ideale Sonde ca. 500 bp groß sein sollte. Nach Aufreinigung der DNA (siehe 4.2.5) muss die Sonde zur späteren Detektion auf dem Blot markiert werden.

Unter Benutzung des „ECL™ direct acid labelling and detection systems“ der Fa. Amersham Pharmacia Biotech wird die Sonden-DNA mit positiv geladenen Peroxidasekomplexen inkubiert. Dazu denaturiert man 10 µl der DNA-Lösung (Konzentration: 10 ng/µl) durch 5-minütiges Erhitzen bei 100°C im Heizblock und anschließender 5-minütiger Abkühlung auf Eis. Die Probe wird kurz abzentrifugiert und mit 10 µl „DNA Labelling Reagent“ gemischt, wodurch sich die positiv geladene Peroxidase an die DNA anlagert. Die weitere Zugabe von 10 µl Glutaraldehyd-Lösung bindet die Peroxidase kovalent an die DNA. Nach einer 10-minütigen Inkubation bei 37°C sollte die Sonde sofort weiterverwendet werden. Alternativ kann sie in 50% Glycerin bei -20°C eingefroren werden. Diese Menge an DNA-Sonde (100 ng DNA) ist ausreichend für 10 ml Hybridisierungs-Lösung. Die Rezepte des „DNA Labelling Reagents“ und der Glutaraldehyd-Lösung werden vom Hersteller nicht angegeben.

4.2.2.4 Hybridisierung

Die Hybridisierungs-Prozedur kann man in drei Teile einteilen: Zuerst wird die Membran eine Stunde bei 42°C in vorgewärmter Hybridisierungs-Lösung im Schüttelwasserbad inkubiert. Die Reagenzien dieser Lösung sollen nicht-spezifische DNA-Bindungsstellen auf der Membran blockieren. Anschließend gibt man die frisch markierte DNA-Sonde in adäquater Menge (siehe 4.2.2.3) - nicht direkt auf die Membran - zur Hybridisierungs-Lösung hinzu und inkubiert die Membran darin bei 42°C über Nacht im Schüttelwasserbad.

Am Ende der Hybridisierungs-Prozedur werden unspezifisch gebundene DNA-Sonden entfernt, indem einige Waschschrte in stringenten Waschpuffern angeschlossen werden. Dabei sollten alle Waschschrte bei 42°C erfolgen, da ansonsten die Enzymaktivität der DNA-Markierung verlorenght.

Aus diesem Grund enthält der Hybridisierungspuffer zur Erniedrigung der Hybridisierungstemperatur 6 M Harnstoff. Die Membran wird zweimal für 20 min mit Waschpuffer 1 und danach zweimal für 20 min in Waschpuffer 2 gewaschen. Die Rezepte für das „Blocking Agent“ und den „Gold hybridization buffer“ werden vom Hersteller nicht angegeben.

Hybridisierungs-Lösung:	0,5	M	NaCl
	5	%(w/v)	„Blocking Agent“

	in „Gold hybridization buffer“, 2 h rühren		
Waschpuffer 1:	6	M	Harnstoff
	0,4	%(w/v)	SDS
	0,5	x	SSC
Waschpuffer 2:	2	x	SSC

4.2.2.5 Detektion der markierten Sonde

Zur Detektion der spezifisch auf dem Blot gebundenen, Peroxidase-markierten DNA-Sonde wird der Blot direkt nach dem Waschen in einer Detektionslösung inkubiert. Diese enthält Wasserstoffperoxid als Substrat für die Peroxidase und Luminol, welches nach Oxidation blaues Licht produziert. Dieses kann nach Auflegen eines Röntgenfilms auf der Membran sichtbar gemacht werden.

Detektionslösung:	1	VT	„ECL detection reagent 1“
	1	VT	„ECL detection reagent 2“

4.2.3 Reverse Transkriptions-PCR

4.2.3.1 Präparation von RNA

Zur Präparation von bakterieller Gesamt-RNA eignet sich der „E.Z.N.A. Bacterial RNA Kit“. Listerien werden aus einer Übernachtskultur 1:100 in BHI-Medium verdünnt und bis 180 KE kultiviert. Anschließend zentrifugiert man 10 ml dieser Kultur bei 4°C und 6000 g ab, wäscht sie in kaltem PBS nimmt die Bakterien in 200 µl BRL-Puffer und 1 ml TRK-Lysepuffer (+ 20 µl β-Mercaptoethanol), beide aus dem „E.Z.N.A. Bacterial RNA Kit“, auf. Die Suspension überführt man in ein Schreddergefäß, in dem sich Glaskügelchen befinden. Nach Fixierung des Gefäßes in einem Schreddergerät wird mit den Einstellungen „speed=6,5, time=45 sec“ 3-4-mal geschreddert. Die geknackten Bakterien können anschließend bei 4°C und 10000 g abzentrifugiert werden; danach befindet sich die RNA im Überstand. Je 450 µl des Überstandes wird mit 0,83 VT Ethanol gemischt und über eine Säule mit Silikamembran für 30 s bei 10000 g zentrifugiert. Anschließend gibt man nacheinander 700 µl Waschpuffer I und zweimal 700 µl Waschpuffer II auf die Membran

und zentrifugiert für 30 s bei 10000 g. Nachdem die Säule trocken zentrifugiert wurde, wird die RNA mit 50 µl DEPC-H₂O eluiert.

DEPC-H₂O: 0,01 % DEPC in H₂O_{deion.},
Inkubation über Nacht bei 37°C,
20 min bei 121°C (Autoklav)

4.2.3.2. DNase-Behandlung von RNA

Für eine reverse Transkription muss die RNA frei von DNA sein, weil die Reverse Transkriptase auch DNA als Matrize verwenden kann. Zur DNase-Behandlung kann der „DNA-freeTM Kit“ der Fa. Ambion nach Angaben des Herstellers verwendet werden. Die RNA wird mit 1/10 des Endvolumens mit 10fach DNase I- Puffer, 1-2 µl DNase I (2 Einheiten/ µl) und DEPC-H₂O gemischt und 0,5-1 Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend erreicht man durch die Zugabe von 1/10 VT oder 5 µl „DNase Inactivation Reagent“ für 2 min bei RT und nachfolgender Abzentrifugation (2 min bei 10000 g) eine Entfernung der Enzyme aus dem Reaktionsansatz. Die so gereinigte RNA kann nach einer negativen Kontroll-PCR (Kontrolle auf Anwesenheit von DNA) für eine reverse Transkription verwendet werden.

4.2.3.3 Reverse Transkription und cDNA-PCR

M-MuLV-Reverse Transkriptase ist ein Produkt des *pol*-Gens des *Moloney murine leukemia virus* und weist eine RNA-abhängige DNA-Polymeraseaktivität, eine DNA-abhängige DNA-Polymeraseaktivität und eine RNaseH-Aktivität auf, die den RNA-Anteil des RNA-DNA-Hybrids abbaut. Durch Zugabe eines RNase-Inhibitors wird diese Aktivität jedoch gehemmt.

1-5 µg der DNA-freien RNA und 300 ng eines oder mehrerer 3'-Oligonukleotide werden in 35 µl DEPC-H₂O verdünnt, 5 min bei 65°C zur Denaturierung der RNA inkubiert und 10 min bei RT abgekühlt. Mit Hilfe der M-MuLV-RT, des „1st strand buffers“ und des „RNA-Guards“ aus dem „ProStarTM First Strand RT-PCR-Kits“ der Fa. Stratagene wird ein Reaktionsgemisch hergestellt, welches man eine Stunde bei 37°C inkubieren lässt. In diesem Ansatz befindet sich dann die cDNA, von der man zur Bestimmung ihrer relativen Konzentration eine Verdünnungsreihe herstellt. Diese Verdünnungsreihe kann als Matrize in einer Standard-PCR mit einem spezifischen 5'-Oligonukleotid und dem in der Reversen Transkription eingesetzten 3'-Oligonukleotid einsetzen werden.

Reverse Transkription-Reaktionsgemisch:	32	μl	RNA (1-5 μg) in DEPC-H ₂ O
	3	μl	3'-Oligonukleotid (100 ng/μl)
	5	μl	„1 st strand buffer“
	5	μl	0,1 M DTT
	3,75	μl	20 mM dNTP-Mix
	1	μl	„RNA-Guard“
	1	μl	M-MulV-Reverse Transkriptase

4.2.4 Konstruktion von *Listeria* Deletionsmutanten

Mit Hilfe der Deletionsmutagenese können isogene Mutanten aus einem *Listeria*-Stamm hergestellt werden. Die Deletion eines gewählten Bereichs auf dem Chromosom kann dabei zielgerichtet erfolgen, solange die DNA-Sequenzen der Randbereiche der zu deletierenden Region bekannt sind. Das Schema der Deletionsmutagenese ist in Abbildung 4.2 dargestellt.

Nachdem man die zu deletierende Region auf dem Chromosom festgelegt hat, werden zwei Fragmente (a und b) von jeweils ca. 500 Basenpaaren definiert. Diese Fragmente liegen dabei direkt stromaufwärts bzw. stromabwärts von der zu deletierenden Region. Vor den Startpunkt und hinter das Ende der zu deletierenden Region wird eine PspAI-Schnittstelle geplant, welche gleichzeitig das Ende von Fragment a und den Anfang von Fragment b markiert.

Mittels PCR werden zunächst die Fragmente a und b mit Hilfe von *Pfu*-DNA Polymerase und mit chromosomaler DNA von *Listeria* als Matrize amplifiziert und gereinigt. Dabei wird über geeignete Oligonukleotide die Schnittstelle *Bam*HI an das 5'-Ende und die Schnittstelle *Psp*AI an das 3'-Ende des Fragmentes a eingeführt, während Fragment b mit einer *Psp*AI-Schnittstelle am 5'-Ende und *Eco*RI am 3'-Ende versehen wird. Beide Fragmente werden nach der Restriktion mit *Psp*AI und einer nachfolgenden Reinigung über ein Agarose-Gel in möglichst isomolarer Konzentration durch eine T4-DNA-Ligase miteinander ligiert. Das dadurch entstandene Fragment a+b wird nochmals durch eine PCR mit Hilfe des 5'- Oligonukleotids von Fragment a, des 3'-Oligonukleotids von Fragment b und einer *Pfu*-DNA Polymerase zur weiteren Klonierung vervielfältigt und wiederum über ein Agarose-Gel gereinigt. Anschließend spaltet man sowohl das Mutagenese-Ausgangsplasmid pLSV1 als auch das Fragment a+b mit den Restriktionsenzymen *Eco*RI und *Bam*HI, reinigt die DNA-Fragmente und ligiert sie miteinander mit Hilfe von T4-DNA-Ligase. Der Ligationsansatz kann dann mittels Elektrotransformation in den Klonierungswirt *E. coli* DH10b transformiert werden. Sollte die Klonierung wie beschrieben nicht funktioniert haben, kann auch der Umweg über eine Klonierung des Fragmentes a+b in pUC18 mit nachfolgender Subklonierung in pLSV1 gegangen werden.

Das neue Mutagenese-Plasmid pLSVa+b wird daraufhin in den *Listeria*-Ausgangsstamm für die Deletionsmutagenese transformiert. Dabei ist darauf zu achten, dass pLSV einen Temperatursensitiven Replikationsursprung für Gram-positive Bakterien besitzt. Das hat zur Folge, dass dieses Plasmid bei 30°C in *Listeria* repliziert wird, während bei 43°C der für *Listeria* entscheidende Replikationsursprung des Plasmides nicht mehr funktioniert. Der zweite, von pBR322 abstammende Replikationsursprung kann nur von Gram-negativen Bakterien wie *E. coli* genutzt werden. Praktisch bedeutet das, dass pLSVa+b nach der Transformation in *Listeria* zunächst bei 30°C auf einer BHI-Agarplatte mit 5 µg/ml Erythromycin kultiviert werden muss. Ein positiv transformierter Klon sollte zusätzlich mittels *Taq*-PCR und den Oligonukleotiden 2 und 3 (Abb. 4.2) auf Anwesenheit eines kurzen PCR-Produktes überprüft werden.

Wird der mit pLSVa+b transformierte *Listeria*-Klon über Nacht bei 30°C in BHI-Medium mit Erythromycin kultiviert, so kommt es zu einzelnen homologen Rekombinationsereignissen, da sowohl das Fragment a als auch das Fragment b homolog zu den Originalfragmenten auf dem Chromosom sind. Dabei wird pLSVa+b entweder über Fragment a oder über Fragment b in das Chromosom integriert.

Diese Ereignisse lassen sich dadurch selektionieren, indem man aus der bei 30°C gezogenen *Listeria*-Kultur eine Verdünnungsreihe herstellt, von dieser jeweils 100 µl auf eine BHI-Agarplatte mit Erythromycin ausplattiert und die Platten ein bis drei Tage bei 43°C inkubieren lässt. *Listeria* mit nicht integrierten Plasmiden können bei dieser Temperatur auf Erythromycin nicht wachsen, wohl aber solche, welche das integrierte Plasmid und somit auch den Erythromycin-Resistenzmarker über den chromosomalen Replikationsursprung replizieren können.

Es hat sich durch Erfahrung bewährt, Integrationsmutanten auszuwählen, welche das Mutagenese-Plasmid über Fragment a integriert haben. Ausgehend von diesen Mutanten konnten oftmals schneller Deletionsmutanten isoliert werden als von solchen, welche das Plasmid über Fragment b inseriert hatten. Man kann diese Integrationsmutanten einfach von den anderen oder völlig falschen Klonen dadurch unterscheiden, indem man folgende PCR durchführt: Von den bei 43°C gewachsenen Klonen wird ein Schnell-Lysat hergestellt. Jedes dieser Lysate dient als Matrize sowohl für eine PCR-Reaktion mit den Oligonukleotiden 1 und 3 als auch für eine PCR-Reaktion mit den Oligonukleotiden 2 und 4, wobei immer genomische DNA des Ausgangsstammes als Kontrolle mitgeführt wird. Den richtigen Klon erkennt man an einem im Vergleich zum Ausgangsstamm verkürzten PCR-Produkt der Oligonukleotide 1 und 3, während das Produkt der Oligonukleotide 2 und 4 gleich groß wie das des Ausgangsstammes sein sollte.

Dieser Klon wird nun bei 30°C 10- bis 30-mal in BHI-Medium ohne Antibiotikum in 1:100-Verdünnungsschritten passagiert. Zwischendurch wird immer wieder durch gleichzeitiges Ausplattieren einer (-6)-Verdünnung der Passage auf eine Platte mit und ohne Erythromycin kontrolliert, wieviele Bakterien die Resistenz und somit das Plasmid durch eine zweite homologe Rekombination verloren haben. Nachdem 80-90% der Bakterien Erythromycin-sensitiv geworden

sind, werden einige BHI-Agarplatten angelegt, auf denen sich einzelne *Listeria*-Klone befinden. Dann überführt man eine Reihe von Klonen zunächst auf eine BHI-Agarplatte und parallel dazu auf eine Platte mit Erythromycin. Dabei werden nur Erythromycin-sensitive Klone zur weiteren Suche nach Deletionsmutanten ausgewählt.

Sollte die zweite homologe Rekombination über das Fragment b erfolgt sein, so wäre die zu deletierende Region erfolgreich aus dem Chromosom entfernt. Eine zweite Rekombination über Fragment a hätte zur Folge, dass das Plasmid aus dem Chromosom herausspringt, ohne eine Deletion herbeizuführen.

Daher müssen die selektierten Erythromycin-sensitiven Klone letztendlich mittels PCR auf eine erfolgreiche Deletion hin getestet werden. Von diesen Klonen wird ein Schnell-Lysat als Matrize hergestellt und mit den Oligonukleotiden 1 und 4 ein PCR-Produkt erzeugt. Ist dieses Produkt – verglichen mit dem Produkt vom Ausgangsstamm - um die Größe der zu deletierenden Region verkürzt, so war die Deletionsmutagenese erfolgreich.

Wird ein Gen wie *iap* aus dem Chromosom deletiert oder wieder eingefügt, so kann man eine einfachere, alternative Testmethode zur Identifizierung von positiven Klonen benutzen. Da ein Antikörper existiert, welcher das Genprodukt p60 des Genes *iap* erkennt, können *iap*-negative oder *iap*-positive Mutanten mit Hilfe eines Kolonie-Immunoblots (siehe 4.5.3) viel schneller identifiziert werden.

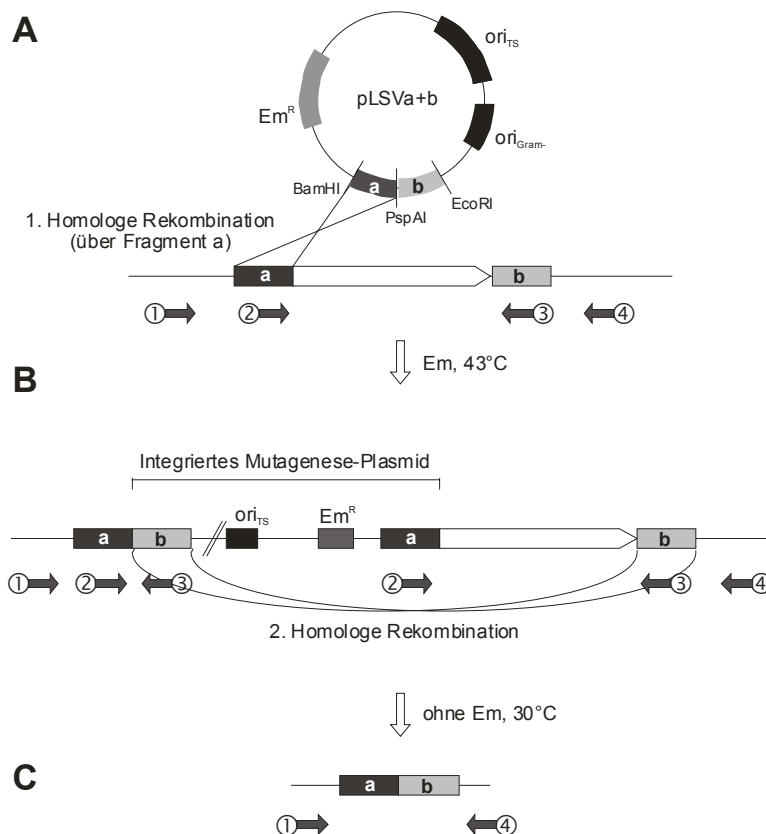


Abbildung 4.2: Schema einer Deletionsmutagenese zur Herstellung von *Listeria*-Deletionsmutanten. Die nummerierten Pfeile kennzeichnen die Lage der Oligonukleotide 1 bis 4. **A:** Anordnung der Fragmente im Chromosom des Ausgangsstammes bzw. auf dem Mutageneseplasmid *pLSVa+b*. **B:** Genetische Anordnung nach Integration des Mutageneseplasmides durch die erste homologe Rekombination über Fragment a. **C:** Nach der zweiten homologen Rekombination über Fragment b ist die zu deletierende Region aus dem Chromosom entfernt.

4.2.5 Rekombinante PCR-Technik

Zur Verknüpfung zweier Sequenzen ohne die Einführung einer Restriktions-Schnittstelle eignet sich die Methode der rekombinanten PCR (Higuchi, 1990). Dabei werden vier Oligonukleotide benötigt, wobei sich die Oligonukleotide B und C in 16 Basenpaaren überlappen müssen (Abb 4.3). In zwei getrennten Ansätzen wird je eine PCR mit den Oligonukleotiden A und B bzw. C und D durchgeführt, wobei als DNA Polymerase eine „Proofreading“-Polymerase verwendet wird. Die erhaltenen Fragmente werden aufgereinigt, gemischt und eine zweite PCR ohne zusätzliche Oligonukleotide durchgeführt. Bei dieser PCR-Reaktion, bestehend aus nur 20 Zyklen, sollte man, abweichend von üblichen PCR-Temperaturen, eine Anlagerungstemperatur von etwa 48°C benutzen. Dabei kommt es zu einer Anlagerung der PCR-Fragmente im Bereich der überlappenden DNA-Bereiche und schließlich zu einer 3'-Verlängerung (3'-Extension) der Einzelstränge. Durch die Zugabe der Oligonukleotide A und D sowie einer „Proofreading“-Polymerase zu den erhaltenen PCR-Produkten erreicht man in einer dritten PCR-Reaktion die Vervielfältigung des gewünschte PCR-Fragmentes. Die fertigen Fragmente werden nach einer Agarose-Gel-Elektrophorese ausgeschnitten und aus dem Gel eluiert.

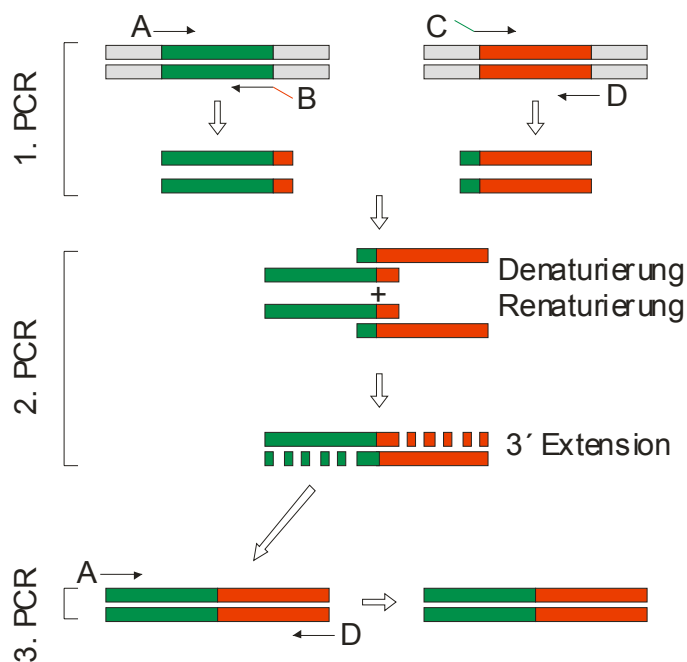


Abbildung 4.3: Schema einer rekombinanten PCR mit drei einzelnen PCR-Reaktionen. A-D repräsentieren Oligonukleotide, wobei B und C komplementär zueinander sind.

4.3 Proteinanalytische Methoden

4.3.1 Präparation bakterieller Proteine für SDS-PAGE

Listeria- und *E. coli*-Stämme werden in entsprechenden Medien bis zur gewünschten Wachstumsphase kultiviert. Will man die zellulären Proteine präparieren, so muss man nach Abzentrifugation der Bakterien bei 6000 g und 4°C das Pellet einmal in kaltem PBS waschen und wieder abzentrifugieren. Anschließend wird das Pellet in 2x SDS-Probenpuffer resuspendiert, 10 min (*E. coli*) bzw. 20 min (*Listeria*) bei 110°C im Heizlock erhitzt und bei -20°C bis zur Elektrophorese gelagert. *E. coli* Zellen lassen sich mit dieser Methode besser aufschließen als *Listeria* Zellen, daher werden *E. coli* Zellen auf die Hälfte des Kulturvolumens in 2x SDS-Probenpuffer ankonzentriert, während *Listeria* Zellen in 1/10 des Kulturvolumens aufgenommen werden.

Überstandsproteine werden dadurch gewonnen, dass man nach der ersten Zentrifugation den Kulturüberstand abnimmt und durch die Zugabe von 10 % (v/v) Trichloressigsäure (Endkonzentration) auf Eis für eine Stunde fällt. Größere Mengen an gefällten Überstandsproteinen werden 30 min bei 6000 g abzentrifugiert, während kleinere Mengen besser bei 10000 g abgetrennt werden sollten. Der Überstand wird verworfen und die Proteine mit kaltem Aceton gewaschen und in Aceton in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Auf Eis gestellt, lässt man dort das Aceton kurz verdampfen und resuspendiert das Proteinpellet in einem 1/100 Überstandsvolumen 2x SDS-Probenpuffer. Die Probe wird abschließend bei 110°C im Heizblock für 5 min gekocht und bei -20°C gelagert.

2x SDS-Probenpuffer:	100	mM	Tris-HCl, pH 6,8
	20	%(v/v)	Glyzerin
	10	%(w/v)	β-Mercaptoethanol
	4	%(w/v)	SDS
	0,005	%(w/v)	Bromphenolblau
Trichloressigsäure (100%):	1000	g	Trichloressigsäure (Pulver)
	454	ml	H ₂ O _{deion.}

4.3.2 SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

SDS-PAGE trennt Proteine nach ihrem Molekulargewicht auf, wobei die aggregierten Proteine in ihre einzelnen Polypeptid-Untereinheiten zerlegt werden. Dazu wird das stark anionische Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) in Kombination mit Hitze und oft noch zusätzlich reduzierenden Agenzien verwendet. Die durch die Hitze denaturierten Polypeptide binden das SDS und werden so negativ geladen. Dabei ist die Menge an gebundenem SDS immer proportional zu dem Molekulargewicht des Polypeptides und unabhängig von dessen Sequenz. Die SDS-Polypeptid-Komplexe wandern durch das Polyacrylamidgel, wobei die Geschwindigkeit von der Größe des Polypeptids abhängt. Unter Verwendung von Markern mit bekanntem Molekulargewicht kann man auf das Molekulargewicht der aufgetrennten Polypeptide schließen; besonders bei prokaryotischen Proteinen kann man mit guter Annäherung das Molekulargewicht schätzen, weil diese kaum glykosyliert werden.

Als Polyacrylamid-Gele werden Tris-Glyzin-Gele nach dem Lämmli-Puffersystem benutzt (Lämmli, 1970), welche aus einem homogenen 10-15%igen Laufgel und einem 4%igen Sammelgel, in dem der die Sammeltaschen ausbildende Gelkamm steckt, zusammengesetzt sind. Zwischen zwei fettfreien Glasplatten werden an den Längsseiten 0,75 mm Abstandshalter eingesetzt und zusätzlich muss an den Seiten und an der Unterseite der Platten ein Plastikschlauch als Dichtung verwendet werden, welcher mit Klammern fixiert wird. Sofort nach Zugabe von APS und TEMED wird das Trenngel zwischen die Platten gegossen und mit etwas n-Butanol überschichtet. Nach Polymerisierung muss zuerst das n-Butanol abgegossen werden, damit das Sammelgel bis zum oberen Glasrand eingefüllt werden kann. Der Kamm, der die gleiche Stärke wie die Abstandshalter besitzen sollte, wird in das Sammelgel gesteckt und erst nach der Polymerisierung wieder entfernt.

Vor dem Auftragen der Proben wird das fertige Gel in eine vertikale Elektrophoresekammer eingespannt und die Reservoirs luftblasenfrei mit 1x Laufpuffer aufgefüllt. Nachdem man die Taschen ausgespült hat, werden der Marker und die Proben aufgetragen. Dabei eignen sich ca. 15-20 µl der in 4.3.1 beschriebenen Präparationen. Anschließend läßt man die Gele bei ca. 200 Volt laufen.

	10 %-iges Trenngel	12,5 %-iges Trenngel	15 %-iges Trenngel	4 %-iges Sammelgel
30 % Acrylamid/Bisacrylamid	13,3 ml	16 ml	20,4 ml	2,6 ml
1,5 M Tris-HCl, pH 8,8	10 ml	10 ml	10 ml	-
1,5 M Tris-HCl, pH 6,8	-	-	-	5 ml
10 % (w/v) SDS	0,4 ml	0,4 ml	0,4 ml	0,2 ml
H ₂ O _{deion.}	16 ml	13,4 ml	9,3 ml	12,2 ml
10% (w/v) APS	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,1 ml
TEMED	0,02 ml	0,02 ml	0,02 ml	0,02 ml

10x Laufpuffer:	1,92	M	Glyzin
	0,25	M	Tris
	1	%(w/v)	SDS

Marker: „SDS PAGE Molecular Weight Standards,Broad range”

4.3.3 Färbung eines SDS-Polyacrylamid-Gels mit Coomassie Blau

Nach einer SDS-PAGE kann man die aufgetrennten Polypeptide mit einer Lösung gleichzeitig fixieren und färben, die ein Methanol/Eisessig-Gemisch und die Farbstoffe Coomassie Blue R 250 und Coomassie Blue G 250 enthält (Bennet und Scott, 1971). In dieser Lösung läßt man das Gel 30-60 min auf einem Schüttler färben. Anschließend entfernt man die überschüssige Farbe mit Entfärber-Lösung I, bis die ersten Proteinbanden zu sehen sind, gefolgt von einer vollständigen Entfärbung des Geles mit Entfärber-Lösung II. Danach kann das Gel fotografiert werden.

Coomassie-Lösung:	0,2	%(w/v)	Coomassie Blue R250
	0,05	%(w/v)	Coomassie Blue G250
	42,5	%(v/v)	Ethanol
	5	%(v/v)	Methanol
	10	%(v/v)	Eisessig
	42,5	%(v/v)	H ₂ O _{deion.}

Entfärber I:	10	%(v/v)	Eisessig
	50	%(v/v)	Methanol
	40	%(v/v)	H ₂ O _{deion.}

Entfärber II:	7,5	%(v/v)	Eisessig
	5	%(v/v)	Methanol
	87,5	%(v/v)	H ₂ O _{deion.}

4.3.4 Western Blot Analyse

Bei der Western Blot Analyse (Tobwin *et al.*,1979; Burnette, 1981) transferiert man elektrophoretisch aufgetrennte Proteine von einem Gel auf einen festen Träger und untersucht diese

mit Hilfe von Reagenzien, die spezifisch für eine bestimmte Aminosäuresequenz sind. Normalerweise verwendet man dazu Antiseren, die antigene Epitope auf dem zu untersuchenden Protein erkennen.

Zum Transfer der Proteine plaziert man zwei auf Gelgröße zurechtgeschnittene, in Anodenpuffer I getränkte Blotting Papiere auf die Grafitplatte (Anode) einer „SemiDry Blot“ Kammer; darauf kommt ein weiteres Blotting Papier, welches vorher in Anodenpuffer II getaucht worden ist. Ein Stück Nitrozellulosemembran wird mit $H_2O_{\text{deion.}}$ befeuchtet und ebenfalls auf die Papiere gelegt. Das fertig gelaufene SDS-Polyacrylamid-Gel wird kurz mit $H_2O_{\text{deion.}}$ gespült und luftblasenfrei auf die Membran plaziert. Dabei wird die Position der einzelnen Markerbanden eines vorgefärbtes Markers auf der Membran mit einer Kanüle markiert. Den Blot schließen drei in Kathodenpuffer getauchte Blotting Papiere ab, welche zuletzt mit der zweiten Grafitplatte (Kathode) abgedeckt werden. Nach Anschluss der Kammer an ein Netzgerät erfolgt der Transfer bei $0,89 \text{ mA/cm}^2$ Membranfläche; Proteine um die 60 kDa werden für ca. 75 min geblottet. Nach Abschluss des Transfers entnimmt man die Nitrozellulosemembran der Apparatur und beginnt mit der Immunfärbung.

Der erste Schritt der Immunfärbung ist eine Inkubation der Membran mit einem primären Antiserum, welches gegen das zu detektierende Protein gerichtet ist. Danach wird ein Peroxidasegekoppelter Zweitantikörper zugegeben, welchen man zur Visualisierung mit Chloronaphtol oder einer ECL-Detektionslösung (siehe 4.2.2.5) sichtbar machen kann. Vor allen Schritten sollte man noch zur Elimination von unspezifischen Reaktionen Blockierungsschritte einfügen.

Praktisch geht man folgendermaßen vor, dass man die Membran 30 min in Blockierungslösung inkubiert und anschließend einmal kurz in Waschlösung I, einmal kurz in Waschlösung II und einmal kurz in PBS wäscht. Danach folgt die Inkubation der Membran bei 4°C über Nacht oder bei RT für zwei Stunden mit verdünntem Antiserum. Nach einem analogen Waschschrift wird die Membran mit dem Peroxidase-markierten Zweitantikörper für eine Stunde bei RT inkubiert.

Der Western Blot kann mit verschiedenen Methoden entwickelt werden. Zum einen kann eine Mischung von Wasserstoffperoxid und 4-Chloronaphtol verwendet werden, wobei das Chloronaphtol nach der Oxidation eine blaue Farbreaktion macht. Zum anderen kann man besonders zur Visualisierung einer sehr geringen Proteinmenge das „ECLTM Western Blotting detection reagent“ benutzen. Dieses enthält neben Wasserstoffperoxid als Oxidationsmittel für die Peroxidase den Chemoluminiszenz-Farbstoff Luminol, welcher nach der Oxidation blaues Licht erzeugt. Dieses kann nach Auflegen eines Röntgenfilms auf der Membran sichtbar gemacht werden.

Marker:

“Prestained Precision Protein Standards,
Broad range”

Anodenpuffer I:	300	mM	Tris
	20	%(v/v)	Methanol
Anodenpuffer II:	25	mM	Tris
	20	%(v/v)	Methanol
Kathodenpuffer:	25	mM	Tris
	40	mM	ϵ -Aminocaprinsäure
10x PBS:	1,37	M	NaCl
	26,8	mM	KCl
	81,7	mM	Na ₂ HPO ₄
	14,7	mM	KH ₂ PO ₄ , pH 7,0
Blockierungslösung:	5	%(w/v)	Magermilchpulver in 1x PBS
Waschlösung I	1	%(w/v)	Magermilchpulver in 1x PBS
Waschlösung II:	1	%(w/v)	Magermilchpulver in 1x PBS
	0,05	%(v/v)	Tween 20
Farbentwickler:	47	ml	1x PBS
	3	ml	0,3% 4-Chloronaphthol in Methanol
	60	μ l	Wasserstoffperoxid
ECL-Detektionslösung:	1	VT	„Western blotting detection reagent 1“
	1	VT	„Western blotting detection reagent 2“

4.3.5 Kolonie-Immunoblot

Mit Hilfe des Kolonie-Immunoblots (Lo und Cameron, 1986) ist die Identifizierung von Klonen, die ein gesuchtes Protein auf eine Membran sekretieren, durch Antikörper-Reaktionen möglich.

Ein Nitrocellulose-Rundfilter wird auf eine Agarplatte aufgelegt. Nun verteilt man die Bakteriensuspension mit den zu testenden Kolonien in geeigneter Verdünnung direkt auf der Nitrocellulosemembran mit Hilfe von Glaskügelchen, wobei das Volumen der Bakteriensuspension 500 μ l pro Filter nicht überschreiten sollte. Man läßt den Nitrocellulosefilter kurz

antrocknen, bevor man eine Positiv- und Negativkontrolle in der Mitte des Filters ausstreicht. Die Inkubation erfolgt bei 37°C über Nacht.

Am nächsten Tag werden die Kolonien auf dem Filter auf einen neuen Nitrocellulosefilter replikaplatziert. Der zweite Rundfilter wird anschließend auf eine frische Agarplatte gelegt und bei 37°C inkubiert. Durch eine Positionsmarkierung auf beiden Filtern ist die Identifizierung einzelner Klone nach der Durchführung des Blots möglich.

Der Originalfilter wird nun zweimal für je 15 min in Lysispuffer bei 37°C in einer Petrischale geschüttelt. Im Anschluß daran wäscht man ihn dreimal für je 5 min mit PBS, tupft die Koloniereste vorsichtig ab und trocknet den Filter. Die weitere Immunfärbung ist in Kapitel 4.3.4 beschrieben. Durch einen Vergleich der Kolonien nach Entwicklung des Kolonie-Immunoblots mit denen auf der Replikaplatte lassen sich positive und negative Klone identifizieren.

Lysispuffer:	50	mM	Tris-HCl, pH 7,5
	150	mM	NaCl
	5	mM	MgCl ₂
	0.75	%(w/v)	BSA
	400	µg/ml	Lysozym

4.4 Genexpression und Reinigung der Expressionsprodukte

Die Expression eines gewünschten Proteins in *E. coli* ist mit Hilfe von Vektoren möglich, die sich in diesem Organismus replizieren können und Kontrollregionen zur induzierbaren Expression des Proteines tragen. Mit Hilfe der pQE-Vektoren der Fa. QIAGEN kann man ein Protein als His-tag-Fusionsprotein exprimieren und dieses als lösliches oder unlösliches Expressionsprodukt von *E. coli* über eine Nickel-Chelat-Säule reinigen. Die gereinigten Expressionsproteine sind dann z.B. für Immunisierungszwecke oder nach Endotoxinreinigung in Proliferationstests einsetzbar.

4.4.1 Genexpression im pQE30-Vektor

Für eine Expression in kleinem Maßstab werden 5 ml Übernachtskultur eines positiv transformierten *E.coli*-Klons, dessen Plasmid das gewünschte Genfragment inseriert hat, in 2YT-Medium mit Ampicillin herangezogen. 1 ml dieser Übernachtskultur wird mit 5 ml frischem Selektionsmedium bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6-0,8 geschüttelt. Nach Entnahme von 1 ml der Kultur als Negativkontrolle und 1 ml zur OD₆₀₀-Bestimmung induziert man die Expression durch Zugabe von

1 mM IPTG. Nach 3 Stunden bricht man die Expression ab. Dazu entnimmt man wieder 1 ml Kultur als Positivkontrolle und 1 ml zur OD₆₀₀-Bestimmung.

Wenn man das Expressionsprodukt anschließend aufreinigen will, muß man eine Expression in größerem Maßstab durchführen: Mit einer 5 ml-Übernachtskultur impft man 500 ml 2YT-Medium mit Ampicillin an und schüttelt über Nacht bei 37°C. Die 500 ml Kultur wird dann zu 5.000 ml 2YT-Medium mit Ampicillin gegeben und ca. zwei bis drei Stunden auf eine OD₆₀₀ von 0,6-0,8 wachsen gelassen. Anschließend wird eine dreistündige Expression nach Zugabe von 1 mM IPTG induziert und die Zellen bei 6.000 g und 4°C abzentrifugiert, wonach sie eingefroren werden. Auch hier wird eine Negativ- und Positivkontrolle entnommen.

Zur Beurteilung der Expressionsleistung der Bakterien in einer SDS-PAGE mit anschließender Coomassie Blau-Färbung (siehe 4.3.2 und 4.3.3) muß man immer eine Negativkontrolle und eine Positivkontrolle auftragen, um *E. coli*-kodierte Proteine subtrahieren zu können. Die vor und nach der Expression entnommenen Kulturproben werden bei 6.000 g und 4°C abzentrifugiert und in 2x SDS-Probenpuffer aufgenommen. Damit beide Proben vergleichbar sind, werden Zellen, welche aus 1 ml einer Kultur mit der Dichte OD₆₀₀=1 gewonnen wurden, in 100 µl Probenpuffer aufgenommen. Anschließend wird die Probe ca. 10 Minuten bei 110°C gekocht, wodurch eine vollständige Lyse der Bakterienzellen garantiert wird.

4.4.2 Präparation von löslichen Expressionsprodukten für die Affinitätschromatografie

Der erste Schritt zur Aufarbeitung eines Expressionsproduktes für die Affinitätschromatografie ist die Resuspension des Zellpellets, welches aus einem 5-Liter Expressionsansatz gewonnen wurde. Dies gelingt am besten, wenn man das Pellet im gefrorenen Zustand bearbeitet. Es wird gewogen, in 5 ml Lysispuffer / g Pellet resuspendiert und nach Zugabe von 1 µl Benzonase / g Pellet und 1 mg/ml Lysozym lange gerührt, bis die Präparation homogen ist. Zum Aufschluß der Zellen wird bei dieser großen Menge an Material die „French Press“ benutzt, wobei die Bakterien durch dreimaliges Passieren bei 900 psi lysiert werden. Wenn man diesen Aufschluß 30 Minuten bei 4°C und 10000 g abzentrifugiert, befindet sich das lösliche Fusionsprotein im Überstand, welches nun chromatografisch über eine Nickel-Chelat-Säule aufgereinigt werden kann.

Lysispuffer:	50	mM	NaH ₂ PO ₄
	300	mM	NaCl
	10	mM	Imidazol, pH 8,0
Benzonase:	25	U / µl	

4.4.3 Reinigung eines Expressionsproduktes über Nickel-Chelat

Bei der Reinigung von Expressionsprodukten über Nickel-Chelat-Säulen macht man sich die Affinität von Ni-NTA-Harz (Nickel-Nitrilotriacetat) für Proteine zunutze, die sechs hintereinander liegende Histidine besitzen (Hochuli, 1988). Diese Affinität ist weitaus größer als die zwischen den meisten Antigenen und Antikörpern, so daß andere *E. coli* -Proteine, welche unspezifisch an das Harz binden, unter relativ stringenten Bedingungen abgewaschen werden können. Die Nickelsäule, die mindestens ein 20 ml-Gelbett enthalten sollte, wird vor dem Lauf regeneriert. Zuerst wird das alte Nickel mit einem EDTA-Puffer heruntergewaschen, dann wird mit H₂O_{deion.} nachgespült und die Säule über Nacht in 1M Natronlauge gelagert. Anschließend muß die Lauge wieder mit H₂O_{deion.} bis auf pH 7 herausgespült werden, damit man sie wieder mit Nickel beladen kann. Dazu gibt man einfach eine Nickelsulfatlösung über die weiße Säule, bis sie wieder grün ist. Jetzt ist die Säule bereit, um die Expressionsprodukte chromatografisch aufzutrennen. Zuerst wird die Säule mit Elutionspuffer gewaschen, um alle Verunreinigungen, die mit diesem Puffer eluiert werden, von der Säule herunterzuholen. Anschließend gibt man den Überstand über die Säule, spült anschließend mit Waschpuffer nach, bis die OD₂₆₀ auf Null gesunken ist und eluiert mit Elutionspuffer. Um das Imidazol zu entfernen, wird das Eluat 2-3mal bei 4°C gegen PBS dialysiert.

EDTA-Puffer:	0,05	M	EDTA
	0,02	M	NaH ₂ PO ₄ , pH 7,0
Nickelsulfatlösung:	0,1	M	Nickelsulfat
Waschpuffer:	50	mM	NaH ₂ PO ₄
	300	mM	NaCl
	20	mM	Imidazol
Elutionspuffer:	50	mM	NaH ₂ PO ₄
	300	mM	NaCl
	250	mM	Imidazol

4.4.4 Endotoxin-Reinigung des Expressionsproduktes

Zur *in vitro* Restimulation von Milzzellen mit spezifischem Antigen muss dieses vor Zugabe zu den Zellen von Endotoxinen wie Lipopolysacchariden (LPS) befreit werden. LPS wirkt als

Mitogen auf murine B-Zellen, so dass man eine spezifische Proliferation von Antigen-spezifischen T-Zellen mit einem LPS-Hintergrund nicht mehr eindeutig nachweisen kann. In *E. coli* exprimierte Proteine sind auch nach Affinitätschromatografie stark mit LPS verunreinigt.

Zur Endotoxin-Reinigung eines proteinhaltigen Eluates wird dieses zweimal über eine 10 ml Detoxi-Gel™-Säule (Fa. Perbio) gegeben. Auf der Säule befindet sich immobilisiertes Polymyxin B, welches eine starke Affinität zu Endotoxinen aufweist.

Vor der Endotoxin-Reinigung wird die Säule zuerst mit 50 ml 1 %iger Natriumdesoxcholat-Lösung in pyrogenfreiem Ampuwa-H₂O von Endotoxinen gereinigt, anschließend spült man mit 50 ml Ampuwa-H₂O nach und äquilibriert die Säule mit 1x PBS in Ampuwa-H₂O. Nach zweimaligem Durchlauf der zu reinigenden Proteinlösung kann das Gel auf die gleiche Weise wieder regeneriert werden.

4.5 Zweidimensionale Gel-Elektrophorese

Die 2D-Gel-Elektrophorese wird zur Analyse von komplexen Proteinmischungen benutzt, welche man aus Zellen, Geweben oder, wie hier beschrieben, aus Bakterien gewinnen kann. Diese Technik sortiert Proteine in Abhängigkeit von zwei unterschiedlichen Eigenschaften in zwei Schritten: In der ersten Dimension werden Proteine durch eine isoelektrische Fokussierung (IEF) nach ihrem jeweiligen isoelektrischen Punkt separiert und in der zweiten Dimension mittels SDS-PAGE weiter nach ihrer jeweiligen molekularen Größe getrennt. Jeder „Spot“ aus dem so erhaltenen zweidimensionalen Gel repräsentiert dabei ein einzelnes Protein, welches man anschließend aus dem Gel extrahieren und mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie identifizieren kann.

4.5.1 Proteinextraktion von *Listeria*-Gesamtproteinen

Aus einer *Listeria*-Übernachtskultur werden 25 ml BHI-Medium mit 250 µl des entsprechenden *Listeria*- Stammes angeimpft und bis OD₆₀₀ = 1,0 kultiviert. Durch Zugabe von 20 µg/ml Chloramphenicol und weiterem Schütteln für 5 min kann die Proteinexpression der Bakterien gestoppt werden. Nach Abzentrifugation und zweimaligem Waschen mit 5 ml PBS + 20 µg/ml Chloramphenicol wird das Pellet in 980 µl Tris-Puffer und 20 µl Protease-Inhibitor-Mix resuspendiert.

Hat man die Bakterien durch anschließendes Schreddern (6x 30 s auf Stufe 6,5 mit einminütigen Pausen) auf Eis aufgeschlossen, so können die Nukleinsäuren durch eine 15-minütige Inkubation mit 5µl DNase/RNase-Mix abgebaut werden. Der Überstand des Aufschlusses, den man durch eine 10-minütige Zentrifugation bei 4°C und 10000 g gewinnt, wird durch Zugabe von 1/12 VT

Trichloressigsäure für 1 h auf Eis gefällt. Eine anschließende Zentrifugation für 30 min bei 4°C und 10000 g pelletiert die gefällten Proteine. Nachdem man das Pellet zweimal mit kaltem Aceton gewaschen hat, wird es kurzzeitig getrocknet und in 150 µl Harnstoffpuffer + 15 µl CHAPS-Lösung resuspendiert. Zur vollständigen Lösung der Proteine inkubiert man die Protein-Probe mindestens 2 h bei 30°C und durch eine letzte Zentrifugation (2 min bei 10000 g) sollte man den Proteinextrakt von nicht löslichen bakteriellen Zellwand-Bestandteilen abtrennen.

Tris-Puffer:	10	mM	Tris-Cl
	5	mM	MgCl ₂ x 6 H ₂ O
			in H ₂ O _{deion.} , pH 7,2
Protease-Inhibitor-Mix:	1	VT	Pepstatin (2 mg/ ml)
	1	VT	Leupeptin (2 mg/ ml)
	1	VT	Pefabloc SC (AEBSF)
DNase/Rnase-Mix	1	VT	Benzonase (25 U / µl)
	1	VT	RNase (10 U / µl)
Harnstoffpuffer:	7	M	Harnstoff
	2	M	Thioharnstoff
	70	mM	DTT
	2	%	IPG-Puffer (pI 3-10 oder pI 4-7) in H ₂ O _{deion.} , Lagerung bei 4°C
CHAPS-Lösung:			400 mg/ml CHAPS, Lagerung bei 4°C

4.5.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration der Proben für die 2D-Elektrophorese erfolgt mit dem „Protein assay“ der Fa. Bio-Rad nach Angaben des Herstellers. Für eine Kalibrierungsgerade werden 0, 2, 4, 6, 8, 10 und 12 µl einer BSA-Lösung der Konzentration 1µg/µl auf ein Gesamtvolumen von 800 µl mit H₂O_{deion.} verdünnt. Je 1 µl der Probenlösung wird analog mit H₂O_{deion.} verdünnt. Nach Zugabe von 200 µl Farbstoff-Konzentrat aus dem „Protein assay“ und einer Inkubationszeit von 5 min bis 1 h wird die optische Dichte bei 595 nm gegen den Nullwert gemessen. Der BSA-Kalibrierungsgerade entnimmt man anschließend die Konzentration der Proteinprobe.

4.5.3 Auftrennung der Proteine in der ersten Dimension

In der ersten Dimension erfolgt die Auftrennung des Proteingemisches durch eine isoelektrische Fokussierung. Dabei wandern die Proteine in einem immobilisierten pH-Gradienten abhängig von ihrem jeweiligen isoelektrischen Punkt, wobei dieser den spezifischen pH darstellt, bei dem die Nettoladung des Proteins null ist. Bei Anwendung des Multiphor II Systems der Fa. Amersham Pharmacia Biotech werden „IPG-Strips“ verwendet, welche einen definierten pH-Gradienten besitzen.

Zuerst wird der jeweilige IPG-Strip luftblasenfrei auf 350 µl Rehydrierungslösung in einem „Strip holder“ positioniert und mit „Cover fluid“ überdeckt. Hat man die Strips für 16 h bei 0 Volt in einer IPGphor-Einheit rehydriert, werden am Ende der Rehydrierungszeit mit H₂O_{deion.}-vorbenetzte Filterstücke (ca. 0,5 x 0,5 cm) zwischen dem Strip und den beiden Elektroden positioniert, um überschüssige Salze aufzufangen. Anschließend werden die Proteine nach folgendem Protokoll für insgesamt 175.000 Voltstunden fokussiert:

Rehydrierung	16 h	0 Volt
Segment 1	1 h	500 Volt
Segment 2	1 h	1000 Volt
Segment 3	> 20 h	8000 Volt

Bei ca. 50.000 Voltstunden werden die Filterstücke gegen frische ausgetauscht. Nach Ende der Fokussierung friert man die mit Proteinen beladenen IPG-Strips auf Trockeneis ein und lagert sie weiter bei -20°C.

Rehydrierungslösung:

- 75 µg Gesamt-Protein (bei späterer Silberfärbung)
- bzw. 300 µg Gesamt-Protein (bei späterer Coomassie-Färbung)
- 0,5 % IPG-Puffer (Endkonzentration)
- ad 350 µl Rehydrierungspuffer

Rehydrierungspuffer:

- 8 M Harnstoff
- 2 % CHAPS
- einige Körner Bromphenolblau
- in H₂O_{deion.}, Lagerung bei -20°C

=> direkt vor Verwendung: 7 mg DDT + 2,5 ml Rehydrierungspuffer

4.5.4 Auftrennung der Proteine in der zweiten Dimension

In der zweiten Dimension erfolgt die Auftrennung der Proteine nach ihrer jeweiligen molekularen Größe mittels SDS-PAGE. Dabei wird der mit Proteinen beladene IPG-Strip aus der isoelektrischen Fokussierung zuerst in SDS-Puffer und DTT äquilibriert, um die Proteine in reduzierter Form zu erhalten. Durch eine zweite Äquilibrierung mit Iodoacetamid sollen Thiolgruppen an den Proteinen alkylieren werden, wodurch eine Reoxidierung der Proteine während der Elektrophorese verhindert wird.

4.5.4.1 Herstellung der SDS-Gele

Mit Hilfe des „Hoefer DALT Gel Casters“ ist es möglich, bis zu 23 Gele gleichzeitig zu gießen. Die Gekassetten und Trennfolien werden nach Reinigung abwechselnd in den Gießständer eingebaut und fixiert. In die dafür vorgesehene Öffnung wird ein Füllrohr mit Trichter gesteckt und in die umgebende Wanne werden ca. 100 ml „Displacing solution“ gefüllt. Pro Gel setzt man ca. 70 ml Gellösung an und gießt diese luftblasenfrei in das Füllrohr. Anschließend zieht man das Rohr aus der Öffnung und lässt die „Displacing solution“ nachlaufen, welche die Gellösung nach oben zwischen die Platten drückt. Nach der Polymerisation werden die Gele in Folie eingeschlagen und in „Gel storage solution“ bei 4°C gelagert.

10 % SDS-PAA-Gel	0,33 VT	30%	Acrylamid-Lösung
	0,25 VT	1,5 M	Tris-HCl, pH 8,8
	0,01 VT	10%	SDS
	0,01 VT	10%	APS
	0,00005 VT		TEMED
	0,396 VT		H ₂ O _{deion.}
„Displacing solution“	50 ml	1,5 M	Tris-HCl, pH 8,8
	100 ml (126 g)		Glyzerin
	50 ml		H ₂ O _{deion.}
	2 mg		Bromphenolblau
„Gel storage solution“	500 ml	1,5 M	Tris-HCl, pH 8,8
	20 ml	10%	SDS
			ad 2 l H ₂ O _{deion.}

4.5.4.2 Äquilibrierung von fokussierten IPG-Strips

Der IPG-Strip wird 5 min vor der Äquilibrierung aufgetaut und anschließend für jeweils 15 min in 10 ml DTT/Äquilibrierungspuffer sowie 10 ml Iodoacetamid/Äquilibrierungspuffer inkubiert. Nach der Äquilibrierung wird der Strip zügig und luftblasenfrei auf die Oberkante des SDS-PAA-Gels aufgelegt, welches vorher mit 1x SDS-Laufpuffer überschichtet worden ist. Anschließend gießt man den SDS-Laufpuffer ab und fixiert den Strip, indem er luftblasenfrei mit Agaroselösung überschichtet wird. Die Gele werden in einen DALT Elektrophorese-Tank in 1x SDS-Laufpuffer positioniert und bei 90 mA und 14°C elektrophoretisch aufgetrennt.

Äquilibrierungspuffer:	50 mM	Tris-Cl, pH 8,8
	6 M	Harnstoff
	30%	Glyzerin
		einiger Körner Bromphenolblau
DTT/Äquilibrierungspuffer:	100 mg	DTT
	+10 ml	Äquilibrierungspuffer (frisch ansetzen)
Iodoacetamid/Äquilibrierungspuffer:	250 mg Iodoacetamid	
	+10 ml	Äquilibrierungspuffer (frisch ansetzen)
10x SDS-Laufpuffer: (nach Lämmli)	1,92 M	Glyzin
	250 mM	Tris
	1%	SDS
		ad H ₂ O _{deion.}
Agaroselösung:	0,5 %	Agarose M in 1x SDS-Laufpuffer

4.5.5 Färbung von 2D-Gelen mit Silbernitrat

Die Silberfärbung ist die sensitivste nicht-radioaktive Methode zur Detektion von Protein-Spots auf 2D-Gelen. Nur wenn alle Inkubationszeiten bei dieser Färbung genau eingehalten werden, ist eine Vergleichbarkeit von verschiedenen Gelen eines Experimentes möglich. Nach Entnahme aus den Gelkassetten werden die 2D-Gele sofort in 250 ml Fixierlösung für 3-16 h und in 125 ml 30% Ethanol zweimal für je 30 min inkubiert. Anschließend müssen die Gele für genau eine Minute in

Oxidierlösung gebadet werden, wobei das darin enthaltene Natriumthiosulfat eine spätere nicht Protein-gebundene Reduktion von Silberionen und damit eine Anfärbung des Gelhintergrundes verhindert. Zur Entfernung des Thiosulfates wird das Gel dreimal für je eine Minute in 250 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{deion.}}$ gewaschen. Durch eine einstündige Inkubation in 125 ml Silbernitratlösung reichert man das Gel mit Silberionen an. Anschließend wird das Gel schnell zweimal für 30 s mit 250 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{deion.}}$ gewaschen. Danach erfolgt die eigentliche Färbung durch Protein-spezifische Reduktion der Silberionen im Gel zu elementarem Silber. Hierzu inkubiert man das Gel für 5-15 min mit 125 ml Entwicklungslösung. Um die fertige Färbung sofort stoppen zu können, verwendet man eine EDTA-Lösung, in der das Gel für eine Stunde gebadet wird. Nach einer anschließenden Inkubation in $\text{H}_2\text{O}_{\text{deion.}}$ kann das Gel gescannt und in einen Kunststoffbeutel eingeschweißt werden.

Fixierlösung:	50	%(v/v)	Ethanol
	12	%(v/v)	Essigsäure
Oxidierlösung:	0,0247	%(v/v)	Formaldehyd (Stammlösung: 37 % Formaldehyd)
	0,0247	%(w/v)	Natriumthiosulfat (Stammlösung: 43 % $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 5 \text{H}_2\text{O}$)
Silbernitratlösung:	0,2	%(w/v)	AgNO_3
	0,0247	%(v/v)	Formaldehyd
Entwicklungslösung:	6	%(w/v)	NaCO_3
	0,0004	%(w/v)	Natriumthiosulfat
	0,0185	%(v/v)	Formaldehyd
Stopplösung:	1,46	%(w/v)	EDTA

4.6 Elektronenmikroskopie

4.6.1 Transmissions-elektronenmikroskopische Präparate von Listerien

Bis zur mittleren exponentiellen Wachstumsphase in BHI-Medium kultivierte Listerien werden abzentrifugiert und mit PBS gewaschen. Indem man das Bakterienpellet in einer Polylysin-Lösung resuspendiert, kommt es zu einer Verklumpung der Bakterien. Das durch eine nachfolgende Zentrifugation entstehende Pellet löst sich nicht mehr auf und kann daher mit einer Pinzette leicht

in andere Gefäße überführt werden. Anschließend wird das Pellet in Karnovsky-Lösung für 3 Stunden auf Eis fixiert. In ein Glasröhrchen wird 0,05 M Cacodylatpuffer gefüllt und das Pellet mit einer Pinzette 5-mal eingetaucht. Nach einer Inkubation in Osmiumtetroxid-Lösung für 2 Stunden unter dem Abzug wird das Bakterienpellet 5-mal für 3 min in $\text{H}_2\text{O}_{\text{deion.}}$ eingetaucht und kommt über Nacht in eine Lösung aus 0,5 % Uranylacetat. Nach 5 dreiminütigen Waschschrritten in $\text{H}_2\text{O}_{\text{deion.}}$ muss das Pellet langsam entwässert werden, wobei es für jeweils 30 min nacheinander in 50 %, 70 %, 90 %, 96 % und dreimal in 100 % kaltem Ethanol auf Eis inkubiert wird. Da das Einbettmedium Epon in Propylenoxid löslich ist, wird das Pellet in einem Glasröhrchen dreimal für 30 min in Propylenoxid getaucht. Über Nacht kommt es dann unter dem Abzug in eine 1+1 Mischung aus Propylenoxid und Epon, dabei verdampft der größte Teil des Propylenoxids. Am folgenden Tag wird das Pellet noch mehrere Male in frisches Epon umgebettet und kommt dann für drei Tage zum Aushärten in einen Trockenschrank.

Die Schnitte werden anschließend freundlicherweise von der Zentralen Abteilung für Elektronenmikroskopie des Biozentrums hergestellt.

Polylysin-Lösung:	0,1	mg/ml	Poly-L-Lysin in 1x PBS
Karnovsky-Lösung:	0,5	ml	Paraformaldehyd
	12,5	ml	$\text{H}_2\text{O}_{\text{deion.}}$
	1-3	Tr.	1 M NaOH, durch Hitze lösen
	2,5	ml	25% Glutaraldehyd
	10	ml	0,2 M Cacodylatpuffer, pH 7,4
Osmiumtetroxid-Lösung:	2	%	OsO ₄ in 0,05 M Cacodylatpuffer, pH 7,4

4.6.2 Transmissions-elektronenmikroskopische Präparate von intrazellulären Listerien

Mit Listerien infizierte Zellen werden für Transmissions-elektronenmikroskopische Präparate genau nach dem Protokoll „Fixierung und Flacheinbettung von Kulturzellen auf Deckgläschen (cover-slips)“ der Zentralen Abteilung für Elektronenmikroskopie vorbereitet.

Dazu werden Zellen auf runden Deckgläsern ausgesät und nach ein bis zwei Tagen mit Listerien infiziert (siehe 4.7.5). Einige Stunden nach der Infektion werden die Zellen nochmals mit $\text{PBS}(\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+})$ gewaschen und zur Fixierung im Napf für 30 min in Glutaraldehydlösung eingelegt. Zum Waschen taucht man das Deckglas 5-mal kurz mit einer Pinzette in 0,05 M Cacodylatpuffer, pH 7,4, ein und legt es für eine Stunde zurück in einen Napf mit Osmiumtetroxid-

Lösung (siehe 4.6.1). Nachdem man das Deckglas wieder mehrere Male in H₂O_{deion.} getaucht hat, findet eine Fixierung über Nacht in 0,5 % Uranylacetat statt.

Am Tag darauf wird das Deckglas dreimal für 5 min in H₂O_{deion.} gewaschen und anschließend in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert. Dabei sollte es für je 5 min auf Eis nacheinander mit 50 %, 70%, 90 %, 96% und zweimal mit 100 % Ethanol inkubiert werden. Für zwei 5-minütige Inkubationsschritte in Propylenoxid muss ein Glasgefäß verwendet werden. Dabei darf das Präparat beim Flüssigkeitswechsel nie trocken werden. Für zwei bis vier Stunden wird das Präparat nun in eine 1+1 Mischung aus Propylenoxid und Epon getaucht, wobei das Propylenoxid größtenteils verdampft. Anschließend kommt das Deckglas noch mehrmals in frisches Epon. Eine Gelatine kapsel, welche mit einem Markierungszettel und Epon gefüllt ist, wird mit der offenen Seite auf das Präparat aufgesetzt. Nach einer Trocknungszeit von drei Tagen im Trockenschrank wird das Präparat freundlicherweise von der Zentralen Abteilung für Elektronenmikroskopie weiterverarbeitet und geschnitten.

Glutaraldehydlösung:	2,5	%	Glutaraldehyd
			in 0,05 M Cacodylatpuffer, pH 7,4

4.6.3 Raster-elektronenmikroskopische Präparate von Listerien

Kleine, runde Deckgläser werden zur besseren Anhaftung der Bakterien mit 0,1 mg/ml Poly-L-Lysin für ca. 15 min beschichtet und getrocknet. Mit PBS gewaschene Listerien, welche in BHI-Medium bis zu einer mittleren exponentiellen Wachstumsphase kultiviert wurden, sollte man auf ein 1/10 des Ausgangsvolumens ankonzentrieren, damit möglichst viele Bakterien auf dem Deckglas haften bleiben. Auf ein Stück Parafilm wird ein Tropfen dieser Listeriensuspension pipettiert, und darauf wird das Deckglas mit der beschichteten Seite nach unten für ca. 10 min gelegt. Dann zieht man den Tropfen vorsichtig mit einem Stück Blotting Papier ab und lässt die Bakterien kurz antrocknen. Anschließend sollte man die Bakterien über Nacht mit Glutaraldehydlösung fixieren und wäscht sie danach (durch kurzes Eintauchen des Deckglases) 5-mal mit Sörensenpuffer.

Nun muss das Präparat in einer aufsteigenden Acetonreihe entwässert werden, d.h., man legt das Deckglas nacheinander in 30 %, 50 %, 70 %, 90 % und zweimal in 100 % Aceton, wobei Glasgefäße benutzt werden müssen und das Präparat nie trocken werden darf. Zur Kritischen-Punkt-Trocknung kommt das Präparat in einen Probenbehälter, welcher sich in 100 % Aceton befindet. Nach Überführung des Probenbehälters in die zur Hälfte mit Aceton gefüllte Kammer des Kritischen-Punkt-Trockners wird der Rührer des Gerätes aktiviert und auf 5°C gekühlt. Nun wird durch abwechselndes Bedienen der Tasten „Medium in“ und „Medium out“ CO₂ in die Kammer

geblasen, bis sie voll zu sein scheint (es ist eine Luftblase am oberen Fenster der Kammer zu sehen). Nach einer 5-minütigen Wartezeit wird das Gas wieder aus der Kammer abgelassen, bis der Flüssigkeitspegel abgesunken ist. Je öfter der Vorgang (6-8 mal) wiederholt wird, desto besser funktioniert die Trocknung. Danach schaltet man die Kühlung und der Rührer ab und die lässt die Kammer auf 41°C erwärmen, wodurch ein Kammerdruck von 90 bar entsteht. Zuletzt wird der Drehknopf „gas out“ soweit aufgedreht, dass der Druck innerhalb von 2-3 Stunden auf ca. 50 bar sinken kann. Die Goldbeschichtung der Bakterien mit einer Schichtdicke von 30 nm wird anschließend von der Zentralen Abteilung für Elektronenmikroskopie durchgeführt.

Glutaraldehydlösung:	6,25	%	Glutaraldehyd in Sörensenpuffer, pH 7,4
Sörensenpuffer, pH 7,4:	81,8	ml	66,7 mM KH ₂ PO ₄
	18,2	ml	66,7 mM Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O

4.6.4 Immuno-Gold-Markierung von Listerien

Listerien werden in BHI-Medium bis zur exponentiellen Phase kultiviert und anschließend zweimal mit PBS gewaschen und in 1/10 des Ausgangsvolumens in PBS gründlich resuspendiert. Zur Adhäsion der Bakterien und zur Gold-Markierung haben sich Kohle-bedampfte Nickelnetze bewährt, welche mit einer Titanpinzette bewegt werden müssen. Diese Netze legt man für 10 min mit der Kohle-bedampften Seite auf einen Tropfen der ankonzentrierten Bakteriensuspension, welche vorher auf ein Stück Parafilm pipettiert wird. Nachdem man mit einem Streifen Blotting Papier die überschüssige Bakteriensuspension von dem Netz kurz abgezogen hat, überführt man es sofort für eine Stunde auf einen Tropfen mit Fixierlösung. Ein Glasröhrchen wird mit PBS gefüllt, darin taucht man die Netze nach der Fixierung 10-mal vorsichtig ein. Zusätzlich muss vor einer Immunfärbung mit einem Antikörper noch das restliche Formaldehyd im Präparat gequenchet werden, daher wird das Netz 15 min auf eine Glyzinlösung aufgelegt.

Die weitere Immunfärbung erfolgt analog zu dem Protokoll „Immunlokalisation“ der Zentralen Abteilung für Elektronenmikroskopie: Dazu werden die Netze nacheinander für 5 min auf einen Tropfen PBS und für 5 min auf einen Tropfen der Lösung LB 1 aufgelegt. Danach folgt eine einstündige Inkubation mit dem primären Antikörper. Dieser wird in Lösung LB1 schwach verdünnt (10-20 x konzentrierter als für einen Western Blot). Anschließend füllt man ein Glasröhrchen mit Lösung LB 1 und taucht das Netz darin 10-mal ein. Da dieser Waschschrift aber nicht ausreichend ist, legt man das Netz nochmals nacheinander für jeweils 10 min zweimal auf einen großen Tropfen der Lösung LB 1 und zweimal auf einen großen Tropfen der Lösung LB 2.

Als sekundärer Antikörper kann ein Anti-Maus-IgG-Antikörper bzw. ein Anti-Kaninchen-IgG-Antikörper verwendet werden, welcher an 12 nm-Kügelchen aus kolloidalem Gold gekoppelt ist. Der Antikörper wird 1:10 in Lösung LB 2 verdünnt und das Netz darauf für eine Stunde aufgelegt. Abschließend muss sehr gründlich gewaschen werden: Zuerst wird das Netz 10-mal in ein Glasröhrchen mit Lösung LB 2 eingetaucht, dann wird es zweimal für 10 min auf einen großen Tropfen LB 2 aufgelegt und letztendlich dreimal für 5 min auf einen großen Tropfen MQ-H₂O. Das Netz sollte dann sorgfältig in einem dafür vorgesehenen Behältnis zum Trocknen aufbewahrt werden.

Es hat sich außerdem herausgestellt, dass man nach der Färbung das Präparat nicht kontrastieren sollte, da man ansonsten im Transmissionselektronenmikroskop die Goldkügelchen nur um das Bakterium herum und nicht mehr auf dem Präparat erkennen kann. Der Nachteil eines nicht kontrastierten Präparates ist jedoch, dass die Grenzen des Bakteriums nicht gut zu erkennen sind.

Fixierlösung:	4	%(w/v) Paraformaldehyd
	30	mM NaPO ₄ , pH 7,4
		durch Erhitzen (nicht kochen) lösen
Glyzinlösung:	10	mM Glyzin in 1x PBS
LB 1:	1	%(w/v) BSA
	0,1	%(v/v) Tween 20 in PBS, 0,2 µ
LB 2:	0,1	%(w/v) BSA
	0,1	%(v/v) Tween 20 in PBS, 0,2 µ

4.7 Arbeiten mit Zellkulturen

Beim Umgang mit Zellkulturen ist darauf zu achten, jegliche Gefahr der Kontamination zu vermeiden. Aus diesem Grund werden alle Arbeiten unter der Sterilbank durchgeführt und Hände, Arbeitsflächen sowie Geräte mit 70 %igem Ethanol desinfiziert. Alle Medien, Zusätze und Puffer müssen autoklaviert bzw. sterilfiltriert werden.

Die Kultivierung der verwendeten Zelllinien erfolgt unter optimalen Wachstumsbedingungen im Brutschank bei 37° C unter 5 % CO₂-Begasung in dem der Zelllinie entsprechenden Medium. Alle zwei bis drei Tage sollten die Zellen entweder passagiert oder das Medium gewechselt werden, um angefallene Stoffwechselprodukte sowie abgestorbene Zellen zu entfernen und um die Zellkultur mit frischen Nährstoffen sowie Wachstumsfaktoren zu versorgen.

Um eine Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten, sollte man die Zellen nicht länger als 20 Passagen in Kultur halten. Außerdem ist es von Vorteil, alle Arbeitsschritte soweit wie möglich zu standardisieren. Ein Faktor, den man bei Zellkulturversuchen ebenfalls beachten sollte, ist der Differenzierungsgrad der Zellen. Bei einigen Zelllinien beginnen sich die Zellen nach einigen Tagen zu differenzieren und zu polarisieren. Dies führt zu drastischen Änderungen der Morphologie und Oberflächenstruktur der Zellen. Daher muss darauf geachtet werden, dass sich bei zusammengehörigen Versuchen wichtige Parameter wie zum Beispiel Kultivierungsbedingungen, Zeitraum zwischen Aussäen und Beginn der Infektion, Grad der Konfluenz und Differenzierungsstadium der Zellen so wenig wie möglich unterscheiden.

4.7.1 Passagieren von Zellen

Nachdem Zellen zu einem konfluenten Monolayer herangewachsen sind, stellen sie auf Grund gegenseitiger Kontaktinhibition ihr Wachstum ein. Es beginnt ein Alterungsprozeß, der vermutlich durch Stoffwechselprodukte der Zellen ausgelöst wird. Die adhärenen Zellen differenzieren sich oder lösen sich von ihrer Unterlage und sterben ab. Um dies zu vermeiden, werden die Zellen in geringerer Dichte auf neue Kulturgefäße aufgeteilt; dieser Arbeitsschritt wird als „passagieren“ bezeichnet.

Zunächst wird das alte Medium aus der Kulturflasche abgesaugt und der Zellrasen einmal mit 1x PBS-Lösung gewaschen. Nach Zugabe von maximal 1 ml unverdünnter Trypsin/EDTA-Lösung wird die Flasche kurz geschwenkt, um die Lösung gleichmäßig über die Zellen zu verteilen. Nach etwa 20-60 Sekunden saugt man die Trypsin/EDTA-Lösung ab und stellt die Kulturflasche für 10-20 min zurück in den Brutschrank. Anschließend sollte man die trypsinisierten Zellen zügig mit frischem vorgewärmtem Medium vom Boden der Flasche abspülen und darin resuspendieren. Ein Teil dieser Zellsuspension wird in ein neues Kulturgefäß mit vorgelegtem, warmen Medium überführt. Bei einer 1:5-Verdünnung erreichen die Zellen nach 2-3 Tagen wieder das Konfluenzstadium.

Nicht-adhärenente Zellen wie z.B. Makrophagen löst man durch Abschaben mit einer in der Bunsenbrennerflamme zu einem Spatel gebogenen Pasteurpipette vom Untergund des Kulturgefäßes ab.

10x PBS für Zellkultur:	80	g	NaCl
	2	g	KCl
	11,5	g	Na ₂ HPO ₄ (wasserfrei)
	2	g	K ₂ HPO ₄
			ad 1 l H ₂ O _{deion.}

Medium für alle verwendeten Zell-Linien (RPMI/FKS) :	10	%(v/v) hitze-inaktiviertes, fötales Kälberserum (FKS) in RPMI 1640 + L-Glutamin
Spezielles Medium für Hep-G2:	10	%(v/v) hitze-inaktiviertes, fötales Kälberserum (FKS)
	1x	MEM-nicht-essentielle Aminosäuren
	1	mM Natriumpyruvat
	2	mM L-Glutamin
	0,15	%(v/v) Natriumbicarbonat
		in 1x Minimal Essential Medium, pH 7,3, 0,2 μ

4.7.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Unter Zugabe eines Gefrierschutzmittels, wie zum Beispiel das in dieser Arbeit verwendete DMSO, können Eukaryontenzellen in flüssigem Stickstoff über einen Zeitraum von mehreren Jahren aufbewahrt werden. Um die zytotoxische Wirkung von DMSO so gering wie möglich zu halten, sollten die Zellen vor der Zugabe des Gefrierschutzmittels auf Eis gekühlt und nach dem Auftauen so schnell wie möglich verdünnt werden. Generell gilt: langsam einfrieren, schnell auftauen.

Zum Einfrieren werden die Zellen abzentrifugiert, auf eine Zelldichte von etwa $1-2 \times 10^6$ Zellen/ml in Einfriermedium eingestellt und auf Eis gestellt. Je 1 ml der gekühlten Suspension werden anschließend in beschriftete Kryoröhrchen aliquotiert, in Zellstoff eingewickelt und über Nacht bei -70°C eingefroren. Nach 12-24 Stunden überführt man die Kryoröhrchen in flüssigen Stickstoff.

Zum Auftauen der Zellen wird das Kryoröhrchen im 37°C -Wasserbad erwärmt. Anschließend gibt man die Zellsuspension in 10 ml vorbereitetes, kaltes RPMI und zentrifugiert die Zellen 10 min bei 400 g und 4°C ab. Der Überstand wird verworfen und das Zellpellet in vorgewärmtem Medium resuspendiert. Alternativ können frisch aufgetaute Zellen auch direkt in ein großes Volumen an vorgewärmtem Medium (10-20 ml) gegeben werden. Am Tag darauf jedoch muss dieses noch DMSO-haltige Medium durch frisches ersetzt werden.

Einfriermedium:	12	%(v/v) DMSO in RPMI/FKS
-----------------	----	-------------------------

4.7.3 Lebendzellzahlbestimmung mittels Trypanblau-Färbung

Zur Bestimmung der Lebendzellzahl mischt man 50 µl Zellsuspension mit 50 µl Trypanblau-Lösung. Ein Tropfen der Zellsuspension wird in eine Fuchs-Rosenthal-Zählkammer (Kammerfaktor: 5000) gegeben und lichtmikroskopisch ausgewertet. Dabei dringt der Farbstoff in tote Zellen schnell ein und färbt sie blau. Lebende Zellen dagegen nehmen den Farbstoff nur sehr langsam auf. Sie besitzen eine kugelige Gestalt und man kann sie auf Grund ihrer helleren und leuchtenden Erscheinung gut vom blauen Hintergrund unterscheiden. Zur Bestimmung der Lebendzellzahl wird die Anzahl der lebenden Zellen in drei Großquadraten gezählt, gemittelt und wie folgt berechnet:

$$\text{Lebendzellzahl/ ml} = \text{Lebende Zellen/Großquadrat} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{Kammerfaktor}$$

4.7.4 Herstellung von Bakterienaliquots für Infektionsversuche

Für die Herstellung von Bakterienaliquots sollte man die Listerien-Stämme auf BHI-Agarplatten frisch ausstreichen. Am nächsten Tag kann von einer Einzelkolonie ausgehend eine Übernachtskultur hergestellt werden. Diese wird 1:100 in BHI-Medium verdünnt und bei 37° C unter Schütteln inkubiert, bis die Kultur eine Dichte von 180 Klett-Einheiten (späte logarithmische Phase) erreicht hat. Von diesem Zeitpunkt an ist es wichtig, die Bakteriensuspension immer auf Eis zu halten, um eine weitere Vermehrung zu vermeiden. Je 10 ml der Kultur werden in sterile Greinerröhrchen überführt und 10 min abzentrifugiert (6000 g, 4° C). Die sedimentierten Bakterien wäscht man einmal mit 10 ml eiskaltem sterilem 1x PBS und resuspendiert sie anschließend in 10 ml steriler eiskalter 1x PBS-Lösung mit 20 % Glycerin. Diese Zellsuspension sollte dabei gründlich gemischt, aliquotiert und bei -80° C aufbewahrt werden.

Einen Tag vor Infektionsbeginn kann jeweils ein Aliquot aufgetaut und die Konzentration der Bakterien durch Ausplattieren geeigneter Verdünnungsstufen ermittelt werden.

4.7.5 Infektion verschiedener Zellen mit Listerien

Bei der Infektion von Zellen kann man Bakterien in einem definierten Verhältnis zur vorhandenen Zellzahl („multiplicity of infection“, MOI) auf einen Zellrasen geben. Bei nicht-professionellen Phagozyten führt dies zu einer induzierten Phagozytose der Bakterien durch die Zellen.

Professionelle Phagozyten haben gemäß ihrer natürlichen Funktion eine erhöhte Aufnahmeaktivität, was bei der Wahl der MOI beachtet werden muss. Nach einstündiger Infektion wird Gentamycin-haltiges Medium auf den Zellrasen gegeben, um alle extrazellulären Bakterien abzutöten. Das Gentamycin dringt dabei nicht in die Zelle ein, da Zellmembranen von Säugetierzellen relativ impermeabel für dieses Antibiotikum sind. Auf diese Weise wird die Infektion begrenzt und ungewollte Sekundärinfektionen vermieden. In Versuchsansätzen, in denen nur die Adhärenzfähigkeit der Bakterien an eine Zellart getestet werden soll, muss auf die Zugabe von Gentamycin-haltigem Medium verzichtet werden. Der Zeitpunkt der Zugabe der Bakterien zu den Zellen wird als Zeitpunkt 0 Stunden *p.i.* (*post infection*) definiert.

Die für eine Infektion eingefrorenen Bakterienaliquots werden aufgetaut und in Serum-freiem Medium auf die gewünschte Konzentration verdünnt. Da die MOI eine Mengenangabe und keine Konzentrationsangabe ist, werden bei einer Infektion in 24-Napf-Schalen (ca. 5×10^5 Zellen) die MOI an Bakterien in 0,5 ml Serum-freiem Medium auf die Zellen gegeben, während bei einer Infektion in 12-Napf-Schalen (ca. 1×10^6 Zellen) mit 1 ml Bakteriensuspension infiziert wird. Das heißt, bei einer MOI von z.B. 10 stellt man die Bakterien für eine Infektion in 12-Napf-Schalen auf eine Konzentration von 1×10^7 /ml ein und für eine Infektion in 24-Napf-Schalen auf eine Konzentration von 2×10^7 /ml (= 1×10^7 /0,5 ml). Die Bakterienkonzentration dieser sogenannten Infektionsmedien sollte aber immer parallel durch Ausplattieren von geeigneten Verdünnungen bestimmt werden.

Die Auswertung der Infektion kann z.B. durch das Ausplattieren einzelner Infektionsansätze erfolgen, wobei die Zellen gründlich aufgeschlossen werden müssen, ohne die Bakterien zu beeinträchtigen. Sehr bewährt hat sich dabei der Aufschluss von Zellen durch eine fünf-sekündige Ultraschallbehandlung mit einer Microspitze. Bei Ausplattierungsversuchen müssen alle Infektionen in Triplets angesetzt werden. Nach Bestimmung der Bakterienzahlen im Infektionsansatz und in den Infektionsmedien kann die absolute Infektionsrate des Stammes errechnet werden. Wurden verschiedene Stämme parallel eingesetzt, so kann man die relative Infektionsrate eines Stammes im Vergleich zum Referenz-Stamm kalkulieren, wobei die des Referenz-Stammes auf 100% gesetzt wird.

Ebenso können intrazelluläre Bakterien durch Markierung mit einem GFP-Expressionsplasmid, durch Giemsa-Färbung oder durch Immunfluoreszenz-Färbung unter dem Mikroskop ausgewertet werden.

absolute Infektionsrate (%): $\text{Anzahl der Bakterien im Infektionsansatz} / \text{Anzahl der Bakterien im Infektionsmedium} \times 100$

relative Infektionsrate (%): $\text{absolute Infektionsrate des Stammes xy} / \text{absolute Infektionsrate des Referenz-Stammes} \times 100$

4.7.5.1 Adhärenz-Test

Bei dieser Analyse wird die Adhärenzfähigkeit der Bakterien an die verwendeten Zellen getestet.

Einen Tag vor der Infektion sollte man die Zellen in 24-Napf- oder 12-Napf-Platten so aussäen, dass sie am Tag der Infektion einen konfluenten Rasen bilden. Lücken im Zellrasen sind bei diesem Test nachteilig, weil Listerien auch sehr gut am Kunststoffboden der Schalen adhären können und dadurch das Ergebnis verfälschen.

Kurz vor der Infektion werden die Bakterien aufgetaut und auf die gewünschte MOI in RPMI verdünnt. Nachdem die Zellen einmal mit 1 ml PBS($\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$) gewaschen wurden, werden die in RPMI verdünnten Bakterien (Infektionsmedium) auf den Zellrasen gegeben und für 30 min inkubiert. In diesem Zeitraum findet die erste Assoziation der Bakterien mit den Zellen statt. Nicht-adhärenente Bakterien entfernt man durch 5- bis 6-maliges Waschen mit je 1 ml PBS($\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$). Anschließend werden die Zellen nach Zugabe von 1 ml kaltem $\text{H}_2\text{O}_{\text{deion.}}$ mit Hilfe einer Ultraschallbehandlung lysiert und die Bakterienzahlen in den Nöpfen durch Ausplattieren geeigneter Verdünnungen bestimmt.

10x $\text{CaCl}_2/\text{MgCl}_2$ –Lösung:	1	g	$\text{MgCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$
	1	g	$\text{CaCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$
			ad 1 l $\text{H}_2\text{O}_{\text{deion.}}$
PBS($\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$):	1	VT	10x PBS für Zellkultur (siehe 4.7.1)
	1	VT	10x $\text{CaCl}_2/\text{MgCl}_2$ –Lösung
	8	VT	$\text{H}_2\text{O}_{\text{deion.}}$

4.7.5.2 Invasions-Test, „Gentamycin-survival assay“

Dieser Test kann neben Informationen über das Invasionsverhalten von Bakterien-Stämmen in Zellen auch Auskunft über die intrazelluläre Replikation von Bakterien geben.

Wie schon bei dem Adhärenz-Test beschrieben, verdünnt man zur Herstellung des Infektionsmediums die aufgetauten Bakterien in RPMI auf die gewünschte MOI. Die Zellen werden einmal mit 1 ml PBS($\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$) gewaschen und anschließend mit dem Infektionsmedium überschichtet. Nach einer einstündigen Inkubationszeit im Brutschrank (bzw. 1,5 Stunden bei Hep-G2 Zellen) müssen die Infektionsansätze zur Entfernung der freien Bakterien dreimal mit je 1 ml PBS($\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$) gewaschen werden. Zur ausschließlichen Erfassung von intrazellulären Bakterien werden die adhärenente Bakterien zusätzlich durch eine weitere einstündige Inkubation

mit RPMI/FKS + Gentamycin abgetötet. Die verwendete Gentamycin-Konzentration ist dabei ein wichtiger Faktor. Bei nicht-professionellen Phagozyten kann für eine Inkubationszeit von einer Stunde eine Konzentration von 100 µg/ml angewendet werden, bei Makrophagen jedoch muss diese Konzentration erniedrigt werden, da Gentamycin über Phagozytose in die Zellen gelangen und intrazelluläre Bakterien töten kann (Drevets *et al.*, 1994). Nach dieser Inkubation werden die Zellen noch dreimal mit PBS(Ca²⁺/Mg²⁺) gewaschen und letztendlich in 1 ml eiskaltem H₂O_{deion.} aufgenommen und mittels Ultraschall lysiert. Auf diese Weise kann die Anzahl der intrazellulären Bakterien pro Napf durch das Ausplattieren geeigneter Verdünnungen ermittelt werden.

Das intrazelluläre Replikationsverhalten von Bakterien dagegen wird anhand von parallel durchgeführten Infektionen mit unterschiedlich langen Inkubationszeiten von Gentamycin-haltigem Medium gemessen.

4.7.6 Transfektion von Zellen

Zur Übertragung von Plasmid-DNA in eukaryotische Zellen kann man sich neben verschiedener Infektionstechniken u.a. auch chemischer und physikalischer Transfektions-Methoden bedienen. Eine sehr einfache Technik ist die Transfektion mit kationischen Lipid-Reagenzien. Diese bilden in wässriger Lösung kleine (100-400 nm), von einer einfachen Membran umgebene Liposomen, deren Oberfläche positiv geladen ist. Diese Liposomen können mit negativ geladenen DNA-Molekülen Komplexe formen, wobei die DNA nicht innerhalb der Liposomen eingeschlossen wird, sondern eher von Liposomen umgeben ist. Diese Komplexe können u.a. Plasmid-DNA über die Membran von eukaryotischen Zellen in das Zytosol einschleusen.

In dieser Arbeit wurde das LipofectAMINE PLUS Reagent der Fa. Invitrogen (Gibco) nach dem „LipofectAMINE PLUS Reagent Transfection Protocol“ verwendet: Einen Tag vor der Transfektion werden die Zellen so ausgesät, dass sie am folgenden Tag zu 70-90% konfluent sind. Bei der Verwendung einer 24-Napf-Platte empfiehlt der Hersteller die Verdünnung von 0,4 µg reiner Plasmid-DNA in 21 µl Serum-freien Transfektionsmedium und 4 µl PLUS-Reagent. In einem zweiten Gefäß wird 1 µl LipofectAMINE Reagent mit 24 µl Serum-freien Transfektionsmedium gemischt. Hat man beide Ansätze getrennt für 15 min bei RT inkubiert, so werden sie zusammengegeben und weitere 15 min bei RT inkubiert. Zwischenzeitlich muss der Kulturüberstand der zu transfizierenden Zellen abgenommen und durch 0,2 ml Serum-freies Transfektionsmedium ersetzt werden. Die DNA-Komplex-Mischung wird nun vorsichtig zugegeben und mit dem vorliegenden Medium vermischt. Nach einer Inkubationszeit von 3 Stunden im Brutschrank kann das Transfektionsmedium durch neues RPMI/FKS ersetzt werden.

4.7.7 Färbung von Zellen nach Giemsa

Die Giemsa-Färbung wurde ursprünglich als Differentialfärbung methanolfixierter Blut- und Knochenmark-Ausstriche verwendet. Dabei werden die Zellen mit einer Azur-Eosin-Methylenblau-Lösung gefärbt. Als Resultat dieser Färbung erscheinen Zellkerne rotviolett, eosinophile Granula rötlichbraun, basophile blau, neutrophile rotviolett; Zytoplasma von Lymphozyten blau, Erythrozyten blaßrot, Blutplättchen blau mit violetter Innenkörper; Kerne von Parasiten u. Protozoen leuchtend rot.

Listerien erscheinen nach einer Giemsa-Färbung im Lichtmikroskop als dunkel-violette Stäbchen, wobei eine intrazelluläre Lokalisation der Bakterien nur bedingt möglich ist.

Infizierte Zellen, welche man auf der Oberfläche von Deckgläsern kultiviert hat, werden mit PBS gewaschen und anschließend für 5 min mit Methanol bei RT fixiert. Nach der Trocknung des Präparates erfolgt eine 20-minütige Färbung in verdünnter Giemsa-Lösung (1:20 mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{deion.}}$ verdünnt), welche am besten durch das Abspülen mit einem leicht alkalischen Puffer (pH 7,2) oder mit leicht alkalischem $\text{H}_2\text{O}_{\text{deion.}}$ differenziert werden kann. Nach dem Trocknen des Präparates kann es im Lichtmikroskop ausgewertet werden.

4.7.8 Durchflusszytometrie von EGFP-exprimierenden Zellen

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie kann der Gentransfer eines EGFP-Expressionsplasmides von einem Listerien-Stamm in das Zytosol einer Wirtszelle quantitativ ausgewertet werden.

Die Infektion der Zellen erfolgt in 24-Napf-Platten analog der in Kapitel 4.7.5 beschriebenen Vorgehensweise mit folgenden Abweichungen: Nach der Infektion mit dem Bakterien-Stamm werden die Zellen dreimal mit 1 ml $\text{PBS}(\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+})$ gewaschen und anschließend für eine Stunde mit 2 ml RPMI/FKS + 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Gentamycin inkubiert. Darauf entfernt man dieses Medium wieder von den Zellen und ersetzt es durch 2 ml RPMI/FKS + 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Gentamycin. Nach 24 oder 48 Stunden werden die Zellen ausgewertet; dabei ist es ratsam, die Zellen vor der Messung mit dem Durchflusszytometer zuerst unter dem Fluoreszenzmikroskop zu betrachten. Anschließend werden die Näpfe mit 2 ml 1x PBS gewaschen. Makrophagen können für die Messung mit einem Spatel abgeschabt werden, während adhärenente Zellen trypsinisiert werden müssen. Dazu wird das PBS vorsichtig abgezogen und 100 μl Trypsin-Lösung wird auf die Zellen unter Schwenken der Zellkulturplatte gegeben. Nach einer 15-minütigen Inkubation im Brutschrank können die Zellen zügig mit 500 μl PBS vom Boden der Schale abgelöst, resuspendiert und in speziell für das Durchflusszytometer geeignete Kunststoff-Röhrchen überführt werden. Diese werden auf Eis gestellt. Zur Bestimmung der Lebendzellzahlen kann zehn Minuten vor der Messung noch 2 μl 7-

Actinomycin D-Lösung (1 mg/ml in DMSO) zu der Zellsuspension pipettiert werden. 7-Actinomycin D (7-AAD) ist ein Fluoreszenzfarbstoff zum Anfärben von DNA, welcher ähnlich wie Propidiumiodid nicht über intakte Zellmembranen diffundieren kann. Tote Zellen dagegen nehmen den Farbstoff auf und erscheinen im dritten Fluoreszenzkanal des Durchflusszytometers.

Bei der Messung von EGFP-exprimierenden Zellen muss darauf geachtet werden, dass die Gesamt-Anzahl der gemessenen Zellen pro Probe (n) einen Einfluss darauf hat, ob die in einer Probe gemessene Häufigkeit einer Subpopulation (f) signifikant ($p < 0,05$) ist (Parks *et al.*, 1989). In Tabelle 4.2 sind die Unterschiede (Q) angegeben, die zwei Subpopulationen zueinander haben müssen, um bei einer gegebenen Häufigkeit in einer Gesamtpopulation (f) und einer Messprobengröße (n) signifikant zu sein.

Häufigkeit der Subpopulation (f)	Anzahl der gemessenen Zellen pro Probe (n)						
	1.000	2.000	5.000	10.000	20.000	50.000	100.000
50%	(Q) 4,40%	3,11%	1,97%	1,39%	0,98%	0,62%	0,44%
30%	4,04%	2,85%	1,80%	1,27%	0,90%	0,57%	0,40%
20%	3,52%	2,49%	1,57%	1,11%	0,79%	0,49%	0,35%
10%	2,64%	1,86%	1,18%	0,83%	0,59%	0,37%	0,26%
5%	1,92%	1,36%	0,86%	0,61%	0,43%	0,29%	0,19%
1%	0,87%	0,62%	0,39%	0,27%	0,19%	0,12%	0,08%

Tabelle 4.2: Einfluss der Messprobengröße auf die Signifikanz zweier Messungen (Parks *et al.*, 1989).

4.8 In vivo- und Immunologische Arbeiten

4.8.1 Infektion von Mäusen mit *Listeria*-Stämmen

Im Rahmen des Modells der experimentellen murinen Listeriose können BALB/c Mäuse sowohl orogastrisch als auch intravenös mit Listerien infiziert werden. Bei Verwendung von *Listeria* als DNA-Vakzine-Träger wurden BALB/c Mäuse lediglich orogastrisch infiziert.

Orogastrische (p.o.) Applikation: Diese Art von Applikation kommt der natürlichen Route einer *Listeria* Infektion am nächsten, lässt sich aber auf Grund des unterschiedlichen Invasionsverhaltens (Lecuit *et al.*, 1999) kaum mit einer *Listeria*-Infektion des Menschen über den Magen-Darm-Trakt vergleichen. Da das murine Listeriose-Modell eine Infektion mit einer sublethalen Dosis an Bakterien vorsieht, können einer BALB/c Maus nur ca. 10^9 Bakterien eines *Listeria*-Wildtyps ohne lethalen Ausgang orogastrisch verabreicht werden. Die Bakterien werden daher in BHI-Medium kultiviert, einmal mit PBS gewaschen und durch Resuspension in 1/10 des Ausgangsvolumens an PBS auf eine Zellzahl von ca. 1×10^{10} Bakterien /ml ankonzentriert. Durch die Verwendung einer

Magensonde stellt man sicher, dass alle applizierten Bakterien im Darm landen und nicht mehr ausgespuckt werden; außerdem besitzen Nagetiere keinen Brechreflex. Die Magensonde wird mit Hilfe einer Einmal-Kanüle von 0,9 mm Ø hergestellt, welcher die Spitze 2 cm unterhalb der Kegelhülse sauber abgebrochen wird. Auf die Bruchstelle wird mit ca. 1 cm Überschneidung ein insgesamt 3 cm langer, flexibler Plasikschauch geschoben. Einige Stunden vor Applikation wird den Tieren das Futter entzogen. Hat man die Bakteriensuspension mit einer Einmal-Tuberkulinspritze luftblasenfrei in die Sonde aufgezogen, kann die Maus mit der Hand fixiert werden. Die Sonde wird dann rasch unter sehr vorsichtigem Drehen in den Schlund eingeführt und 100 µl der Bakteriensuspension werden appliziert. Danach setzt man das Tier für eine Weile auf ein saugfähiges Stück Papier: Sollten Teile der Suspension nicht im Magen angekommen sein, so finden sich ausgespuckten Suspensionsreste auf dem Papier wieder.

Intravenöse (i.v.) Applikation: Die sublethale Dosis bei einer i.v.-Applikation von wildtypischen Listerien beträgt 5×10^3 Bakterien / BALB/c Maus, die LD₅₀ dagegen liegt bei 10^4 Bakterien / C57BL/6 Maus (Engelbrecht *et al.*, 1996). Daher müssen die Bakterien bei dieser Applikationsart möglichst genau auf eine Konzentration von 5×10^4 Bakterien /ml in PBS (möglichst pyrogenfrei) eingestellt werden. Die Listerien werden in BHI-Medium kultiviert, einmal mit PBS gewaschen, in gleichem Volumen an PBS mit 20% (v/v) Glycerin resuspendiert und bei -80°C in Aliquots weggefroren. Durch Auftauen und Ausplattieren der (-6)-Verdünnung am Tag vor der Applikation lässt sich sehr genau die Menge an lebenden Bakterien in der eingefrorenen Suspension bestimmen. Mit einer Einmal-Tuberkulinspritze und einer 0,4 mm Einmal-Kanüle werden 100 µl der eingestellten Bakteriensuspension langsam in eine seitliche Schwanzvene eines fixierten Tieres gegeben. Zuvor kann zur Darstellung der Venen der Schwanz des Tieres für eine Weile in warmes Wasser getaucht werden.

Nach erfolgreicher Applikation werden die Tiere täglich beobachtet. Sollte ein Tier wider Erwarten ernsthaft erkranken und leiden, so muss es sofort artgerecht und schmerzlos getötet werden.

4.8.2 Präparation von Listerien aus Milz und Leber

Als Parameter des Modells der experimentellen murinen Listeriose wird die Anzahl der Bakterien in den befallenen Organen Milz und Leber zu verschiedenen Zeiten nach der Infektion einer Maus bestimmt. Nachdem die Mäuse in Gruppen von fünf Tieren mit einer sublethalen Dosis an Bakterien infiziert worden sind, werden die Tiere zu einem bestimmten Zeitpunkt nach der Infektion durch zervikale Dislokation oder Einatmung von CO₂ getötet. Milz und Leber werden steril entnommen und in ein 15ml-Röhrchen, welches jeweils 5 ml steriles H₂O_{deion.} enthält, überführt. Anschließend stelle man das Röhrchen für ca. eine Stunde auf Eis, dadurch erreicht man ein leichteres Homogenisieren der Organe. Die Leber wird zusammen mit dem H₂O_{deion.} in einen 15

ml-Glashomogenisator dekantiert, darin gründlich homogenisiert und wieder in das ursprüngliche Röhrchen zurückdekantiert. Mit der Milz wird genauso verfahren, nur eignet sich für dieses Organ eher ein 5 ml-Glashomogenisator. Mittels Ultraschall-Behandlung lassen sich die nun einzelnen Zellen der Organe noch weiter aufschließen. Zuletzt werden die Bakterien in Verdünnungsreihen auf BHI-Agarplatten oder *Listeria*-Selektionsplatten zur Bestimmung der Bakterienzahl pro Organ ausplattiert. Auf Grund von Geweberesten empfiehlt es sich, zum Pipettieren der konzentrierten Suspension abgeschnittene Pipettenspitzen zu verwenden.

4.8.3 Immunisierung von Mäusen mit Antigen

Bei der Verwendung von einem Protein-Antigen zur Immunisierung von Mäusen ist die Anwendung eines Adjuvans zur Steigerung der spezifischen Immunantwort empfehlenswert.

Montanide ISA 206 ist ein sog. „Wasser-in-Öl-in-Wasser-Doppelemulsions“-Adjuvans, welches der Antigen-Lösung im Verhältnis 1+1 zugemischt wird. Dabei rührt man das Adjuvans bei 30°C mit einem Magnetrührer und gibt die Antigen-Lösung tropfenweise hinzu. Nach einer weiteren Rührzeit von 0,5-1 Stunde wird die Mischung mit einer Einmal-Tuberkulinspritze und einer Einmal-Kanüle von 0,6 mm Ø einer Maus intraperitoneal injiziert. Insgesamt sollten 50 µl Antigen in einer 100 µl-Applikation verabreicht werden.

In dem „ImmunEasyTM Mouse Adjuvant“ der Fa. QIAGEN bewirkt immunstimulatorische CpG DNA eine Förderung der B-Zell-Antwort auf ein Proteinantigen (Krieg *et al.*, 1995). Dieses Adjuvans scheint so effektiv zu sein, dass die 2- bis 3-malige Applikation von nur 2 µg Antigen zu einer hohen Stimulation der spezifischen B-Zellen führt. Dabei werden pro Tier 2 µg Antigen mit 20 µl Adjuvans-Lösung und PBS auf 100 µl Gesamtvolumen verdünnt. Einer Maus appliziert man mit einer kleinen Kanüle (0,4 mm Ø) jeweils 50 µl Mischung intramuskulär in einen Gesäßmuskel. Auf Grund des Totvolumens der Tuberkulinspritze muss immer etwas mehr Antigen-Adjuvans-Mischung angesetzt werden. Laut Hersteller wird eine „Boost“-Immunisierung 2-4 Wochen nach der ersten Applikation empfohlen.

4.8.4 Blutentnahme bei der Maus

Zur Gewinnung von Antiserum aus einer Maus muss diese maximal entblutet werden, wozu sich die Blutentnahme aus dem Herzen besonders gut eignet. Das Tier sollte dabei durch CO₂ und nicht mit zervikaler Dislokation getötet werden, damit die Gefäße im Brustraum nicht vorzeitig zerreißen. Anschließend wird das Herz sehr zügig freipräpariert. Mit einer Tuberkulinspritze und

einer langen Kanüle (0,9 mm Ø) sticht man vorsichtig in den rechten Vorhof und lässt das Blut ganz langsam durch vorsichtiges Ziehen des Stempels in die Spritze laufen. Daraufhin sammelt man das Blut in einem Mictotainer™, indem sich ein spezielles Harz befindet. Nachdem das Blut geronnen ist (20-30 min bei RT), wird es für ca. 2 min und 10000 g abzentrifugiert. Anschließend befindet sich der Blutkuchen unter und das Serum über dem Harz, so dass das Serum verlustfrei abpipettiert werden kann.

Kleinere Mengen an Blut können einer lebenden Maus auch durch leichtes Kupieren der Schwanzspitze entnommen werden.

4.8.5 Präparation und Stimulation von Milzzellen

Milzzellen, welche für Proliferationsteste oder IFN γ –ELISAs verwendet werden sollen, müssen Endotoxin-frei präpariert werden. Daher sollte für alle selbst-angesetzten Lösungen nur pyrogenfreies H₂O wie Ampuwa-H₂O der Fa. Fresenius verwendet werden.

Einer Maus wird die Milz nach zervikaler Dislokation steril entnommen und in einen Einmal-Zellsieb (70 μ m Maschen) überführt, welcher sich in einer Schale mit BSS/BSA befindet. Mit einem Stempel aus einer 10 ml-Einmalspritze reibt man die Milz durch das Sieb, wobei darauf zu achten ist, dass die Zellen nicht trocken werden. Nach der Resuspension werden alle in ein 50 ml-Greiner-Gefäß überführt, auf 50 ml mit BSS/BSA aufgefüllt und für 10 min auf Eis gestellt. In dieser Zeit sinken eventuell vorhandene Gewebereste ab. Anschließend kann man die überstehende Zellsuspension in ein neues 50 ml-Gefäß pipettieren und die Zellen darin abzentrifugieren (10min bei 400 g und 4°C). Nach einem weiteren Waschschrift mit 50 ml BSS/BSA müssen die Erythrozyten der Zellsuspension lysiert werden. Dazu wird das BSS/BSA vom Zellpellet abgesaugt und die Zellen mit 5 ml TAC-Lösung resuspendiert. Nach einer genau 10-minütigen Inkubationszeit bei RT füllt man das Gefäß auf 50 ml mit BSS/BSA auf, um die Lysis zu stoppen, zentrifugiert die Zellen ab und wäscht nochmals mit 50 ml BSS/BSA. Zur Bestimmung der Zellzahl wird ein kleiner Teil dieser Suspension 1+1 mit Trypanblau-Lösung verdünnt und in einer Zählkammer gezählt. Anschließend nimmt man die Zellen zur Einstellung der Konzentration in einem definierten Volumen RPMI + „Goodies“ auf und pipettiert je 100 μ l in die Vertiefungen einer 96-Napf-Platten (U-Form) mit vorgelegten Stimulantien.

10x BSS 1:	10	g/l	D-Glukose
	0,6	g/l	KH ₂ PO ₄
	1,83	g/l	Na ₂ HPO ₄ (wasserfrei)
	0,1	g/l	Phenolrot
			in Ampuwa-H ₂ O; pH 7,4; 0,2 μ

10x BSS 2:	1,86	g/l	CaCl ₂ x 2 H ₂ O	
	4	g/l	KCl	
	80	g/l	NaCl	
	2	g/l	MgCl ₂ x 6 H ₂ O	
	2	g/l	MgSO ₄ x 7 H ₂ O in Ampuwa-H ₂ O; 0,2 µ	
BSA-Stocklösung:	10	%(w/v)	BSA in Ampuwa-H ₂ O, 0,2 µ	
BSS/BSA:	1	VT	10x BSS 1	
	1	VT	10x BSS 2	
	8	VT	Ampuwa-H ₂ O	
	0,01	VT	BSA-Stocklösung	
TAC-Lösung:	20	mM	Tris-HCl, pH 7,2	
	0,83	%(w/v)	Ammoniumchlorid, 0,2 µ	
RPMI + „Goodies“:	10	%(v/v)	FKS	
	0,025	%(v/v)	β-Mercaptoethanol	
	0,05	%(v/v)	L-Glutamin	
	1	mM	Nartiumpyruvat	
	je	200	U/ml	Penicillin/ Streptomycin
		1x		MEM-nicht-essentielle Aminosäuren in RPMI 1640, 0,2 µ

4.8.6 Isolation von Dendritischen Zellen mit Hilfe eines Metrizamid-Gradienten

Zur Isolierung von Dendritischen Zellen aus der Milz oder aus Lymphknoten und Peyer'schen Platten (Macatonia *et al.*, 1987) werden die Organe analog der in Kapitel 4.8.5 beschriebenen Vorgehensweise präpariert und gewaschen. Eine Erythrozytenlyse ist bei diesem Protokoll jedoch nicht notwendig.

Zur Herstellung des Gradienten werden 14,5 g Metrizamid mit 100 ml Gradientenmedium gemischt und für 15-30 min inkubiert. Anschließend kann der Gradient sterilfiltriert (0,2 µ) und als 2 ml- Aliquots in 15 ml Falcon Röhren bei -20°C gelagert werden.

Die Zellen einer Milz bzw. aller Lymphknoten oder aller Peyer'schen Platten werden in 8 ml Gradientenmedium aufgenommen und in eine 25 cm² Kulturflasche überführt. Nach Kultivierung dieser Suspension über Nacht im Brutschrank sind die Makophagen in der Präparation adhärent geworden, während die Dendritischen Zellen nicht oder nur leicht adhärent sind. Daher werden einen Tag später die nicht adhärenen Zellen resuspendiert und ebenfalls die leicht adhärenen Zellen vorsichtig mit der Pipette abgespült. Mit der so gewonnenen Suspension überschichtet man vorsichtig ein auf RT erwärmtes 2 ml Gradientenbett, dieses wird für 10 min ohne Einschalten der Zentrifugenbremse bei 600 g und RT abzentrifugiert. Nach dieser Zentrifugation befinden sich die Dendritischen Zellen in der Interphase. Sie werden abgesaugt und zum Waschen in einem großen Volumen an frischem Gradientenmedium resuspendiert. Nach einer weiteren Zentrifugation bei 400 g können die Zellen in einem kleineren Volumen an Medium aufgenommen und zur Auswertung in frische Kulturschalen gegeben werden.

Gradientenmedium:	10	%(v/v)	FKS
	0,025	%(v/v)	β-Mercaptoethanol
	0,05	%(v/v)	L-Glutamin
je	200	U/ml	Penicillin/ Streptomycin in „Dutch modified RPMI“

4.8.7 Proliferationstest

Mit dem Proliferationstest kann man untersuchen, ob sich T-Zellen einer Präparation nach der Zugabe eines Antigens (in Form eines löslichen Peptides) spezifisch vermehren. Da ein Antigen von einer T-Zelle nur in Form eines MHC:Peptid-Komplexes erkannt werden kann, braucht man zusätzlich Antigen-präsentierende Zellen in diesem Test.

Das Antigen wird mit RPMI + „Goodies“ (siehe 4.7.5) auf die doppelte Endkonzentration verdünnt, und je 100 µl dieser Lösung wird in drei Näpfe einer 96-Napf-Platte mit rundem Boden pipettiert. Ebenso muss 100 µl des Mediums als Negativkontrolle und 100 µl Concanavalin A (Endkonzentration: 5 µg/ml) als Positivkontrolle in Dreifachansätzen vorgelegt werden. Nach der Präparation der Milzzellen und Einstellung der Zellzahlen auf $2-4 \times 10^6$ Zellen /ml gibt man jeweils 100 µl dieser Suspension zu den vorgelegten Lösungen hinzu. Je nach Antigen proliferieren die Zellen unterschiedlich schnell, daher muss man vorher die beste Proliferationszeit in einem Vorversuch austesten. Im Fall des in dieser Arbeit verwendeten Antigens KMP-11 wurden fünf Tage nach der Stimulation 25 µl radioaktiv-markiertes ³H-Thymidin (0,5 µCi / Napf) sowohl zu den Nöpfen mit Antigen als auch zu den Nöpfen mit Medium zugegeben. Die mit Concanavalin A stimulierten Näpfe (und zusätzliche Mediumkontrollen) wurden dagegen schon am dritten Tag

nach der Stimulation radioaktiv markiert. 18 Stunden nach der ^3H -Thymidin-Zugabe können alle Platten bei -20°C bis zur Messung eingefroren werden.

Mit einem „Zell-Harvester“ werden die 96-Napf-Platten nach dem Auftauen geerntet, dabei wird die Zell-DNA jedes Napfes auf einen speziellen Filter transferiert. Je mehr Zellen in der Zeit nach der ^3H -Thymidin-Zugabe proliferiert haben, desto mehr radioaktives ^3H -Thymidin wird in die DNA eingebaut. Nach dem Trocknen dieser Filter werden sie in eine Folie mit Szintillationslösung eingeschweißt und in einem „beta-counter“ gemessen. Zur Auswertung bestimmt man die Mittelwerte der gemessenen „Counts per minute“ (Cpm) und errechnet den Quotienten aus dem Mittelwert der stimulierten Nöpfe und dem Mittelwert der Medium-Nöpfe (Stimulations-Index, SI). Dabei wird ein Stimulationsindex größer 2 als eine positive spezifische Proliferation gewertet.

^3H -Thymidin-Lösung: 20 $\mu\text{Ci/ml}$ ^3H -Thymidin in RPMI (ohne FKS)

4.8.8 IFN- γ und IL-2 ELISA

Interleukin-2 (IL-2) als auch Interferon- γ (IFN- γ) eignen sich beide als Marker zur Detektion einer spezifischen Immunantwort. Beide Zytokine werden von T-Zellen produziert, wobei IL-2 von $\text{T}_\text{H}0$ -, $\text{T}_\text{H}1$ - und einigen zytotoxischen T-Zellen (CTL) gebildet werden kann. IFN- γ wird ebenfalls von $\text{T}_\text{H}1$ - und zytotoxischen T-Zellen, aber auch von NK-Zellen produziert.

24 Stunden nach der Stimulation der Milzzellen (siehe 4.8.5) werden die 96-Napf-Platten eingefroren und kurz vor der Durchführung des ELISA wieder aufgetaut. Zur Bestimmung der Konzentration von IL-2 und IFN- γ in den Zellkulturüberständen eignet sich das „BD OptEIA™ Mouse IL-2 bzw. IFN- γ Set“. Da diese Sets sehr sensitiv arbeiten (IL-2 bis 3,1 pg/ml; IFN- γ bis 31,1 pg/ml), sollte man sich exakt an die vom Hersteller vorgeschlagene Messprozedur halten: Maxisorb-Platten werden am Tag vor dem Test mit 100 μl „Capture Antibody“ in „Coating buffer“ beschichtet und über Nacht bei 4°C inkubiert. Nachdem die Platten mit Waschpuffer gewaschen wurden, müssen die Nöpfe mit 200 μl „Pharmingen’s Assay Diluent“ für eine Stunde geblockt werden.

Aus dem in den Sets befindlichen Standards werden Verdünnungsreihen hergestellt; ebenso müssen die Überstände der Nöpfe, welche mit Concavalin A stimuliert worden sind, mindestens 1:10 mit „Pharmingen’s Assay Diluent“ verdünnt werden. 100 μl dieser Proben werden nun auf die Platten pipettiert und 2 Stunden bei RT inkubiert. Nach weiteren Waschschrritten gibt man 100 μl der „Working detector“ Lösung für eine Stunde in die Nöpfe. In dieser Lösung befindet sich ein frisch hergestellter Komplex aus einem biotinyliertem „Detection Antibody“ und einem Avidin-Peroxidase-Konjugat. Anschließend muss - je nach Set - besonders oft und gründlich gewaschen werden. Zuletzt wird eine Substrat-Mischung in den Nöpfen inkubiert. Diese besteht aus zwei

Lösungen aus dem „TMB Substrate Reagent Set“, wobei in der einen Tetramethylbenzidine (TMB) und in der anderen H_2O_2 enthalten ist. 1 VT Lösung 1 wird mit 1 VT der Lösung 2 gemischt und von der Mischung werden 100 μl auf die Platten aufgetragen. Die blaue Farbreaktion erfolgt im Dunkeln und muss nach 30 min mit 50 μl 2 N H_2SO_4 gestoppt werden. Die Auswertung erfolgt dann durch die Messung der OD_{450} minus OD_{570} , wobei die Zytokin-Konzentration der Proben mit Hilfe der doppelt-logarithmisch aufgetragenen Standardkurve kalkuliert werden können.

„Coating buffer“:	0,1	M	NaHCO_3
	0,1	M	Na_2CO_3 , pH 9,5
Waschpuffer:	0,05	%(v/v)	Tween 20 in 1x PBS

4.8.9 anti-p60 und anti-KMP-11 ELISA

Mit der hier beschriebenen Prozedur des „enzyme linked immuno sorbent assays“ (ELISA) kann die Anwesenheit eines spezifischen Antikörpers qualitativ und quantitativ in Antikörper-lösungen oder Antiseren sehr sensitiv gemessen werden. Die hier beschriebene Prozedur ist an die der in 4.8.8. beschriebenen Zytokin-ELISAs angelehnt.

Maxisorb-Platten werden einen Tag vorher mit 100 μl gereinigtem KMP-11 oder p60 beschichtet. Dabei hat sich bei beiden Antigenen eine Konzentration von 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Protein in „Coating buffer“ bewährt. Bei diesem und bei allen weiteren Inkubationsschritten müssen die Platten mit Folie abgedeckt werden. Nachdem das Protein über Nacht bei 4°C an den Kunststoff der Platten adsorbiert ist, werden diese dreimal mit Waschpuffer gewaschen und trockengeklopft. Danach werden 200 μl einer Blocklösung in die Platten gegeben, und nach einer Stunde Inkubationszeit können die Platte wie vorher beschrieben gewaschen werden. Nun gibt man 100 μl der zu untersuchenden Antiseren in einer Titrationsreihe (in Blocklösung verdünnt) auf die Platten, inkubiert 2 Stunden bei RT und wäscht wie beschrieben. Ein Peroxidase-gekoppelter Ziege-anti-Maus-IgG-Zweitantikörper (Fa. Dianova) wird 1:20000 in Blocklösung verdünnt und 100 μl der Verdünnung werden in die Platten pipettiert. Nach einer Stunde Inkubationszeit folgt der letzte Waschschritt. Durch die Zugabe eines Chromogens können die Antigen-spezifischen Antikörper sichtbar gemacht werden. Dazu wird ebenfalls das „TMB Substrate Reagent Set“ der Fa. BD Pharmingen (siehe 4.8.8) verwendet. Die Inkubation richtet sich hier nach der Färbung und sollte vor dem Erreichen einer OD_{450} von 1,5-2,0 mit 2 N H_2SO_4 gestoppt werden. Gemessen wird die OD_{450} minus OD_{570} .

Beschichtungspuffer:	0,1	M	NaHCO_3
	0,1	M	Na_2CO_3 , pH 9,5

Blocklösung:	1	VT	FKS
	1	VT	10x PBS (siehe 4.3.4)
	8	VT	H ₂ O _{deion.}
Waschpuffer:	0,05	%(v/v)	Tween 20 in 1x PBS

4.9 Spezielle Methoden

4.9.1 Immunfluoreszenz Analyse von intrazellulären Listerien (Kuhn *et al.*, 1990)

Zur Anfärbung von intrazellulären Bakterien müssen die Wirtszellen vor der Infektion auf runden Deckgläsern kultiviert werden. Die Zellen werden analog der in Kapitel 4.7.5.2. beschriebenen Vorhewungsweise infiziert, gewaschen und bis zum Ende des Versuchs in Gentamycin-haltigem RPMI/FKS inkubiert. Nachdem die infizierten Zellen zweimal mit PBS(Ca²⁺/Mg²⁺) und einmal mit PHEM gewaschen worden sind, permeabilisiert man die Zellen durch eine genau einminütige Zugabe von Triton/PHEM. Zur Fixierung der Zellen werden die Deckgläser in eine Glasschale überführt und für 3 min in kaltem Aceton bei -20°C inkubiert. Anschließend müssen die Präparate luftgetrocknet werden.

Zur Immunfärbung wird ein Tropfen des verdünnten primären Antikörpers auf ein Stück Parafilm gegeben und das Deckglas für eine Stunde mit der Zell-beschichteten Seite nach unten darauf gelegt. Zum Waschen des Präparates eignet sich ein mit PBS gefülltes Becherglas, in dem das Deckglas einige Male vorsichtig geschwenkt wird. Nachdem man mit einem Streifen Blotting Papier das restliche PBS vom Präparat entfernt hat, wird das Präparat für 45 - 60 min auf einen Tropfen des mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelten Zweitantikörpers gelegt. Nach einem weiteren Waschschrift kann zur Visualisierung des zellulären Aktins eine Phalloidin-Färbung angeschlossen werden. Als besonders effizient hat sich eine 20-minütige Färbung der Präparates mit 1:50 verdünntem Phalloidin-TRITC herausgestellt. Dann muss das Präparat nochmals gewaschen werden. Zur Einbettung wird das Deckglas vorsichtig von überschüssigem PBS befreit und luftblasenfrei auf einen Objektträger mit ca. 5 µl Einbettmedium (Vectashield®, Fa. Vector Labs) aufgelegt. Dieses Einbettmedium ist speziell für die Fluoreszenzmikroskopie geeignet. Nach dem Entfernen der überschüssigen Flüssigkeit wird der Rand des Deckglases mit einem durchsichtigen Nagellack versiegelt. Es empfiehlt sich ein sofortiges Mikroskopieren und Fotografieren der Präparate, da nach ca. 1 bis 2 Tagen das Aktin-Netzwerk der Zellen degradiert. Alle Inkubationsschritte der Immunfärbung sollten in einer verschlossenen feuchten Kammer durchgeführt werden.

PHEM:	10	mM	EGTA
	1	mM	MgCl ₂
	60	mM	PIPES
	23	mM	HEPES
Triton/PHEM:	0,25	%(v/v)	Triton X-100 in PHEM

4.9.2 Immunfluoreszenz-Analyse von extrazellulären Listerien

Listerien sollten für eine Immunfärbung möglichst in einer vitalen Wachstumsphase verwendet werden. Daher werden die Bakterien bis ca. 180 KE in BHI-Medium kultiviert, zweimal mit PBS gewaschen und in PBS aufgenommen, wobei man die Bakterien auf die 10fache Zellzahl ankonzentrieren sollte. Runde Deckgläser werden mit einer Polylysin-Lösung für ca. 15 min beschichtet, anschließend zieht man die Lösung ab und trocknet die Deckgläser.

Zur Adsorption der Bakterien kann man die ankonzentrierte Bakteriensuspension auf ein Stück Parafilm auftropfen, worauf für 10 min ein Deckglas gelegt wird. Anschließend muss dieses zur Fixierung der Bakterien für 30 min auf einen Tropfen mit einer frisch hergestellten Paraformaldehyd-Lösung überführt werden. Nachdem das Präparat durch mehrmaliges kurzes Eintauchen in PBS gewaschen wurde, folgt ein 15-minütiger Inkubationsschritt auf einem Tropfen mit 10 mM Glyzin, wobei das restliche Paraformaldehyd gequenchet wird. Nach einem weiteren Waschschrift kann das Präparat für eine Stunde auf einen Tropfen mit dem verdünnten primären Antikörper aufgelegt werden. Die Inkubation mit einem sekundären Antikörper erfolgt anschließend nach der gleichen Vorgehensweise.

Zur Visualisierung der Nukleotide kann das Präparat zusätzlich für 10 min mit einer 1 mM DAPI-Lösung inkubiert werden. Die Einbettung der Bakterien erfolgt mit einer Mischung aus 1 VT Vectashield® Einbettmedium und 1 VT erwärmter „low-melting“ Agarose (1 %ig).

Polylysin-Lösung:	0,1	mg/ml	Poly-L-Lysin in 1x PBS
Paraformaldehyd-Lösung:	4	%(w/v)	Paraformaldehyd
	30	mM	Na ₃ PO ₄ in H ₂ O _{deion.} , erhitzen (<100°C)

4.9.3 Kettenzerfallstest (nach Kuhn und Goebel, 1989)

Nach der Abzentrifugation einer *L. monocytogenes* Übernachtskultur wird dem gekühlten Überstand langsam 50% gemörstertes Ammoniumsulfat zugesetzt. Anschließend fällt man die Proteine eine Stunde lang unter Rühren auf Eis aus. Nach einer weiteren Abzentrifugation wird das erhaltene Pellet in 1/100 VT kaltem PBS resuspendiert und zweimal für zwei Stunden gegen kaltes H₂O_{deion.} sowie für zwei Stunden gegen kaltes PBS dialysiert. Nach einer Sterilfiltration kann das Konzentrat für einen mittelfristigen Zeitraum bei 4°C gelagert werden.

10 µl einer Bakterienkultur in der exponentiellen Phase werden mit 10 µl Konzentrat oder 10 µl PBS als Kontrolle versetzt und für 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Kettenlänge der Bakterien kann anschließend mittels Phasenkontrastmikroskopie beurteilt werden. Durch die Zugabe einer geringen Menge an Ethidiumbromidlösung können Einzelzellen in Bakterienketten besonders gut unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden.

50% Ammoniumsulfat: 29,1 g Ammoniumsulfat in 100 ml Überstand

4.9.4 Lecithinase-Test

Der Lecithinase-Test erfasst u.a. die Aktivität der *L. monocytogenes* Phospholipase B (PlcB). Eine Übernachtskultur der Bakterien wird dazu in BHI-Medium 1:100 verdünnt und bei 37°C kultiviert. Zu verschiedenen Zeiten entnimmt man jeweils 1 ml Kultur und zentrifugiert diese ab. 1,4 ml Saline-Lösung werden mit 0,4 ml Substrat-Lösung und 0,2 ml Kulturüberstand in einer Kunststoff-Küvette gemischt. Nach einer Inkubationszeit von 18-24 Stunden bei 37°C wird die OD₅₁₀ dieses Ansatzes gemessen, wobei BHI-Medium als Nullwert verwendet wird. Dabei wird der Ansatz nicht geschüttelt.

Eine Einheit Lecithinase-Aktivität ist definiert als 0,1 OD₅₁₀. Die Substrat-Lösung kann vor der Zugabe von Natriumazid auf 42°C erwärmt werden, um die einzelnen Bestandteile zu lösen. Abhängig von der Charge der Substrat-Lösung kann deren Reaktivität stark schwanken, was man teilweise durch unterschiedlich lange Inkubationszeiten des Reaktionsansatzes wieder ausgleichen kann.

Substrat-Lösung:	1,8	g	Phosphatidylcholin (Lecithin)
	1,25	g	Natrium-Desoxycholat
	50	µl	1 M ZnSO ₄ , ad 50 ml H ₂ O _{deion.}
	50	mg	Natriumazid, Lagerung bei 4°C

4.9.5 Herstellung eines Zymogramms

Mit einem Zymogramm können in einer SDS-PAGE aufgetrennte Peptidoglykan-Hydrolasen in einem sogenannten Zellgel sichtbar gemacht werden. In dieser Arbeit wurden für die Proteine denaturierende, reduzierende Bedingungen gewählt. Zur Herstellung des Zellgels wird eine Übernachtskultur aus wildtypischen *L. monocytogenes* mit PBS gewaschen und für 30 min mit 4%(w/v) SDS-Lösung in äquivalentem Volumen gekocht. Diese Suspension mischt man 0,2 %ig (v/v) in ein noch nicht erstarrtes Polyacrylamid-Gel (siehe 4.3.2), welches anschließend wie üblich zwischen zwei Glasplatten gegossen wird.

Die zellulären Proteine sowie Überstandsproteine können wie in Kapitel 4.3.1 beschrieben präpariert und in einer SDS-PAGE aufgetrennt werden. Dann legt man beide Gele übereinander und blottet sie zwischen jeweils drei in 1x Laufpuffer (siehe 4.3.2) getränkten Blotting Papieren für 2 Stunden bei ca. 100 mA. Anschließend wird das Zellgel dreimal für 30 min mit Zymogramm-Puffer gewaschen, eingeschweißt und bei 37°C solange inkubiert, bis einzelne klare Banden im Zellgel deutlich sichtbar sind. Je nach Peptidoglykan-Substrat kann dabei ein anderes Bandenmuster entstehen. Oftmals werden auch Zellen von *Micrococcus lysodeiaticus* (*M. luteus*) in diesem Test verwendet.

Zymogramm-Puffer:	25	mM	Tris-HCl, pH 8,0
	1	mM	DTT

5. Ergebnisse

5.1 Attenuierte *Listeria*-Stämme als Vektoren von „DNA delivery“ Systemen

Ziel dieser Arbeit war, *Listeria monocytogenes* Stämme als Vektoren zur Übertragung von eukaryotischen Expressions-Plasmiden (Gentransfer-Plasmiden) in das Zytosol von Zellen einzusetzen. Dabei wurden unter anderem verschiedene *in vivo* Anwendungen geplant wie die Vakzinierung eines Wirtes durch eine Infektion mit *L. monocytogenes* gegen ein Antigen, welches als cDNA auf diesem Gentransfer-Plasmid vorhanden war. Für eine *in vivo* Anwendung muss der als Vektor verwendete Listerien-Stamm den Wirt zwar infizieren und die Plasmid-DNA in geeignete Wirtszellen einschleusen können, darf aber keine krankmachenden Eigenschaften mehr besitzen. Vielmehr müssen seine virulenten Eigenschaften, die den Wirtsorganismus schädigen würden, attenuiert sein.

In den vorangegangenen Arbeiten zu diesem Projekt wurde für *in vitro* Gentransfer-Experimente die Virulenz-attenuierte Mutante *L. monocytogenes* $\Delta 2$ benutzt (Dietrich *et al.*, 1998), welche Deletionen in den Genen *mpl*, *actA* und *plcB* besitzt (Hauf *et al.*, 1997). Dieser Stamm erreicht zwar das Zytosol der Wirtszellen gleichermaßen wie ein wildtypischer *Listeria*-Stamm, ist aber stark beeinträchtigt in seiner intra- und interzellulären Motilität in diesen Zellen (hauptsächlich durch die *actA*-Deletion), was sich u.a. in einer um 3 Log Stufen höheren LD₅₀ in BALB/c Mäusen äußert.

In der vorliegenden Arbeit wurde sich auf die Untersuchung der *L. monocytogenes* Deletionsmutanten $\Delta actA$ und Δiap als Vektoren verschiedener „DNA delivery“ Systeme konzentriert (siehe Kapitel 5.2.4). Während die *actA*-Deletion in vielen Arbeiten schon ausführlich beschrieben worden ist (zusammengefasst in Cossart und Lecuit, 1998), wurde mit der Δiap -Deletionsmutante in dieser Arbeit ein neuer Stamm konstruiert, welcher im nächsten Abschnitt zunächst umfassend charakterisiert wird.

5.1.1 Charakterisierung des Stammes *L. monocytogenes* Δiap

5.1.1.1 Konstruktion der *L. monocytogenes* Deletionsmutante Δiap

Die von dem Gen *iap* kodierte Mureinhydrolase p60 wurde erstmals 1989 von Kuhn und Goebel als ein in die Invasion von Fibroblasten involviertes Protein beschrieben und als ein essentielles Protein von *L. monocytogenes* betrachtet (Wuenscher *et al.*, 1993).

Daher wurde die Deletion von *iap* in dieser Arbeit zunächst zur Konstruktion eines „Balanced-lethal“ Systems (siehe 5.2.1) geplant. Bei diesem System sollte *iap* im Chromosom von *L. monocytogenes* deletiert werden, während man eine p60-Expressions-Kassette auf einem Vakzine-Plasmid inseriert wollte. Dadurch wurde eine stabile Bindung des Plasmides an diesen p60-defizienten *Listeria*-Stamm erwartet.

Zur Komplementation von p60 während der Deletion wurde zunächst das Plasmid pFLO118p60 (Steigerwald, 1998) verwendet. Auf diesem Plasmid befand sich neben einer Phagenlysin-Kassette (P_{actA} -SP_{actA}-*ply*118, siehe 5.2.1.7) auch eine funktionelle *iap*-Transkriptionseinheit, welche die kodierende Sequenz sowie die Promotor- und Terminatorregion von *iap* umfasste. Nach Transformation des Plasmides in den *B. Subtilis* Stamm DB104 und in *L. monocytogenes* RIII (SLCC 5779) konnte mit Western Blot Analyse (unter Verwendung des MAK K3A7) in beiden Stämmen die Expression von Plasmid-kodiertem p60 nachgewiesen werden.

Bei der Planung einer Deletion von *iap* unter Verwendung von pFLO118p60 als Komplementations-Plasmid wurde der zu deletierende Bereich auf dem Genom so gewählt, dass zur Vermeidung von Rekombinationen nach Deletion keine homologen Sequenzen zwischen dem Genom und dem Plasmid pFLO118p60 mehr existieren.

Daher wurde das für die Deletions-Mutagenese benötigte Δiap -Mutagenese-Plasmid pLSV-C2+D folgendermaßen hergestellt: Mit den Oligonukleotiden p60DELforC2 und p60DELrevC wurde das stromaufwärts vom Deletions-Locus gelegene Fragment p60DELC2 (320 bp) amplifiziert; die Oligonukleotide p60DELforD und p60DELrevD dagegen wurden zur Herstellung des stromabwärts vom Deletions-Locus gelegenen Fragmentes p60DELD (434 bp) benutzt. Beide Fragmente wurden mit *PspAI* gespalten, miteinander ligiert und nochmals zur Weiterklonierung mit den Oligonukleotiden p60DELforC2 und p60DELrevD vervielfältigt. Das daraus neu entstandene Fragment, p60DELC2+D, konnte nach Restriktion mit *EcoRI* und *BamHI* in den ebenfalls mit diesen Enzymen linearisierten Vektor pUC18 inseriert werden. Aus diesem Vektor wurde das Fragment nochmals im Klonierungswirt *E. coli* vervielfältigt, anschließend mit *EcoRI* und *BamHI* herausgespalten und in das Mutagenese-Plasmid pLSV1 subkloniert, resultierend in pLSV-C2+D.

Das Mutagenese-Plasmid pLSV1 trägt neben einem Erythromycinresistenz-Gen sowohl einen Gram-negativen als auch einen Gram-positiven, Temperatur-sensitiven Replikations-Ursprung, was zur Folge hat, dass pLSV1-Derivate in Gram-positiven Bakterien bei 30°C gut und bei 43°C nicht repliziert werden können (Wuenschel *et al.*, 1991). Daher wurde das *iap*-Mutagenese-Plasmid pLSV-C2+D nach Transformation in *L. monocytogenes* EGD Sv1/2a sofort bei 30°C und 5 µg/ml Erythromycin weiterkultiviert. Klone, bei denen das Mutagenese-Plasmid durch homologe Rekombination ins Chromosom der Bakterien integriert worden ist, sind durch weitere Kultivierung bei 43°C durch Erythromycin-Selektion isoliert und mit Hilfe eines PCR-„Screenings“ weiter bestätigt worden. Ein einzelner Klon mit integriertem Mutagenese-Plasmid wurde anschließend kompetent gemacht und mit dem Komplementations-Plasmid pFLO118p60 transformiert.

Aus diesem Stamm konnte nach weiteren Passagen in Erythromycin-freiem Medium bei 30°C durch PCR-Analyse eine Erythromycin-sensitive Δiap -Deletionsmutante, welche *in trans* mit *iap* komplementiert war, gefunden werden (Abbildung 5.1). Die chromosomale Deletion von *iap* konnte zusätzlich durch Sequenzierung der die Deletion umfassenden Region eindeutig bestätigt werden.

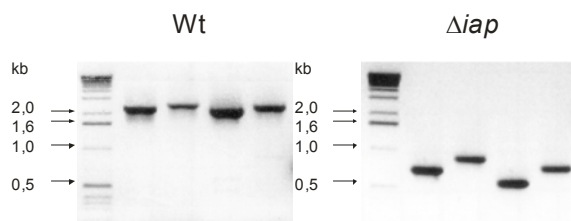


Abbildung 5.1: PCR-Analyse mit den Oligonukleotiden p60-A und p60-D3 zu Identifizierung der *iap*-Deletion im Genom von *L. monocytogenes*. Als Matrize wurde genomische DNA des Wildtyps und von Δiap verwendet.

Anschließend wurde eine Stabilitäts-Bestimmung des Plasmides pFLO118p60 in der Deletionsmutante Δiap durchgeführt, dazu wurde zunächst der isogene *L. monocytogenes* Wildtyp (EGD Sv1/2a) ebenfalls mit einem pFLO-Derivat (pFLO118) transformiert, auf dem das gleiche Phagenlysin-Konstrukt wie auf pFLO118p60 kodiert ist. *L. m.* EGD/ pFLO118 und *L. m.* Δiap / pFLO118p60 wurden zunächst über Nacht in BHI-Medium mit 5 µg/ml Tetracyclin kultiviert und anschließend 1:100 in BHI-Medium ohne Antibiotikum verdünnt (im Dreifachansatz). Nach 0, 8, 24, 48 und 96 h sind Verdünnungen dieser Langzeitkulturen auf BHI-Agar ausplattiert und die Klone für weitere 24 h kultiviert worden. Von jeder Platte wurden zur Kontrolle der verbliebenen Tetracyclin-Resistenzen 50 Kolonien auf BHI-Agar-Platten mit Tetracyclin überführt.

Wie in Abbildung 5.2 zu sehen ist, konnte man sowohl bei den wildtypischen Listerien als auch bei Δiap bis zu ca. 30 % Tetracyclin-sensitive Kolonien finden, was bei beiden Stämmen auf einen gleichwertigen Plasmid-Verlust hindeutet. Dies war ein erster Hinweis darauf, dass Listerien anscheinend auch ohne eine Kopie von *iap* überleben und wachsen können.

Spätere, analog durchgeführte *iap*-Deletionsmutagenesen in anderen *L. monocytogenes*-Stämmen (p Δ 5, Δini GHE, Δtrp S/ pFLO-*trp*S), welche ohne die Verwendung eines p60-Komplementations-

Plasmides durchgeführt worden sind, belegten dabei deutlich, dass die Deletion von *iap* prinzipiell auch ohne Komplementation *in trans* funktioniert.

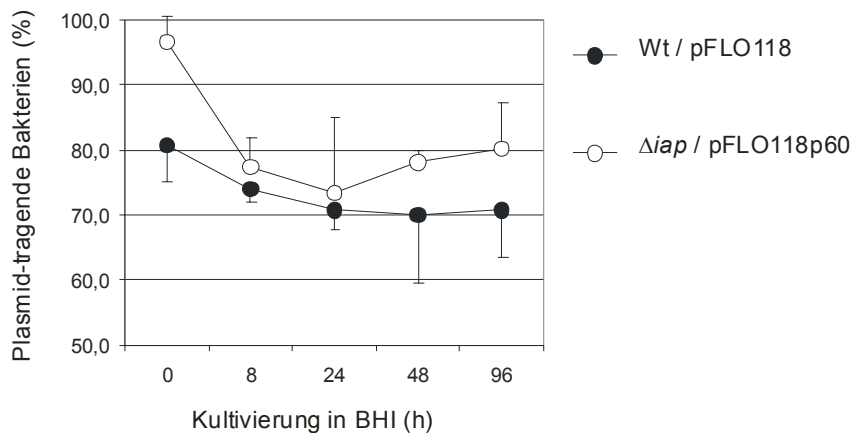


Abbildung 5.2: Segregationsstabilität von p60-kodierenden Plasmiden in *L. monocytogenes* EGD Wildtyp und Δiap .

5.1.1.2 Nachweis der Expression von p60 in Δiap , mit und ohne p60-Komplementation *in trans*

Zur Verifizierung der Inaktivierung von p60 in Δiap wurden die Stämme Δiap / pFLO118p60 (*original*) vor Verlust des Komplementations-Plasmides, Δiap nach Verlust des Plasmides und Δiap / pFLO118p60 (*neu*) nach erneuter Transformation des Plasmides auf Expression von p60 im Vergleich zum Wildtyp hin untersucht. Der Nachweis des Proteins p60 gelingt am einfachsten durch eine Western Blot-Analyse unter Verwendung des monoklonalen Antikörpers K3A7, welcher gegen das Epitop „QQQTAPKAPTE“ von p60 gerichtet ist.

Von Übernachtskulturen der Stämme *L. monocytogenes* EGD (Wt), Δiap , Δiap / pFLO118p60 (*original*) sowie Δiap / pFLO118p60 (*neu*) wurden sowohl zelluläre Proteine als auch Überstandsproteine präpariert. Von diesen Präparationen wurden anschließend äquivalente Mengen an Proteinen in einer Western Blot-Analyse untersucht (Abbildung 5.3).

Im Überstand (ÜS) der Übernachtskultur, aber nicht im Pellet (P) der wildtypischen Bakterien, ließ sich sehr hohe Menge an p60-Protein nachweisen, dagegen konnte sowohl im Überstand als auch im Pellet des Stammes Δiap gar kein p60 detektiert werden. Interessanterweise schien die Komplementation von *iap* auf dem Plasmid pFLO118p60 nicht die natürliche Expressionsrate des Wildtyps zu erreichen, obwohl durch dieses Plasmid in einem Bakterium mehrere Kopien von *iap* inklusive der eigenen Promotorregion vorhanden sind. Dieser Befund konnte später mit anderen p60-Komplementations-Plasmiden bestätigt werden.

Ein ähnlicher Western Blot ist schon 1991 von Köhler *et al.* gezeigt worden. In diesem Experiment wurde die Raumutante RIII, welche nur sehr wenig p60 im Vergleich zum Wildtyp exprimiert (Kuhn *et al.*, 1989), mit einem Multi-Kopien- p60-Expressions-Plasmid ausgestattet. Obwohl die Menge der *iap*-mRNA in diesem Stamm anstieg, erreichte die p60-Expression nicht den Level des

Wildtyps. Es scheint daher, dass p60 bei den früheren und bei den hier durchgeführten Komplementations-Versuchen nicht *in trans* komplementiert werden konnte.

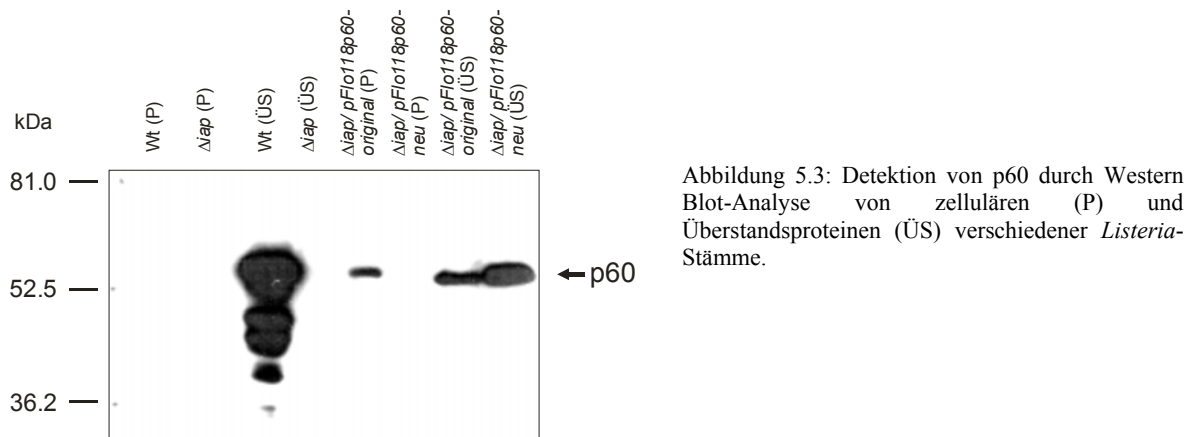


Abbildung 5.3: Detektion von p60 durch Western Blot-Analyse von zellulären (P) und Überstandsproteinen (ÜS) verschiedener *Listeria*-Stämme.

5.1.1.3 Konstruktion einer *iap*⁺ Revertante zur Komplementation von *Δiap* *in cis*

Wie in Kapitel 5.1.1.2 beschrieben wurde, konnte die p60-Expression von *Δiap* *in trans* durch die Einführung eines p60-Expressions-Plasmides nicht ausreichend komplementiert werden. Da für die weitere Charakterisierung der *Δiap*-Deletionsmutante aber ein vollständig komplementierter Stamm hilfreich wäre, wurde eine chromosomale Reversion des deletierten Bereiches in *Δiap* geplant. Diese Reversion ließ sich - analog der Konstruktion von *Δiap* - am einfachsten durch eine Mutagenese mit doppelter homologer Rekombination eines Mutagenese-Plasmides und der chromosomalen Zielsequenz ausführen.

Das Mutagenese-Plasmid pLSV-C2iapD zur Komplementierung von p60 *in cis* wurde wie folgt hergestellt: Mit den Oligonukleotiden p60DELforC2 und p60DELrevD wurde ein 2373 bp großes Reversions-Fragment amplifiziert, welches sowohl die stromauf- und abwärts gelegenen Deletionsfragmente p60DELC2 und p60DELD sowie den *iap*-Deletions-Locus umfasst (siehe 5.1.1.1). Dieses Fragment wurde über die Schnittstellen *EcoRI* und *BamHI* zuerst in pUC18 kloniert und dann in pLSV-1 subkloniert. pLSV-C2iapD wurde anschließend in den Stamm *Δiap* transformiert und nach Selektion mit Erythromycin bei 43°C ließ sich ein Klon mit Plasmid-Insertion isolieren. Nach weiteren Passagen und Selektion ohne Erythromycin bei 30°C konnten mittels PCR-„Screening“ die positive *iap*⁺ Revertante Rev1 gefunden werden.

Dieser Stamm wurde anschließend mit Southern und Western Blotting analysiert (Abbildung 5.4). Chromosomale DNA des Wildtyps, von *Δiap* und von Rev1 wurde mit dem Restriktionsenzym *HpaII* gespalten, elektrophoretisch aufgetrennt und geblottet. Mit einem 500 bp-Fragment aus dem *iap*-Gen als Sonde konnte *iap* anschließend sowohl im wildtypischen Stamm als auch in Rev1 nachgewiesen werden. Nach Western Blot Analyse der Überstandsproteine dieser drei Stämme

zeigte sich allerdings, dass Rev1 trotz vorhandenem Gens kein p60 exprimierte. Die nachträgliche Sequenzierung von *iap* in diesem Stamm und auch auf dem Mutagenese-Plasmid pLSV-C2iapD ergab, dass an Position 908 (Nummerierung nach GenBank Sequenz Nr. X52268) ein A im Leserahmen fehlte, was theoretisch zu einem Abbruch der Translation nach 173 Aminosäuren führt. Interessanterweise konnte nach Transformation des Plasmides pLSV-C2iapD(Δ A908) in *E. coli* DH10b und *L.m.* Δ *iap* dennoch mit einer leichten Expression von komplettem p60 mit dem monoklonalen Antikörper K3A7 detektiert werden.

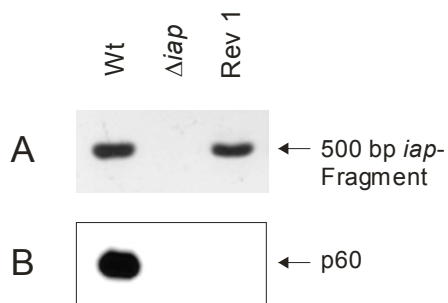


Abbildung 5.4: Southern Blot (A) und Western Blot (B) Analyse von *L. monocytogenes* Wildtyp, Δ *iap* und Rev1. Die Southern Blot Analyse wurde mit *Hpa*II-restringierter chromosomaler DNA und einem 500 bp-Fragment aus dem Leserahmen von *iap* als Sonde durchgeführt. Beim Western Blot wurden Überstandsproteine mit dem monoklonalen Antikörper K3A7 gefärbt.

Zur Korrektur dieser Punkt-Mutation in *iap* wurde davon abgesehen, dasselbe Mutagenese-Plasmid mit der kompletten *iap*-Sequenz (incl. *iap*-Promotor) nochmals zu konstruieren, da anscheinend die Expression von p60 in *E. coli* öfter zu Mutationen im *iap*-Gen führt, was evtl. auf seine Toxizität für *E. coli*-Zellen zurückzuführen ist. Daher wurde mit den Oligonukleotiden *iap*-repair-for und *iap*-repair-rev ein 571 bp großes, die Mutationsregion überspannendes Fragment über die Schnittstellen *Eco*RI und *Bam*HI in pLSV-1 kloniert, wodurch das neue Mutagenese-Plasmid pLSV-repair entstand.

Dieses Plasmid wurde in den Stamm Rev1 transformiert und das integrierte Plasmid bei 43°C selektioniert. Da man eine Punktmutation nur schwer mit PCR Analyse detektieren kann, wurde zur Suche nach Klonen mit intakter *iap*-Sequenz ein Kolonie-Immunoblot unter Verwendung des anti-p60 Antikörpers K3A7 durchgeführt. Auf diese Weise konnte sehr einfach ein vollständig revertierter Klon isoliert werden, welcher mit *L. monocytogenes iap*⁺ bezeichnet worden ist.

Verdünnungsreihen von Überstandsproteinen der drei Stämme *L. monocytogenes* EGD Wildtyp, Δ *iap* und *iap*⁺ wurden in einer Western Blot Analyse zum einen mit dem anti-p60-MAK K3A7 und zum anderen mit einem murinen Antiserum gegen *Listeria*-Lysat gefärbt. Letzteres diente dabei zur Evaluierung der aufgetragenen Proteinmenge. Diese Blots sind in Abbildung 5.5 gezeigt und man erkennt deutlich, dass der p60-Expressionslevel der Revertante *iap*⁺ bei gleicher Gesamtproteinmenge exakt den des Wildtyps erreicht. Somit wurde gezeigt, dass p60 in der Δ *iap*-Deletionsmutante nicht *in trans* sondern nur *in cis* komplementiert werden kann.

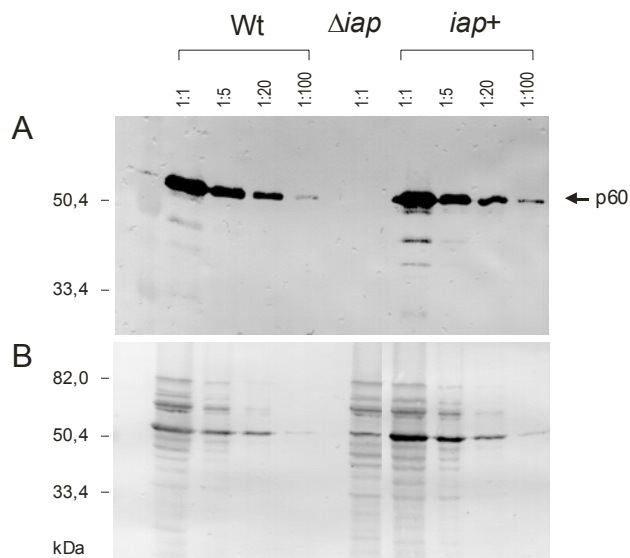


Abbildung 5.5: Western Blot Analysen zur Evaluierung der p60 Expression in den Stämmen *L. monocytogenes* EGD (Wt), Δiap und *iap*⁺. Überstandsproteine von Bakterien in der späten exponentiellen Wachstumsphase wurden in den Verdünnungen 1:1, 1:5, 1:20 und 1:100 aufgetragen. (A) Immunfärbung mit anti-p60-MAK K3A7 und (B) mit Antiserum gerichtet gegen *Listeria*-Lysat.

5.1.1.4 Zell-Morphologie von *L. monocytogenes* Δiap

Das Gen *iap* kodiert für die Mureinhydrolase p60, welche eine Rolle in einem späteren Schritt Zellteilung zu haben scheint (Wuenscher *et al.*, 1993). Diese Charakterisierung konnte mit Hilfe der *L. monocytogenes* Raumutante RIII (Potel und Schulze-Lammers, 1985) erstellt werden, welche p60 nur in geringer Menge exprimiert und beim Wachstum lange Ketten (bis 70 μm) mit an den Septen zusammenhängenden Einzelzellen bildet, was sich in dem Phänotyp einer rauen Kolonieform äußert. Da die Zugabe von p60 oder eine Ultraschallbehandlung bei RIII zu einer Reduktion der Kettenlänge führt (Kuhn und Goebel, 1989), scheint das p60 Protein besonders relevant bei der Trennung der Septen am Ende des Zellteilungszyklus zu sein.

Die Morphologie der Δiap -Deletionsmutante unterscheidet sich aber von der der Raumutante RIII. Die Kolonien von Δiap erscheinen im Lichtmikroskop weder ganz glatt wie wildtypische Kolonien, noch sind sie so rau wie die von RIII (Abbildung 5.6).

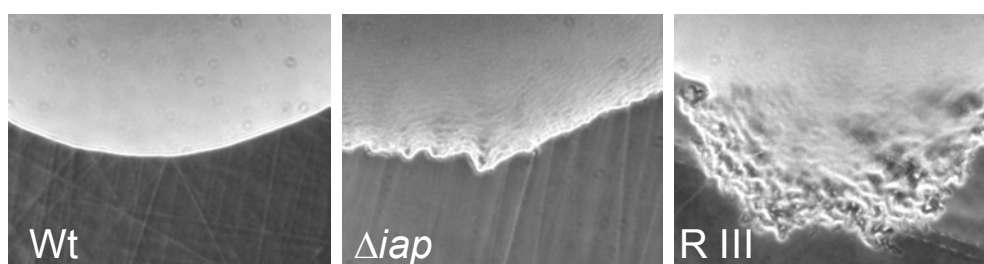


Abbildung 5.6: Kolonieränder der Stämme *L. monocytogenes* EGD (Wt), Δiap und RIII.

In der exponentiellen Wachstumsphase erscheinen einzelne Bakterien von Δiap als kurze Ketten (Abbildung 5.7 A), welche sehr oft in der Mitte abgeknickt erscheinen. Größenmessungen einzelner Bakterien in Raster-Elektronenmikroskopischen Aufnahmen ergaben eine durchschnittliche Länge von $3,9 \mu\text{m}$ ($\pm 1,5 \mu\text{m}$); im Gegensatz dazu beträgt die durchschnittliche Länge von exponentiell wachsenden, wildtypischen Bakterien $1,8 \mu\text{m}$ ($\pm 0,3 \mu\text{m}$) und von denen der *iap*⁺ Revertante ebenfalls $1,8 \mu\text{m}$ ($\pm 0,4 \mu\text{m}$). Während wildtypische und *iap*⁺ Bakterien in dieser Wachstumsphase hauptsächlich aus zwei noch verbundenen Einzelzellen bestehen, wird die kurze Kette der *iap*-negativen Bakterien durchschnittlich aus 4-8 Einzelzellen gebildet.

In der stationären Wachstumsphase und in einer Übernachtkultur sind die Ketten von Δiap schon etwas kürzer als in der exponentiellen Phase, aber erst in einer 36 Stunden alten Kultur erreichen die einzelnen Zellen von Δiap annähernd die Länge von Zellen des Wildtyps und der *iap*⁺ Revertante (Abb. 5.7 A).

Bei der Δiap -Mutante konnte auch beobachtet werden, dass nach der Septum-Bildung keine Kontraktion der Septen zur Bildung abgerundeter Pole stattfindet (Abb. 5.7 C), so dass bei Raster-Elektronenmikroskopischen Aufnahmen kaum Einschnürungen in den Zellketten zu erkennen sind (Abb. 5.7 B). Dafür können aber unregelmäßige Bruch- oder Reißstellen zwischen sich teilenden Zellen beobachtet werden (Abb. 5.7 B, Pfeile). Daher entsteht der Eindruck, dass die Δiap -Mutante nicht mehr zur Septum-Einschnürung fähig ist, sondern dass sich die Zellen durch einen Brechvorgang voneinander trennen. Als Resultat entstehen nach der Zellteilung abgeflachte Pole (Abb. 5.7 B, markiert mit Pfeilspitzen). Die *iap*⁺ Revertante dagegen zeigt bezüglich der Septum-Bildung keinerlei Unterschiede zum Wildtyp.

Die Länge einer einzelnen Bakterienzelle während des Zellwachstums und die Bildung des Septums in der Mitte der Zelle unterliegen beide normalerweise einer strengen Regulation (Harry, 2001). Die zwei bei wildtypischen und *iap*⁺ Bakterien meist noch verbundenen Einzelzellen wurden daher gemessen und ihr mittlerer Variationskoeffizient (s. Anhang) zueinander berechnet. Wildtypische Zellen variierten bei diesen Messungen nur um 6,4 % zueinander, während Zellen des *iap*⁺ Stammes einen Variationskoeffizienten von 17,2 % besaßen. Man konnte bei einzelnen Zellen dieses Stammes deutlich eine Deregulation der Zelllänge beobachten: u.a. waren sehr kleine Zellen über ein Septum mit einer viel längeren Zelle verbunden. Da bei Δiap im Raster-Elektronenmikroskop auf Grund der nur schwach erkennbaren Septen keine Einzelzell-Längen messbar waren, konnten mit diesem Stamm keine vergleichbare statistische Auswertung gemacht werden. Messungen von Schnitten durch Δiap -Bakterienzellen ergaben aber bezüglich der Einzelzell-Länge einen Variations-Koeffizienten von ca. 20 %.

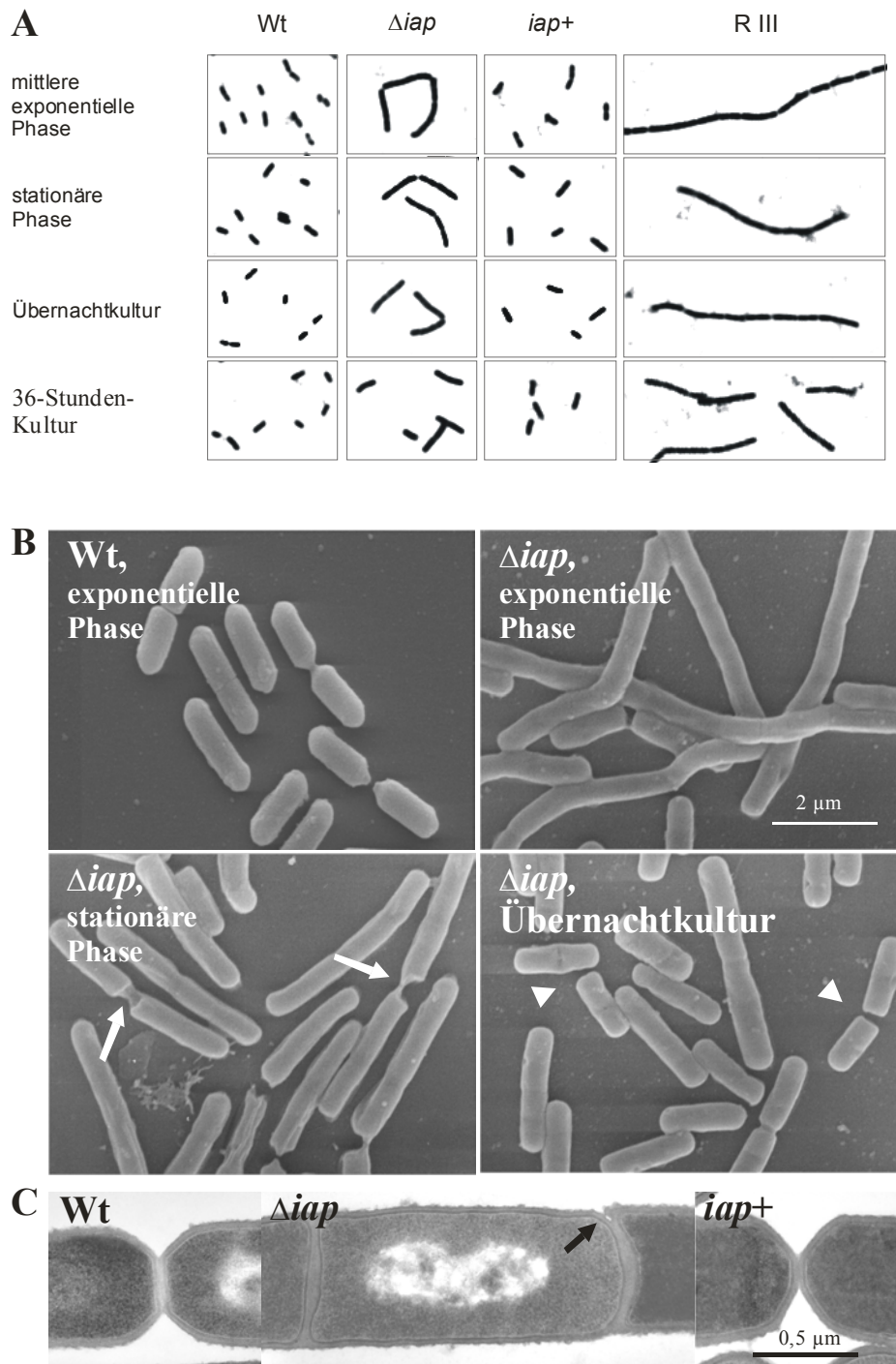


Abbildung 5.7: Lichtmikroskopische (A), Raster-Elektronenmikroskopische (B) und Transmissions-Elektronenmikroskopische (C) Aufnahmen von *L. monocytogenes* Wildtyp (Wt), Δiap und *iap*⁺. Pfeile zeigen auf Bruchstellen bei der Zellteilung von Δiap , Pfeilspitzen auf abgeflachte Pole.

5.1.1.5 Kettenzerfall von *Δiap* mit gereinigtem p60, Wildtyp-Überstandsproteinen oder Ultraschall

Wie schon in Kapitel 5.1.1.4 erwähnt, führte die Behandlung der Raumutante RIII mit p60 Protein oder Ultraschall zu teilweisem Zerfall der von diesem Stamm ausgebildeten Zellketten (Kuhn und Goebel, 1989). Da die *Δiap*-Mutante ausschließlich p60-defizient sein sollte, müsste eine Behandlung mit gereinigtem p60 ebenfalls zu einem Zerfall der kurzen Ketten in Einzelzellen führen.

Die Herstellung von reinem p60 erfolgte über rekombinante Expression in *E. coli* M15[pREP4]. Mit den Oligonukleotiden p60His-for und p60His-rev wurde die kodierende Sequenz von p60 ohne Signalpeptid in den Expressionsvektor pQE30 kloniert. Ca. 90 mg p60His konnte nach Expression in einer 2 l Kultur, Aufreinigung über den His-„tag“ mit Nickel-Chelat-Affinitätschromatografie und anschließender Dialyse gegen PBS hergestellt werden (Abbildung 5.8).

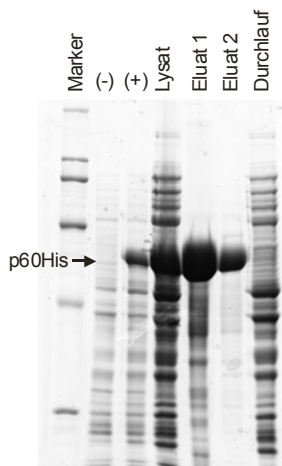


Abbildung 5.8: Expression von p60His, SDS-PAGE nach Coomassie-Färbung. Proben: nicht induzierte (-) und induzierte (+) *E. coli* M15[pREP4] x pQE30-p60, lysierte Expressionskultur, Eluat mit p60His, Durchlauf vor Elution.

Wildtypische und *Δiap* Bakterien wurden zunächst in BHI-Medium bis zum Beginn der stationären Phase kultiviert. Dann wurde 1 ml dieser Kulturen mit je 100 µl p60His (Konzentrationen: 0,01 mg/ml, 0,1 mg/ml und 1 mg/ml) oder PBS als Kontrolle versetzt und für mehrere Stunden bei 37°C im Heizblock inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden die

Bakterien mikroskopiert und fotografiert.

Bei diesem Experiment konnte ein teilweiser Zerfall der Ketten von *Δiap* nach einer Stunde Inkubation mit 100 µl p60His in der Konzentration 0,01 mg/ml induziert werden (Abbildung 5.9 A), aber eine komplette Suspension aus Einzelzellen – vergleichbar mit dem Wildtyp - wurde durch die Zugabe des Proteins nicht erreicht. Wildtypische Bakterien schienen unbeeinflusst von der Zugabe des Proteins zu bleiben.

Um zu überprüfen, ob die kurzen Ketten der *Δiap*-Deletionsmutante für einen vollständigen Zerfall zusätzlich zum p60 Protein eventuell noch andere Proteine aus dem *L. monocytogenes* Wildtyp-Überstand benötigen, wurde ein Kettenzerfallstest (Kuhn und Goebel, 1989) mit wildtypischen sowie mit *Δiap* -Überstandsproteinen durchgeführt. Dazu wurden mit Ammoniumsulfat gefällte Überstandsproteine dieser Stämme zu *Δiap* und als Kontrolle zu WtR8 gegeben, wobei WtR8 eine neue, von *L. monocytogenes* EGD Sv1/2a abstammende Raumutante ist, welche ähnlich wie RIII lange Ketten mit eingezogenen Septen ausbildet und reduzierte Mengen an p60 exprimiert. Die

Überstandsproteine des *L. monocytogenes* Wildtyps – aber nicht die von Δiap - konnten in diesem Experiment nach einer Inkubationszeit von 2 Stunden bei 37°C zwar die langen Ketten der Raumutante WtR8 zerfallen lassen, hatten aber auf die Morphologie von Δiap kaum einen Einfluss (Abbildung. 5.9 B).

Zusätzlich zu den Protein-abhängigen Zerfalls-Experimenten wurden exponentiell wachsende Bakterien des Stammes Δiap mit einer Ultraschallschallspitze beschallt und in Intervallen von ca. 10 sec wurden die Bakterienzellen nach Zugabe von Ethidiumbromid (zur Darstellung der Einzelzellen) unter dem Mikroskop betrachtet. Dabei konnte beobachtet werden, dass die Bakterien mit zunehmender Beschallungsdauer vermehrt abgetötet wurden, was durch eine Deformation der Zellen sichtbar wurde. Die kurzen Ketten der Δiap -Deletionsmutante konnten durch die Beschallung aber nicht zu Einzelzellen, sondern nur zu noch kürzeren Ketten aus ca. 2-4 aneinanderhängenden Zellen und Zelldetritus reduziert werden (Abbildung 5.9 C).

Zusammengefasst können die kurzen Ketten von Δiap teilweise mit gereinigten p60 oder Ultraschall zerstört werden, es wurde aber mit keiner Methode eine Reduktion der Zelllänge auf Wildtyp-Niveau erreicht. Nach der Zugabe von p60His war der Zerfall stark abhängig von der Konzentration des Proteins, daher könnte ein optimaler Kettenzerfall von Δiap eventuell durch eine Veränderung der Konzentration der Überstandsproteine herbeigeführt werden.

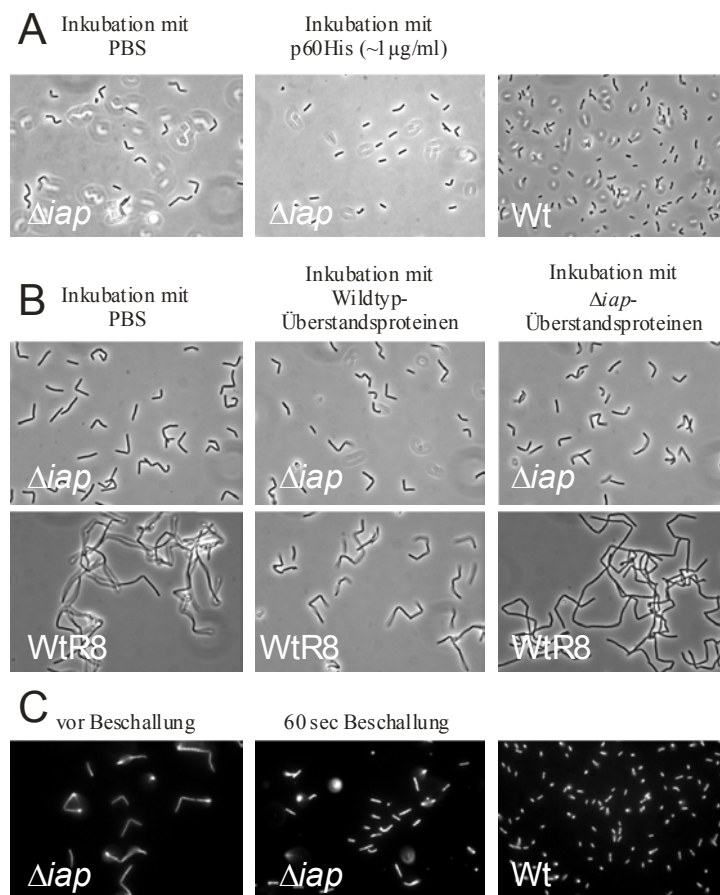


Abbildung 5.9: Kettengerfall von Δiap durch p60His (A), wildtypischen Überstandsproteinen (B) oder Ultraschall-Behandlung (C).

5.1.1.6 Replikation von Δiap in BHI-Medium und im Zytosol von Makrophagen

Zur Untersuchung einer möglichen Virulenz-Attenuation der Deletionsmutante Δiap gehört u.a. die Charakterisierung der intrazellulären Replikationsfähigkeit dieses Stammes in Wirtszellen. Zuvor wurde aber untersucht, ob dieser Stamm in einem Vollmedium wie BHI einen Wachstumsnachteil besitzt, da für eine Infektion von Zellen Bakterien zuerst in diesem Medium gezüchtet und auf eine definierte Lebendzellzahl eingestellt werden müssen. Übernachtskulturen der Stämme *L. monocytogenes* EGD (Wt) und Δiap wurden zunächst 1:100 in BHI-Medium verdünnt und bei 37°C in Doppelansätzen kultiviert. In Zeitintervallen von jeweils einer Stunde wurde die OD₆₀₀ (optische Dichte bei 600 nm) der einzelnen Kulturen bestimmt. Wie in Abbildung 5.10 A zu sehen ist, kann Δiap in BHI-Medium mit der gleichen Geschwindigkeit und bis zur gleichen Zelldichte in der stationären Phase wachsen wie der wildtypische *Listeria*-Stamm. Zusätzlich zur OD₆₀₀ wurden auch die Lebendzellzahlen im Verlauf einer wachsenden Kultur beider Stämme bestimmt. Dabei lagen die Lebendzellzahlen von Δiap bei gleicher OD₆₀₀ deutlich unter denen des Wildtyps, was auf die besondere Eigenschaft des Stammes zurückzuführen ist, als kurze Ketten mit an den Septen zusammenhängenden Einzelzellen zu wachsen.

Erste Infektionsversuche mit der murinen Makrophagen-Zell-Linie J774.A1 als professionell phagozytische Wirtszelle und Bakterien, welche bis zu einer mittleren exponentiellen Phase kultiviert worden sind, zeigten überraschende Ergebnisse: Bei Verwendung einer definierten Lebendzellzahl an wildtypischen und Δiap Bakterien in einem Infektionsansatz wurden nach einer einstündigen Infektion der Wirtszellen und einer anschließenden einstündigen Inkubation der Zellen mit Gentamycin-haltigem Medium (50 µg/ml Gentamycin) insgesamt immer ca. dreimal mehr intrazelluläre Δiap Bakterien als wildtypische Bakterien detektiert.

Makrophagen sind professionelle phagozytierende Zellen, daher wurde angenommen, dass sich die Aufnahme beider Bakterienstämme von diesen Zellen quantitativ nicht unterscheiden kann, und es gab auch keinerlei Hinweise darauf, dass Makrophagen Δiap Bakterien bevorzugt aufnehmen. Aus diesem Grund wurde vermutet, dass die kurzen Ketten dieses Stammes in einem Kompartiment der Wirtszelle zerfallen, was nach Ausplattierung dieser zerfallenen Bakterien zu unvergleichbar hohen intrazellulären Lebendzellzahlen führen würde. Da nach einer Kulturdauer von 36 Stunden Bakterien der Δiap Deletionsmutante annähernd die gleiche Zellgröße wie der Wildtyp erreichen und somit nicht weiter zerfallen können (siehe 5.1.1.4), wurden für weitere Infektionsversuche alle Bakterienstämme für 36 Stunden in BHI-Medium kultiviert.

Zur Bestimmung der intrazellulären Replikationsrate wurden Zellen der Makrophagen-Zell-Linie J774.A1 mit (für 36 Stunden kultivierten) Bakterien des *Listeria* Wildtyps sowie der Δiap Deletionsmutante für eine Stunde infiziert, gewaschen und für die restliche Versuchsdauer mit Gentamycin-haltigem Medium (50 µg/ml) inkubiert, wobei die „multiplicity of infection“ (MOI) bei diesem Versuch auf ca. 1 eingestellt worden ist. Zwei, 3, 4 und 5 Stunden nach Infektion

konnten die Anzahlen der intrazellulären Bakterien pro Infektionsansatz durch das Ausplattieren der Zell-Lysate bestimmt werden. Parallel zu dieser Versuchsanordnung wurden auf Deckgläsern kultivierte J774.A1 Zellen ebenfalls mit beiden Stämmen infiziert. Diese Zellen wurden 2, 3, 4 und 5 Stunden nach Infektion fixiert und mit Giemsa-Lösung gefärbt. Anschließend erfolgte die lichtmikroskopische Auswertung der Präparate, wobei für jeden Zeitpunkt die durchschnittliche Anzahl von einzelnen Bakterienzellen in einem Makrophagen ausgezählt worden ist.

Mit beiden Methoden konnte ein übereinstimmendes Ergebnis erhalten werden: Ausgehend von Bakterien, welche zuvor 36 Stunden in BHI-Medium kultiviert worden sind, entsprach zum einen die intrazelluläre Bakterienzahl und zum anderen auch die Replikationsrate von *Δiap* der des Wildtyps, d.h., es konnten zu jeden Zeitpunkt nach Infektion eine vergleichbare Anzahl an intrazellulären Bakterien in den Makrophagen detektiert werden (Abbildung 5.10 B). Nach Auszählung der mit Giemsa angefärbten Bakterien konnten ebenfalls zu jedem Zeitpunkt eine vergleichbare Anzahl an einzelnen Bakterienzellen mit einer Makrophagenzelle kolokalisiert werden (Abbildung 5.10 C), dabei erschienen die Zellen von *Δiap* zwischen 3-5 Stunden nach Infektion insgesamt etwas länger zu sein, was darauf hindeutet, dass sich die bereits beschriebenen kurzen Ketten der *Δiap*-Deletionsmutante auch intrazellulär bilden.

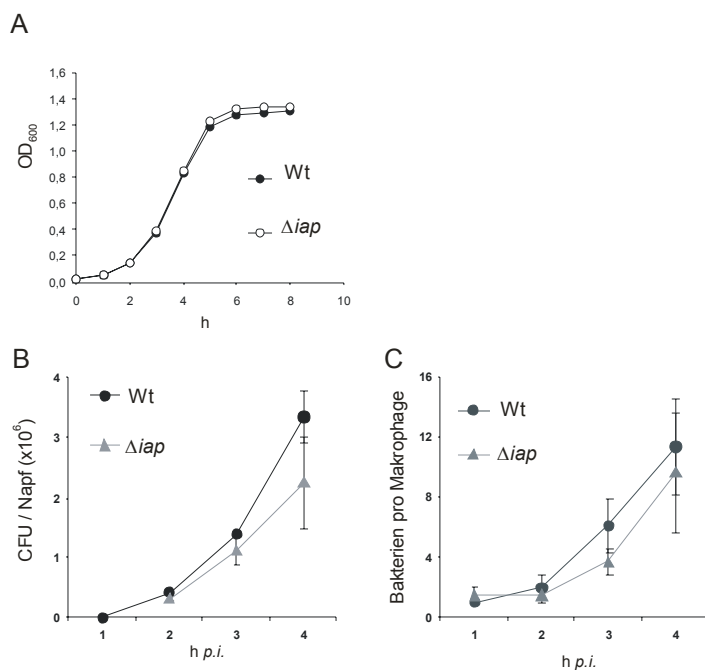


Abbildung 5.10: Extrazelluläres Wachstum in BHI-Medium (A) und intrazelluläre Replikation (B, C) in Makrophagen von *Δiap* im Vergleich zum Wildtyp.

5.1.1.7 Expression verschiedener Virulenz-Proteine

Der Einfluss von p60 auf die Virulenz von *L. monocytogenes* kann durch die Infektion von Wirtszellen oder durch *in vivo* Infektion von Mäusen mit *iap*-defizienten Bakterien untersucht werden. Eine wichtige Voraussetzung dafür ist allerdings, dass dieser Stamm keinerlei

Unterschiede in anderen relevanten Virulenzproteinen zum Wildtyp besitzen darf. Virulenzfaktoren wie die Internaline A und B (InlA und InlB) sind an der Aufnahme von *L. monocytogenes* in nicht professionelle phagozytische Zellen beteiligt, während u.a. Listeriolysin (LLO) die Befreiung der Bakterien aus dem Phagosom vermittelt. Sowohl ActA als auch die Phospholipase B (PlcB) spielen entscheidende Rollen bei der intra- und interzellulären Motilität von *Listeria*.

Einige der Virulenzfaktoren wie LLO und PlcB werden von *L. monocytogenes* sezerniert, ActA und InlA hingegen besitzen einen Zellmembran-Anker und InlB wird Zellwand-assoziiert exprimiert. Daher lag die Vermutung nahe, dass p60 als Zellwand-wirksames Protein vielleicht einen Einfluss auf die Sekretion oder die Verankerung von Proteinen in der Membran oder der Zellwand haben und dadurch die Expression der Virulenzproteine verändern könnte.

Da für die genannten Virulenzproteine Antikörper vorhanden waren, konnte die Expression dieser Proteine in Western Blot Analysen miteinander verglichen werden. Zelluläre Proteine als auch Überstandsproteine von wildtypischen (Wt), *iap*-defizienten (Δiap) und *iap*-komplementierten Bakterien (*iap*⁺), welche bis zur späten exponentiellen Phase (180 KE bzw. OD₆₀₀=1,0) kultiviert worden sind, wurden sowohl konzentriert als auch 1:10 verdünnt mit SDS-PAGE aufgetrennt, geblottet und mit verschiedenen Antiseren (siehe 3.4) inkubiert.

In Abbildung 5.11 sind Ausschnitte dieser Western Blot Analysen dokumentiert: Sowohl die zellulären als auch die Überstandsproteine aller drei Stämme schienen dabei in vergleichbarer Konzentration aufgetragen worden zu sein, da auf allen Blots die entsprechenden Virulenz-Proteine mit gleicher Intensität detektiert worden sind. Daraus folgt, dass Δiap und *iap*⁺ in der späten exponentiellen Wachstumsphase die wichtigen Virulenz-Faktoren InlA, InlB, LLO, ActA, und PlcB sowie das Autolysin p45 (siehe 5.1.1.12) gleichermaßen exprimieren wie der Wildtyp.

Da auf Grund der Zellmorphologie von Δiap verschiedene Infektionsversuche mit für 36 Stunden kultivierten Bakterien durchgeführt worden sind (siehe 5.1.1.6), wurden für Western Blot Analysen nochmals zelluläre Proteine von Bakterien präpariert, welche 36 Stunden in BHI-Medium gezüchtet worden sind. Dabei wurde insbesondere die Expression der Internaline A und B in diesen Kulturen untersucht (Abbildung 5.12).

Obwohl vergleichbare Mengen an zellulären Proteinen in diesen Western Blot Analysen eingesetzt worden sind, scheint Δiap nach einer Kultivierungsdauer von 36 Stunden zwar ähnliche Mengen an InlB aber reduzierte Mengen an InlA im Vergleich zum Wildtyp als auch zum Stamm *iap*⁺ zu exprimieren. Daher können derart kultivierte Bakterien zwar für *in vitro* oder *in vivo* Infektionsversuche, aber nicht in *in vitro* Invasions-Experimenten verwendet werden, da Internaline entscheidend für die Invasion von Listerien in Wirtszellen sind.

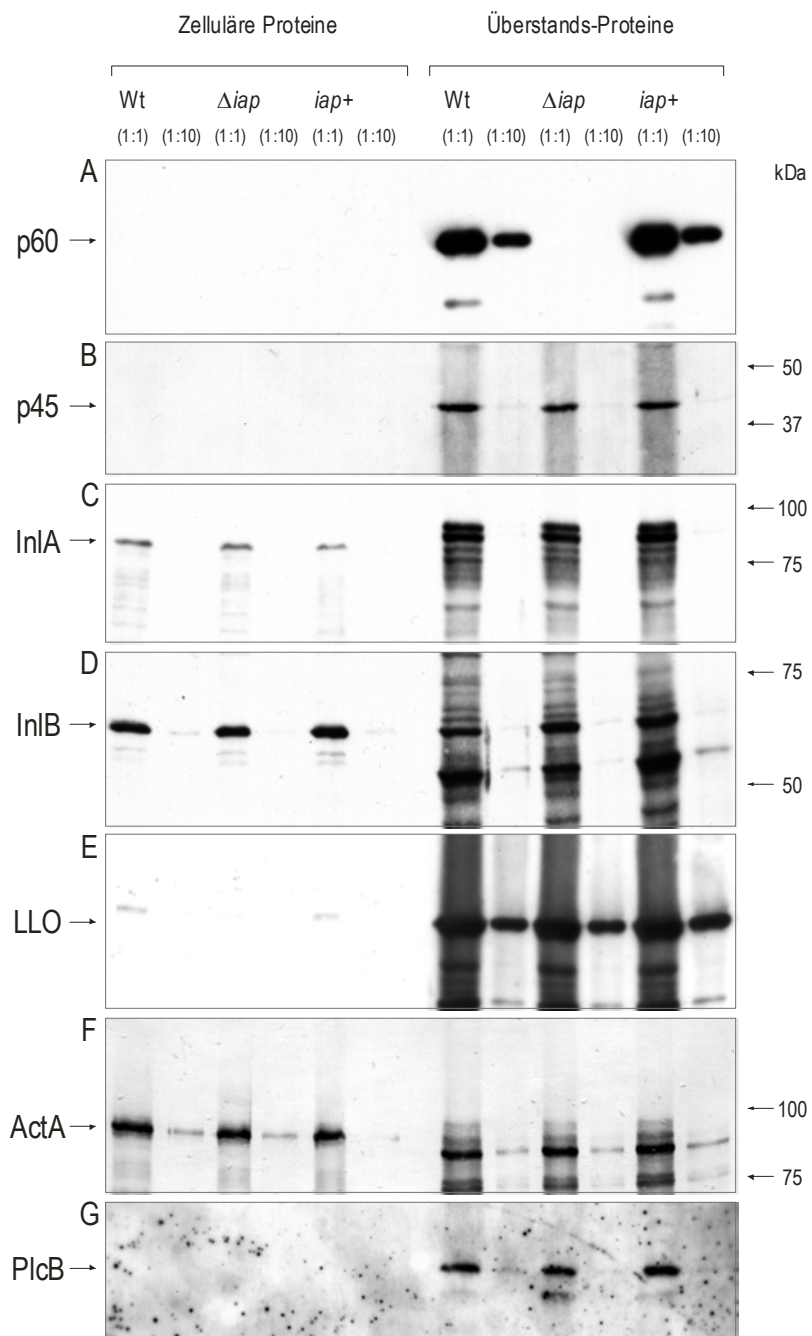


Abbildung 5.11: Western Blot Analyse von zellulären und Überstandsproteinen der Stämme Δiap und *iap+* sowie von wildtypischen *L. monocytogenes*. Verwendete Antikörper: (A) anti-p60 MAK K3A7, (B) anti-p45 MAK L2L2, (C) anti-InlA PAK (Kan.), (D) anti-InlB PAK (Kan.), (E) anti-LLO PAK (Kan.), (F) anti-ActA PAK (Kan.), (G) anti-PlcB PAK (Maus).

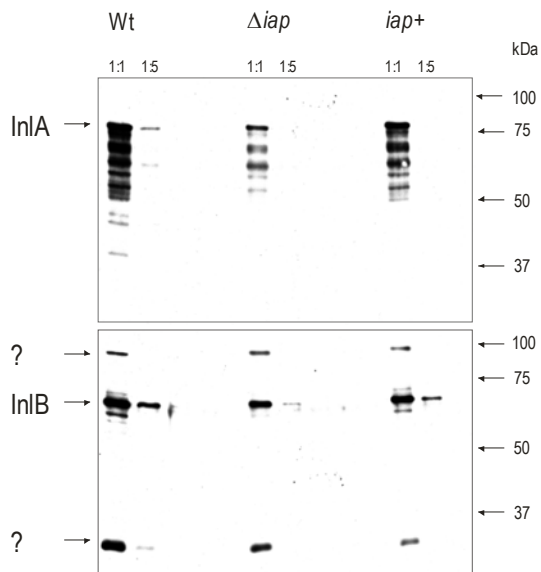


Abbildung 5.12: Western Blot Analyse von für 36 Stunden in BHI-Medium kultivierten *L. monocytogenes* Wt, Δiap und *iap+*. Zur Immunfärbung wurden ein anti-InlA PAK und ein anti-InlB PAK (beide vom Kan.) verwendet. Mit einem „?“ versehene Banden kennzeichnen mit anti-InlB-Antiserum kreuzreagierende Proteine (Internaline?).

Bemerkenswert war auch, dass in den Überstandsproteinen von Δiap nach Inkubation mit dem anti-PlcB-Antiserum eine zweite Bande detektiert werden konnte, welche sowohl beim Wildtyp als auch bei *iap+* vergleichsweise schwach vorhanden war (siehe Abb. 5.11). PlcB erscheint im Western Blot normalerweise als Doppel-Bande, wobei die größere Bande mit 33 kDa inaktives pro-PlcB repräsentiert. Dieses wird nach Prozessierung durch die Metalloprotease Mpl in seine aktive Form überführt, welche in der SDS-PAGE dann als ca. 29 kDa große Bande erscheint (Raveneau *et al.*, 1992). Zur Bestätigung dieses Befundes wurden Überstandsproteine vom Wildtyp und Δiap aus einer Übernachtskultur präpariert und erneut aufgetrennt, geblottet und mit dem anti-PlcB-Antiserum inkubiert (Abbildung 5.13 A). Während beide Stämme gleiche Mengen an pro-PlcB zu exprimieren schienen, konnte bei Δiap deutlich mehr prozessiertes PlcB als beim Wildtyp nachgewiesen werden.

In einem Lecithinase-Test mit Phosphatidylcholin (Lecithin) als Substrat konnte dieses Ergebnis ebenfalls bestätigt werden. Übernachtskulturen des Wildtyps und von Δiap wurden 1:100 in BHI-Medium verdünnt und bei 37°C inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Überstände aus diesen Kulturen zu einer Phosphatidylcholin-haltigen Substratlösung gegeben und bei 37°C inkubiert. Die Auswertung der Proben erfolgte durch die Messung der OD₅₁₀ nach 3 Tagen. Wie dem Diagramm in Abbildung 5.13 B zu entnehmen ist, erreichte Δiap mit zunehmender Kultivierungsdauer eine bis zu 50 % höhere Lecithinaseaktivität als der Wildtyp. Die Ursache für die Erhöhung der PlcB-Expression bzw. -Prozessierung konnte nicht geklärt werden. U.a. könnte auch die Metalloprotease Mpl eine Rolle bei diesem Phänomen spielen.

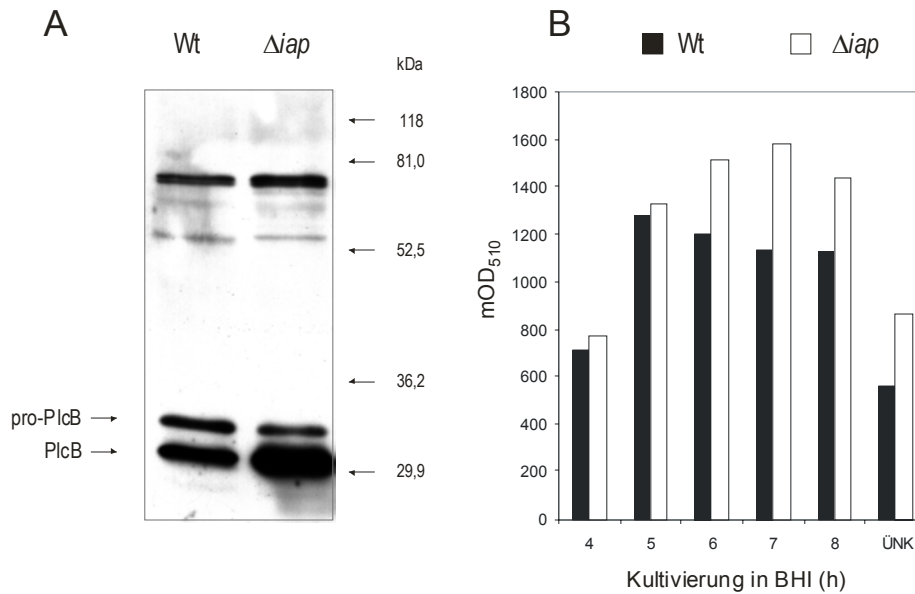


Abbildung 5.13: (A) Western Blot Analyse mit Überstandsproteinen von *L.m.* Wt und Δiap . Der Blot wurde mit einem murinen Antiserum, gerichtet gegen PlcB, immungefärbt. Pro-PlcB bezeichnet die nicht prozessierte Form von PlcB. (B) Lecithinase-Test mit Überständen von in BHI-Medium kultivierten Bakterien der Stämme *L.m.* Wt und Δiap .

5.1.1.8 Invasion und Adhärenz von Δiap in und an verschiedene Wirtszellen

Die Beteiligung von p60 an der Aufnahme von *L. monocytogenes* in nicht professionelle phagozytische Zellen wurde erstmals 1989 von Kuhn und Goebel beschrieben. Invasionsexperimente mit der embryonalen Mausfibroblasten-Zell-Linie 3T6 als Wirtszelle zeigten, dass die Raumutante RIII, welche p60 nur in geringen Mengen exprimiert und in langen Ketten aus an den Septen zusammenhängenden Einzelzellen wächst, im Vergleich zu wildtypischen Bakterien eine stark reduzierte Invasivität besitzt. Zugabe von teilweise gereinigtem p60 aus konzentriertem Wildtyp-Überstand ließ diese Ketten zerfallen und konnte die Invasivität dieser Raumutante erhöhen, während mit Ultraschall behandelte Bakterien zwar ebenfalls zu vergleichsweise kurzen Ketten zerfielen, aber nicht invasiver wurden als unbehandelte Raumutanten. Daher wurde das Gen für das p60 Protein als „invasion associated protein“, kurz *iap*, bezeichnet.

Spätere Invasionsexperimente mit der humanen Kolonkarzinom-Zell-Linie Caco-2 als Wirtszellen schienen diesen Ergebnissen teilweise zu widersprechen: Obwohl die Aufnahme der Raumutante RIII in diese Zellen stark reduziert im Vergleich zu wildtypischen Listerien war, konnte dieser Defekt sowohl durch Zugabe von p60 aus konzentriertem Wildtyp-Überstand als auch durch Beschallung der Raumutante komplett aufgehoben werden (Bubert *et al.*, 1992). Ein wichtiger Unsicherheitsfaktor bei diesen früheren Untersuchungen war allerdings die Tatsache, dass die so genannten Raumutanten teilweise p60 noch in geringen Mengen exprimierten und dass diese

Stämme wahrscheinlich nicht nur in der Expression von p60 beeinträchtigt waren, was in dieser Arbeit besonders deutlich durch die unterschiedlichen Morphologie von Δiap und RIII wurde (siehe 5.1.1.4).

Mit Hilfe des Stammes Δiap und der *in cis* komplementierten Revertante iap^+ sollte es möglich sein, die präzise Rolle von p60 bei der Invasion von *L. monocytogenes* in nicht professionelle phagozytische Zellen zu untersuchen. Anfangs wurde eine Serie von Invasions- und Adhärenz-Experimenten (Durchführung: siehe 4.7.5) mit unterschiedlichen Wirtszellen und solchen Bakterien durchgeführt, welche vor der Infektion für 36 Stunden in BHI-Medium kultiviert worden sind. Der Grund dafür war der vermutete intrazelluläre Zerfall der kurzen Ketten von Δiap und die damit einhergehende Verfälschung der Invasionsrate dieser Bakterien (siehe 5.1.1.6). Die Ergebnisse dieser Experimente sind in Tabelle 5.1 zusammengefasst.

	Bakterien - Charge	Δiap		iap^+	
		Invasion	Adhärenz	Invasion	Adhärenz
Caco-2	a	34 %	82 %	16 %	48 %
	b	39 %	186 %	17 %	192 %
	c	56 %	124 %	<u>75 %</u>	39 %
3T6	a	21 %	<i>n.b.</i>	<u>46 %</u>	<i>n.b.</i>
	b	53 %	<i>n.b.</i>	<u>84 %</u>	<i>n.b.</i>
	c	79 %	257 %	17 %	119 %
HBMEC	a	25 %	218 %	16 %	278 %
	b	16 %	328 %	10 %	219 %
Hep-G2	a	107 %	149 %	37 %	122 %
Hep-2	d	8 %	141 %	24 %	99 %
HeLa	d	20 %	<i>n. b.</i>	33 %	<i>n. b.</i>

Tabelle 5.1:

Invasion und Adhärenz verschiedener Bakterien-Chargen (für 36 Stunden kultiviert) der Stämme Δiap und iap^+ in und an verschiedene Wirtszell-Linien. Die Werte entsprechen der Invasions- bzw. Adhärenzrate in Relation zu wildtypischen Bakterien (Wt = 100 %).

Tendenziell konnte bei Verwendung dieser so genannten „36-Stunden-Kulturen“ eine Erhöhung der Adhärenz des Stammes Δiap an verschiedene Wirtszellen mit gleich-

zeitiger Erniedrigung der Invasionsrate beobachtet werden. Der revertierte Stamm iap^+ jedoch schien im Vergleich zu Δiap aber noch weniger invasiv bzw. adhärenz zu sein. Im Vergleich zum Wildtyp jedoch schwankten die Adhärenzraten stark, d. h., teilweise schien iap^+ weniger, teilweise gleich und teilweise auch mehr an die Wirtszellen zu adhärenzieren wie wildtypische Bakterien. Nur bei einigen Invasions-Experimenten mit 3T6 oder Caco-2 als Wirtszellen konnte eine höhere Invasionsrate von iap^+ im Vergleich zu Δiap gemessen werden (Tabelle 5.1, unterstrichen). Tatsächlich war es aber nicht möglich, diese reduzierte Invasivität von Δiap , welche bei dem Stamm iap^+ teilweise wiederhergestellt worden ist, mit der Ab- und Anwesenheit von p60 zu

korrelieren, da – wie in Kapitel 5.1.1.7 dargestellt – die Expression von InlA beim Stamm Δiap ebenfalls reduziert ist, während InlA von iap^+ wieder wildtypische Expressions-Level erreicht.

Warum bei dem meisten Invasionsexperimenten die Invasivität des Stammes iap^+ noch unter der von Δiap lag, kann allerdings nicht mit der schwankenden InlA Expression erklärt werden. Es schien also, dass zumindest der Stamm iap^+ noch über eine zusätzliche Mutation verfügt, die entweder durch die Deletionsmutagenese oder indirekt durch das Fehlen von p60 entstanden sein könnten.

Da die Expressionsstudien in Kapitel 5.1.1.6 ebenfalls gezeigt hatten, dass Kulturen der späten exponentiellen Phase (180 KE) von Δiap und iap^+ sowohl InlA als auch InlB in gleichem Maße wie der Wildtyp exprimierten, wurden die Invasions- und Adhärenz-Experimente (Durchführung der Infektionen: siehe 4.7.5) mit analog kultivierten Bakterien wiederholt. In einem Vorversuch wurden Bakterien des Stammes Δiap vor Infektion und nach Re-isolation aus dem Zytosol von Caco-2 Zellen mikroskopisch betrachtet. Bei diesen Wirtszellen konnte kein intrazellulärer Zerfall der kurzen Ketten von Δiap beobachtet werden.

Nach Infektion der Zell-Linien Caco-2 und 3T6 konnte bei Δiap ein nicht signifikanter aber tendenzieller Rückgang der Invasion auf ca. 70 % im Vergleich zum Wildtyp gemessen werden (Abbildung 5.14). Ebenso stieg die Invasionsrate von iap^+ in beide Zell-Linien zwar nicht signifikant aber tendenziell wieder an. Ähnlich wie bei den Adhärenz-Experimenten mit für 36 Stunden kultivierten Bakterien adhärierte Δiap viel stärker an Caco-2 und 3T6 Fibroblasten wie der Wildtyp oder iap^+ . Diese erhöhte Adhärenz könnte dabei in Zusammenhang mit der Länge einzelner Ketten von Δiap stehen. Δiap scheint also nicht in gleichem Ausmaß wie die Raumutante RIII in Zusammenhang mit der Internalisierung von Listerien in nicht professionelle phagozytische Zellen zu stehen.

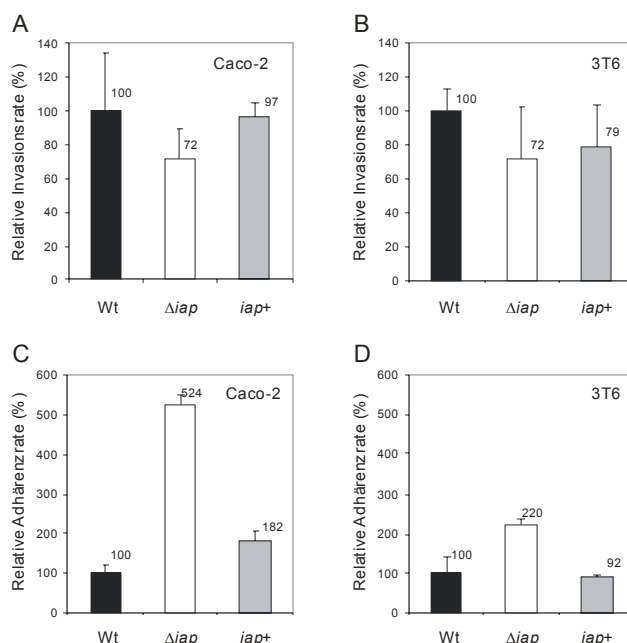


Abbildung 5.14: Invasions- (A, B) bzw. Adhärenzraten (C, D) von Δiap und iap^+ in Relation zum Wildtyp. Als Wirtszellen wurden Caco-2 (A, C) und 3T6 Fibroblasten (B, D) verwendet.

5.1.1.9 Infektion von BALB/c Mäusen mit Δiap

Listeria monocytogenes kann nach oraler Infektion der Maus die Darmbarriere ohne Eintritt in die Darmepithelzellen überschreiten und von dort aus über die Lymphe oder das Blut in Lymphknoten, Milz und Leber gelangen (Mackanness, 1962). Vermutlich werden die meisten Bakterien schon im Darm oder auch im Blutstrom von Makrophagen bzw. von Kupffer'schen Zellen bzw. Neutrophilen Granulozyten (Wing und Gregory, 2000) in der Leber phagozytiert, wodurch zunächst die Überzahl der Bakterien eliminiert wird. Dendritische Zellen werden als Vektoren zur Überschreitung der Darmbarriere diskutiert (Rescigno *et. al.*, 2001, Pron *et al.*, 2001). Einige Bakterien können jedoch ins Zytosol dieser verschiedenen Zellen entkommen, von diesen aus beginnt die Ausbreitung der Bakterien in Leber und Milz des infizierten Wirtes.

Das experimentelle murine Listeriose-Modell ist dazu geeignet, Virulenz-Attenuationen verschiedener *Listeria monocytogenes* Stämme zu evaluieren. Bei orogastrischer Infektion können 10^9 wildtypische Bakterien als sublethale Dosis appliziert werden, um den Verlauf der *Listeria*-Infektion in einem Zeitfenster von einer Woche zu monitoren. Die sublethale Dosis an wildtypischen Bakterien bei intravenöser Applikation beträgt dagegen 5×10^3 Bakterien. Ein bis 7 Tage nach Infektion lassen sich Listerien aus Leber, Milz und vereinzelt aus dem Gehirn der Tiere isolieren, während Zehn Tage nach Infektion normalerweise keine Bakterien in den Organen der infizierten Tiere mehr nachweisbar sind.

Zur Untersuchung einer möglichen Virulenz-Attenuation von Δiap wurden BALB/c Mäuse in Gruppen von jeweils 4-6 Tieren orogastrisch mit je 10^9 Bakterien der Stämme Δiap , iap^+ und des Wildtyps (für 36 Stunden in BHI kultiviert) infiziert. Drei, 4 und 5 Tage nach Infektion wurden die Bakterien aus Leber und Milz re-isoliert und die Bakterien pro Organ durch Ausplattieren geeigneter Verdünnungen ermittelt (Abbildung 5.15).

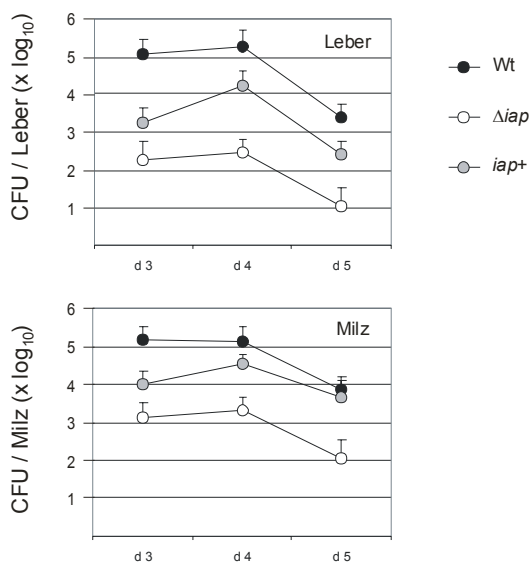


Abbildung 5.15: Virulenz-Attenuation von Δiap und iap^+ in Leber und Milz von BALB/c Mäusen nach p.o. Applikation von 10^9 Bakterien; 3, 4 und 5 Tage nach Infektion.

Während die Tiere, welche mit wildtypischen Bakterien infiziert worden waren, durch ihr krankes Erscheinungsbild (Gewichtsabnahme, ungepflegtes Fell) auffielen, schienen die Tiere, welchen Δiap appliziert worden war, im Allgemeinen gesund zu bleiben. Drei bzw. 4 Tage nach Infektion befanden sich in der Leber der mit Δiap infizierten Tiere ca. um 3 log Stufen reduzierte Bakterienzahlen im Vergleich zu den mit wildtypischen Bakterien infizierten Mäusen, in der Milz dieser Tiere waren die Bakterienzahlen dagegen nur um 2 log Stufen reduziert. Die Virulenz des Wildtyps konnte mit der Revertante iap^+ aber nicht erreicht werden: Im Vergleich zu Δiap stiegen die Bakterienzahlen in den Organen nicht auf Wildtyp-Niveau, sondern nur um ca. eine log Stufe an. Dieser Befund weist – ebenso wie die mit diesen Stämmen ausgeführten Invasions-Experimente (siehe 5.1.1.8) – auf eine sekundäre Mutation im Stamm iap^+ hin.

Zur Klärung der Frage, ob die Attenuation von Δiap von der orogastischen Applikation und der damit zusammenhängenden Infektionsroute der Listerien über den Darm des Wirtes beeinflusst wird, wurden BALB/c Mäuse in Gruppen von 5 Tieren i.v. mit einer sublethalen Dosis von $3,3 \times 10^3$ wildtypischen Bakterien bzw. $3,1 \times 10^3$ Bakterien der Δiap -Deletionsmutante infiziert. Nach 1, 3, 5 und 7 Tagen wurden die Bakterien aus Leber und Milz re-isoliert und deren Anzahl pro Organ bestimmt (Abbildung 5.16). Ca. 10^4 wildtypische Bakterien konnten zwischen 1 bis 5 Tagen nach Infektion in der Leber der infizierten Tiere nachgewiesen werden, während nur ca. 10^2 Δiap -Bakterien in diesen Organen gefunden wurden. In der Milz waren die Unterschiede nicht ganz so hoch, dort wurden durchschnittlich 10^5 wildtypische Bakterien in den ersten Tagen der Infektion gefunden im Gegensatz zu ca. 10^4 Bakterien des Stammes Δiap .

Somit scheint die Deletionsmutante Δiap nicht auf Grund einer verringerten Darmpassage in den Wirt attenuiert zu sein, sondern durch Ereignisse, die sich während der Infektion in den Organen des Wirtes abspielen.

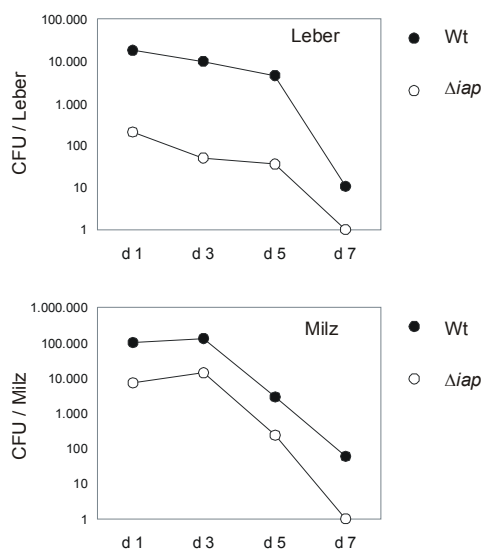


Abbildung 5.16: Virulenz-Attenuation von Δiap in Leber und Milz von BALB/c Mäusen nach i.v. Applikation von $3,3 \times 10^3$ wildtypischen Bakterien bzw. $3,1 \times 10^3$ Bakterien des Stammes Δiap ; 1-7 Tage nach Infektion.

5.1.1.10 Intra- und interzelluläre Motilität von *Δiap*

Interzelluläre Motilität:

Obwohl *Δiap* nach Infektion von BALB/c Mäusen hoch attenuiert zu sein scheint (siehe 5.1.1.9), besitzt dieser Stamm keinen besonders ausgeprägten Invasionsnachteil und vermehrt sich in den ersten 4-5 Stunden nach Infektion einer Zell-Linie im gleichen Ausmaß wie der Wildtyp. Daher wurde die Attenuation von *Δiap* in einem späteren Schritt des Infektionszyklus vermutet.

Einzelne Bakterien von *L. monocytogenes* werden normalerweise nach Erreichen des zytosolischen Kompartiments von einem Netz aus Aktin-Filamenten umgeben, welches sich nach einiger Zeit zu einem Aktinschweif formiert. Dieser Schweif bildet sich dabei gewöhnlich nur an einem Pol dieser stäbchenförmigen Bakterien. Das Zusammensetzen einzelner Aktin-Filamente am Bakterienpol dieses Aktinschweifes schiebt die Bakterien durch das Zytosol der Wirtszelle, wobei Protrusionen in benachbarte Zellen hinein gebildet werden. Durch die Phagozytose dieser Protrusionen von der Nachbarzelle und anschließender Freisetzung aus den dadurch gebildeten Doppelmembran-Phagosomen gelangen die Bakterien ins Zytosol der benachbarten Zellen, was zu ihrer Verbreitung im Zellrasen führt (zusammengefasst in Vazquez-Boland *et al.*, 2001).

Wildtypische sowie Bakterien des Stammes *Δiap* wurden mit dem Plasmid $P_{actA-gfp}$ (Dietrich *et al.*, 1998) transformiert, welches eine intrazelluläre Lokalisation von Bakterien in Echtzeit erlaubt. Das auf diesem Plasmid kodierte *gfp* steht dabei unter der Kontrolle des ActA-Promotors, welcher erst nach Eintritt ins Zytosol von Wirtszellen aktiv wird. Mit dieser Methode kann die interzelluläre Ausbreitung von *L. monocytogenes* in einem Zellrasen zu jedem Zeitpunkt einer Infektion dokumentiert werden.

Caco-2 Zellen wurden mit den beiden transformierten Stämmen infiziert, und der Verlauf der Infektion wurde über 48 Stunden mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskopes beobachtet. Normalerweise können sich wildtypische Listerien in dieser Epithelzell-Linie besonders schnell mit Hilfe von Aktinpolymerisation und Aktinschweifbildung ausbreiten, die *Δiap*-Deletionsmutante schien sich dagegen in kleinen Foci aus wenigen Zellen anzusammeln (Abbildung 5.17 A). Besonders deutlich war dies durch die starke Fluoreszenz dieser Foci zu sehen: Befinden sich nämlich sehr viele mit dem Plasmid $P_{actA-gfp}$ ausgestattete Bakterien in einer Zelle, so kann eine viel stärkere Fluoreszenz im Vergleich zu im Präparat verteilten Bakterien beobachtet werden.

Um die Ausbreitung von Listerien in der Leber während der Infektion eines Wirtstieres nachzustellen, wurde ein so genannter „Heterologer Plaque-Test“ (Greiffenberg *et al.*, 1998) durchgeführt: P388.D1 Makrophagen wurden mit einer MOI von 20 Bakterien ($Wt \times P_{actA-gfp}$ bzw. $\Deltaiap \times P_{actA-gfp}$) pro Zelle für eine Stunde infiziert, gewaschen und mit Gentamycin behandelt. Diese infizierten Zellen wurden dann in unterschiedlichen Verdünnungen auf einen Zellrasen der humanen Hepatozyten-Zell-Linie Hep-G2 gegeben und mit Gentamycin-haltiger Agarose

überschichtet. In den ersten 24 Stunden nach Infektion konnten diese Ansätze mit dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet werden. Anschließend wurde der Zellrasen mit einer zweiten Schicht aus Neutralrot-Agarose inkubiert, so dass Plaques aus während der Infektion zerstörten Zellen im Zellrasen sichtbar wurden.

24 Stunden nach Infektion konnten unter dem Fluoreszenzmikroskop wildtypische Bakterien sichtbar gemacht werden, welche größere Infektionsfoci im Zellrasen der infizierten Zellen gebildet hatten (Abbildung 5.17 B). Die Foci, welche Δiap in der gleichen Inkubationszeit gebildet hatte, waren sehr viel kleiner und umfassten maximal 2-5 Zellen pro Infektionsherd. Die reduzierte interzelluläre Motilität dieser Deletionsmutante konnte am deutlichsten mit der makroskopischer Auswertung der Infektionsherde durch Neutralrot demonstriert werden: Während wildtypische Bakterien, welche von den primär infizierten Makrophagen in den Hep-G2 Zellrasen eingewandert und sich dort ausgebreitet hatten, sichtbare Plaques im Zellrasen hinterlassen hatten, konnten makroskopisch im mit Δiap infizierten Zellrasen keinerlei Läsionen entdeckt werden (Abbildung 5.17 C).

L. monocytogenes Δiap scheint also eine stark herabgesetzte interzelluläre Motilität in verschiedenen Wirtszellen – ähnlich wie eine $\Delta actA$ -Deletionsmutante – zu besitzen.

Intrazelluläre Motilität:

Das Protein, welches bei der intra- und interzelluläre Motilität der Bakterien in Wirtszellen eine entscheidende Rolle spielt, ist das von der *Listeria* Pathogenitäts-Insel LIPI-1 kodierte Protein ActA. Durch ActA werden u.a. Aktinfilamente rekrutiert, welche die Bakterien nach Eintritt in ins Wirtszell-Zytosol umgeben, ebenso ist dieses Protein essentiell für die nachfolgende Aktinpolymerisation und Aktinschweifbildung (Domann *et al.*, 1992, Kocks *et al.*, 1992). ActA ist ein Oberflächenprotein von *L. monocytogenes*, welches polar auf der Oberfläche der Bakterienzellen, nämlich am so genannten alten Pol lokalisiert ist (Kocks *et al.*, 1993). Die polare Verteilung des Proteins ist dabei notwendig, damit sich nur am alten Pol des Bakteriums ein Aktinschweif bilden kann, welcher das Bakterium mit dem neuen Pol nach vorne durch die Zelle schiebt.

Die folgenden Untersuchungen konzentrierten sich auf die molekularen Ursachen der herabgesetzten interzellulären Motilität von Δiap . Um zu klären, ob Bakterien dieses Stammes zum einen Aktin polymerisieren können und zum anderen ActA polar innerhalb von Wirtszellen exprimieren, wurden Doppel-Immunfluoreszenz-Untersuchungen mit gleichzeitiger Markierung von ActA und Wirtszell-eigenem Aktin durchgeführt. Mit den Stämmen Δiap , *iap*⁺ sowie wildtypischen Bakterien wurden Caco-2 Zellen für eine Stunde infiziert. Sechs Stunden nach Infektion wurden die Zellen fixiert und mit einem Antiserum gerichtet gegen ActA (1:200

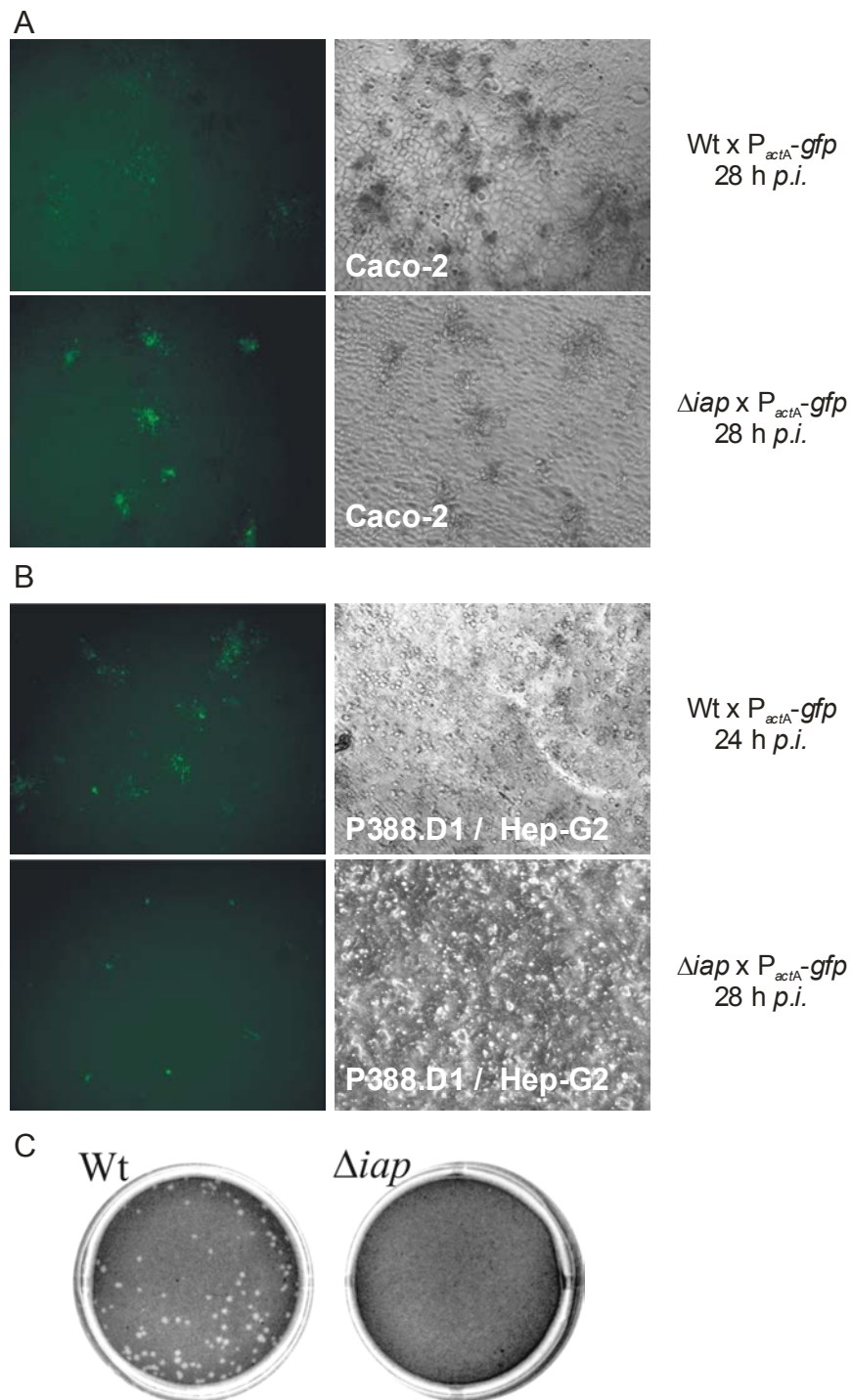
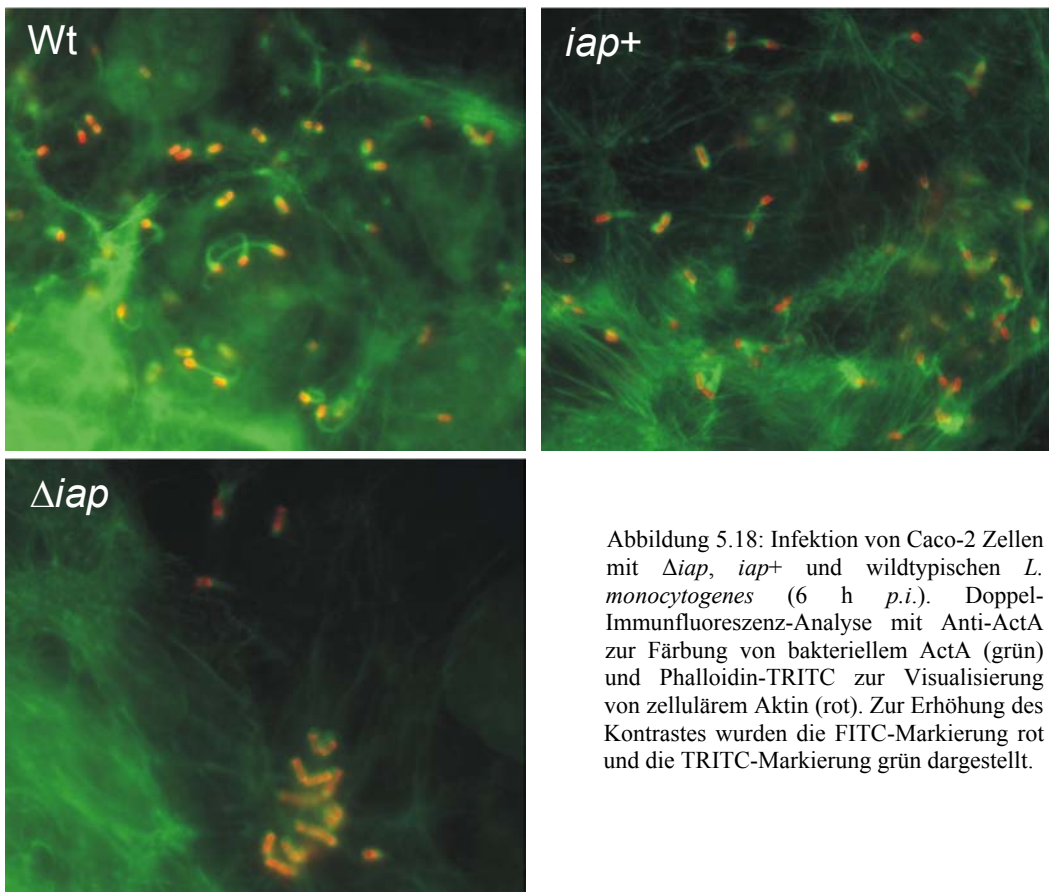


Abbildung 5.17: Interzelluläre Ausbreitung von Wt x P_{actA}-gfp und Δiap x P_{actA}-gfp in Caco-2 (A) und Hep-G2 (B, C) nach heterologem Transfer der Bakterien von P388.D1 Makrophagen als primär infizierte Zellen. Plaque-Test mit Neutralrot-Färbung, 3 d p.i. (C).

verdünnt) sowie einem FITC-gekoppeltem Anti-Kaninchen IgG (1:100 verdünnt) inkubiert. Im Anschluss daran wurde das zelluläre Aktin mit Phalloidin-TRITC (1:50 verdünnt) markiert und die Präparate mit einer Fluoreszenzkamera dokumentiert.

Intrazelluläre Bakterien des Wildtyps sowie des komplementierten Stammes *iap*⁺ konnten im Zytosol der Zellen verteilt beobachtet werden, während Bakterien des Stammes Δiap kleine intrazelluläre Mikrokolonien formten (Abbildung 5.18). Obwohl die Bakterien dieses Stammes von einem Saum aus Aktin umgeben waren, konnten nur in einigen wenigen Fällen Aktinschweife mit Bakterien kolokalisiert werden. Dieser kleine Bruchteil der intrazellulären Δiap Bakterien schien sich analog dem Wildtypen durch das Zytosol fortzubewegen. Wildtypische und *iap*⁺ Bakterien waren dagegen sehr häufig von einem Schweif aus polymerisiertem Aktin begleitet.

Allen drei Stämme exprimierten ActA, welches auf der Oberfläche der Bakterien nachgewiesen werden konnte (Abbildung 5.18, rote Markierung). Wildtypische Bakterien zeigten die erwartete polare Konzentration des Proteins an den alten Polen der Bakterienzellen. Bei Δiap konnte diese Verteilung nur sehr selten beobachtet werden, bei den meisten Bakterienzellen dagegen schien ActA gleichmäßig über die Oberfläche verteilt zu sein. Da Bakterien des komplementierten Stammes *iap*⁺ ebenfalls eine polare Verteilung des Proteins – vergleichbar mit der des Wildtyps – aufwiesen, konnte aus diesen Ergebnissen geschlussfolgert werden, dass p60 als ein in der Zellteilung involviertes Enzym mit der Verteilung von ActA auf der Oberfläche von intrazellulären Listerien eng in Zusammenhang steht. Die Ursache für den Mangel an intrazellulärer und interzellulärer Motilität der Δiap -Deletionsmutante schien daher die nicht-polare Verteilung von ActA auf der Oberfläche dieser Bakterien zu sein.



5.1.1.11 Lokalisation von ActA und p60 auf der bakteriellen Oberfläche

Lokalisation von ActA:

Anti-ActA-Markierungen von intrazellulären Bakterien der Δiap -Deletionsmutante zeigten eine uniforme Verteilung von ActA auf der Oberfläche dieser Bakterien, während wildtypische und Bakterien der Revertante iap^+ ActA am alten Pol konzentriert hatten (siehe 5.1.1.10). Zur Quantifizierung dieses Ergebnisses wurden Caco-2 Zellen erneut mit diesen drei Stämmen infiziert. Sechs Stunden nach Infektion wurden die Zellen fixiert und mit einem anti-ActA-Antiserum und einem FITC-gekoppelten Zweitantikörper inkubiert. Anschließend wurden pro Stamm 80 einzelne Bakterien aus dem Zytosol der Zellen mit einer Fluoreszenzkamera fotografiert. Während bei 93 % der wildtypischen und 95 % der iap^+ Bakterien ActA polar auf der Bakterienoberfläche lokalisiert war, konnten nur bei 5 % der Bakterien von Δiap eine polare Verteilung des Proteins beobachtet werden. Dieser niedrige Prozentsatz korrelierte dabei gut mit den wenigen intrazellulär beobachteten Bakterien von Δiap , welche sich im Zytosol fortbewegen konnten (siehe 5.1.1.10). Einzelne Beispiele dieser Aufnahmen wurden in Abbildung 5.19 zusammengestellt.

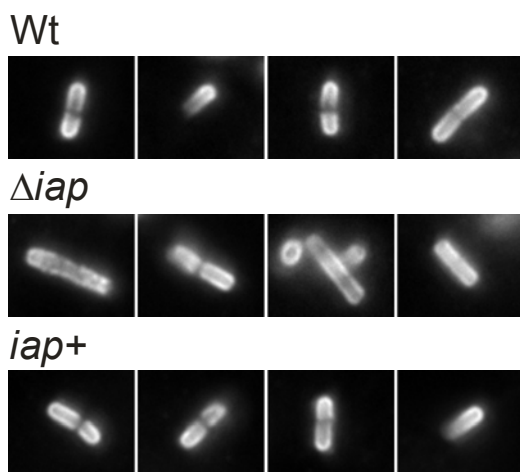


Abbildung 5.19: Anti-ActA-Färbung einzelner intrazellulärer Bakterien, 6 Stunden p.i.

Wie kommt diese gleichmäßige Verteilung von ActA auf der Oberfläche von Δiap zustande? Zur Klärung dieser Frage wurde die ActA-Verteilung von in BHI-Medium gezüchteten, extrazellulären Bakterien untersucht. Dazu wurden Δiap , iap^+ sowie wildtypische Bakterien bis zur späten exponentiellen Wachstumsphase kultiviert, gewaschen und auf Deckgläsern fixiert. Anschließend erfolgte eine Immunfärbung mit anti-ActA-Antiserum (1:50 verdünnt) und einem FITC-gekoppeltem Zweitantikörper (1:100 verdünnt), während die Nukleole der Bakterien mit einer DAPI-

Färbung sichtbar gemacht wurden. Dadurch war die Lage der Einzelzellen in den kurzen Ketten von Δiap deutlich sichtbar.

Wie in Abbildung 5.20 zu sehen ist, ist ActA bei extrazellulären Bakterien der späten exponentiellen Phase deutlich polar verteilt und konzentriert sich beim Wildtyp und beim komplementierten Stamm iap^+ auf die alten Pole der Bakterien. Bei Δiap sammelt sich ActA ebenfalls an den Polen der Einzelzellen der kurzen Ketten an. Daher kann angenommen werden, dass der Stamm Δiap keinen veränderten Verteilungsmechanismus für das ActA Protein besitzt,

sondern dass extrazellulär das ActA genauso auf der Bakterienzelle verteilt wird wie bei den wildtypischen Bakterien.

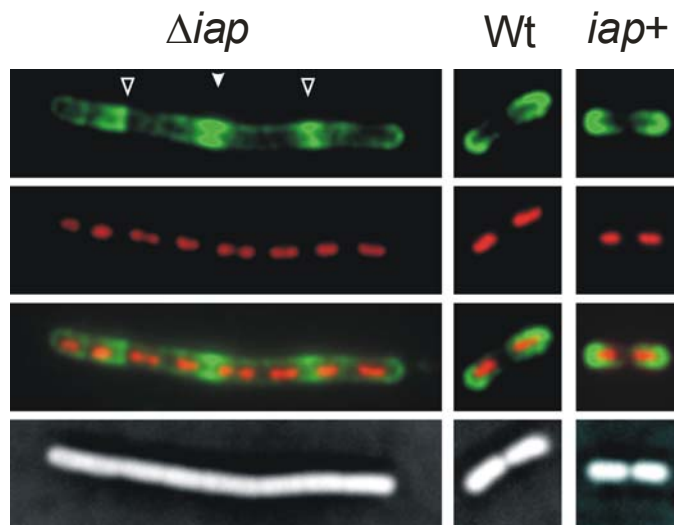


Abbildung 5.20: Immunfluoreszenz-Färbung von extrazellulären Bakterien der späten exponentiellen Phase. Anti-ActA-Färbung (grün), DAPI-Färbung (rot), Überlagerung beider Färbungen und Phasenkontrast-Aufnahme einer Bakterienzelle von Δiap , iap^+ sowie wildtypischen *L. monocytogenes*.

Lokalisation von p60:

Ruhland *et al.* dokumentierten 1993, dass p60 zu 75 % als zellfreies (sezerniertes) und zu 25 % als Zell-assoziiertes Protein auf der Oberfläche von *L. monocytogenes* nachgewiesen werden kann, wobei das Zell-assoziierte p60 gleichmäßig über die Oberfläche der Bakterien verteilt ist. Bei den damals durchgeführten Immuno-Gold-Färbungen wurde aber ein anti-p60-Antiserum verwendet, welches zusätzlich zu p60 ein weiteres, 110 kDa großes Protein von *L. monocytogenes* erkannte.

Besonders durch die Morphologie von Δiap als kurze Ketten aus an den Septen zusammenhängenden Einzelzellen wird aber deutlich, dass das als Mureinhydrolase beschriebene Protein p60 während der Zellteilung bevorzugt an den Septen angreifen und dort auch hauptsächlich lokalisiert werden müsste.

Das in Kapitel 5.1.1.5 beschriebene rekombinant hergestellte p60His wurde zur Immunisierung eines neuen, spezifischeren polyklonalen anti-p60-Antiserums verwendet. Dazu wurden zwei BALB/c Mäuse mit einer Mischung aus p60His und „ImmunEasy™ Mouse Adjuvant“ (Fa. QIAGEN) i.m. immunisiert, gefolgt von Auffrischungs-Immunisierungen („boost“) nach 4 bzw. 8 Wochen. Das Serum beider Tiere wurde vom Vollblut abgetrennt und zur Immuno-Gold-Markierung von wildtypischen Listerien sowie der Stämme Δiap und iap^+ als Kontrolle verwendet (Abbildung 5.21). Die Gold-Markierung einzelner Bakterien dieser Stämme zeigte tatsächlich ein andere p60-Lokalisation als von Ruhland *et al.* postuliert: Beim Wildtypen und bei iap^+ konzentrierten sich die Mehrheit der Goldpartikel an den Septen, welche die neuen Pole der Bakterien bilden. Auf der Oberfläche und den Septen des Stammes Δiap konnten nur sehr wenige Goldpartikel als Hintergrundfärbung beobachtet werden. P60 konnte mit dieser Methode nur dann

auf der Oberfläche von *L. monocytogenes* detektiert werden, wenn die Bakterien vor der Fixierung nicht gewaschen wurden. Dieser Effekt spricht gegen eine starke Bindung bzw. Affinität von p60 an die Oberfläche der Bakterien.

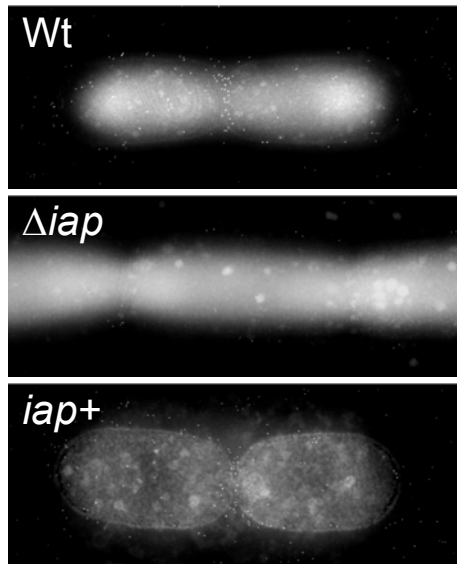


Abbildung 5.21: Immuno-Gold-Färbung von p60 auf der Oberfläche von *L. monocytogenes* Wt, Δiap und *iap+*.

5.1.1.12 Sekundäre Mutationen in Δiap oder *iap+* ?

Da sich die Deletion des Genes *iap* und damit auch komplette die Inaktivierung von p60 in früheren Arbeiten als undurchführbar herausgestellt hatte, wurde postuliert, dass p60 als Mureinhydrolase von *L. monocytogenes* essentiell für das Überleben dieses Organismus ist (Wuenschel *et al.*, 1993). Daher wurde spekuliert, dass die in dieser Arbeit erfolgreich durchgeführte komplette Inaktivierung von *iap* bzw. p60 möglicherweise nur durch eine zweite Mutation ermöglicht worden ist, welche die essentielle Funktion von p60 komplementieren würde. Die beschriebenen Funktionen von p60 sind zum einen die Enzymaktivität als Mureinhydrolase (Wuenschel *et al.*, 1993) und zum anderen eine mögliche Beteiligung bei der Invasion von eukaryotischen Zellen (Kuhn und Goebel, 1989, Hess *et al.*, 1995). Außerdem spielt p60 als eines der Haupt-Antigene eine Rolle bei der Immunantwort gegen diesen Organismus (Gentschev *et al.*, 1992, Pamer, 1994). Bei allen diesen Aufgaben scheint aber nur die Mureinhydrolase-Aktivität als essentielle Funktion des Proteins in Frage zu kommen.

Andere *L. monocytogenes* Hydrolasen:

Um sich einen Überblick über weitere Peptidoglykan-Hydrolasen von Δiap zu verschaffen, wurde ein Zymogramm mit dem Peptidoglykan von *L. monocytogenes* EGD als Substrat hergestellt. Zelluläre und Überstandsproteine von Δiap als auch von wildtypischen Bakterien wurden sowohl

in einfacher als auch in 5-facher Menge in einem denaturierenden, reduzierenden 12,5%-igem SDS-PAA-Gel aufgetrennt und in ein Zellgel geblottet, in dem sich inaktivierte *L. monocytogenes* Zellen befanden. Dieses Zellgel konnte nach 3-tägiger Inkubation bei 37°C ausgewertet werden (Abbildung 5.22).

In einfachen als auch im 5-fachen Überstand wildtypischer Listerien konnte jeweils eine Bande aus lysierten *L. monocytogenes* Zellen detektiert werden, welche das p60 Protein repräsentieren, da die korrespondierenden Banden bei Δiap fehlen. Zusätzlich konnte eine von den zellulären Proteinen abstammende Bande beobachtet werden, die bei beiden Stämmen mit gleicher Intensität erscheint. Schon McLaughlan *et al.* haben 1997 unbekannte *L. monocytogenes* Peptidoglykan-Hydrolasen beschrieben, welche ein größeres Molekulargewicht (104 kDa bzw. 186 kDa) als p60 besitzen und in einem Zellgel mit *L. monocytogenes* Peptidoglykan als Substrat erscheinen.

Mit dieser Methode konnten weder verstärkt exprimierte noch zusätzlich auftretende Hydrolasen von *L. monocytogenes* Δiap beobachtet werden.

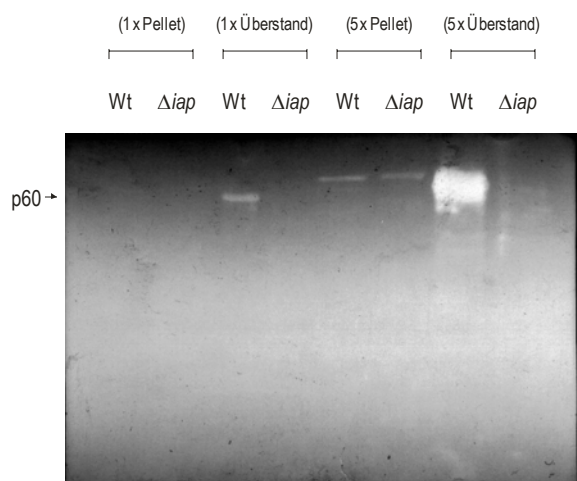


Abbildung 5.22: Zymogramm mit *L. monocytogenes* Zellen als Substrat. Zelluläre Proteine (Pellet) und Überstandsproteine von *L.m. Δiap* und Wildtyp (Wt) wurden mit SDS-PAGE (12,5%) aufgetrennt und in das Zymogramm geblottet.

Homologe Autolysine

P60 besitzt an seinem C-Terminus die sog. „NLP/p60 family“ Domäne (*pfam00877*, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cddsrv.cgi>), welche in verschiedenen Lipoproteinen, Phagenproteinen und Autolysinen konserviert ist. Der C-Terminus von p60 enthält außerdem in dieser Domäne einen einzigartigen Cysteinrest, welcher essentiell für die hydrolytische Aktivität des Proteins zu sein scheint (Wuenschel *et al.*, 1993). Daher wurde nach weiteren Proteinen mit Homologie zum C-Terminus von p60 im Genom von *L. monocytogenes* (*Listeria monocytogenes* genome sequencing project, 1998) gesucht, in der Annahme, ein Protein zu finden, das eine ähnliche Autolysin-Funktion wie p60 besitzt.

Insgesamt konnte zu einem Zeitpunkt, an dem zwar die Sequenz des *L. monocytogenes* Stammes EGD-e bekannt, aber noch nicht annotiert worden war (*Listeria monocytogenes* genome sequencing project), nur zwei Leserahmen gefunden werden, dessen mögliche Genprodukte eine starke Homologie zu p60 in ihrem C-Terminus aufweisen (Abbildung 5.23). Beide Leserahmen besitzen eine konservierte Domäne, welche den Cysteinrest von p60 mit einschließt. Das erste homologe Protein, später als p45 publiziert (Schubert *et al.*, 2000), besitzt außer diesem Cysteinrest ebenfalls keinen weiteren, während der zweite Leserahmen, später als Lmo0394 annotiert (*Listeria monocytogenes* genome sequencing project), noch zwei weitere Cysteine kodiert. Beide Proteine haben keine mit p60 vergleichbare „NT-repeat“ Region, dafür aber an ihrem C-Terminus die „NLP/p60 family“ Domäne, deren Funktion aber noch unbekannt ist.

p60	1	MNMKKAT IAA	TAGI AVTAF A	APT IASASTV	VVEAGDTLWG	IAQSKGTTVD	50
p45		~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	
Lmo0394		~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	
p60	51	AIKKANNLTT	DKIVPGQKLQ	VNNEVAAAEK	TEKSVSATWL	NVRSGAGVDN	100
p45		~~~~~	~~~~~	~~~~~MK	KNTFI AISLA	AVI SLT PAF.	TTNVFADVNT
Lmo0394		~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	
p60	101	SI ITS IKGGT	KVTVETTE SN	GWHKI TYNDG	KTGFVNGKYL	TDKAVST PVA	150
p45		DIQNQDKKIN	DIKSKKTDLQ	SDL SGLVADL	EKAQEKAKSL	QGEFDKT . . G	
Lmo0394		~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	
p60	151	PTQEVKKETT	TQQAAPAAET	KTEVKQT TQA	TTPAPKVAET	KE TPVVDQNA	200
p45		KELKKLNEDI	KSINER IKER	ETVLKERARA	MQKTSNSNAY	LEVILDAENL	
Lmo0394		~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	
p60	201	THAVKSGDT	I WALSVKYGV	SVQDIMS WNN	LSSSSI YVGO	KLAIKQTANT	250
p45		SDLVGRV SAV	NQLVDS DKSI	LE DQQNDEKA	LKT KQTAVKK	KQEDQATAIH	
Lmo0394		~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	
p60	251	ATPKAEVKTE	APAAEKQA . .	APVVKENTNT	NTATTEKKET	ATQQQTAPKA	300
p45		EYEAQQNKIE	AQKAEKEA IV	AQLAS DQA . .	. SAENAKAG . . .	LV SERD .	
Lmo0394		~~~~~ LN IIA	TRRK IFFAFI	ALMIS FS VLF	LPT TNA SAAT	TYKMTTADV	
p60	301	PTEAAKPAPA	P STNTNANKT	NTNTN TNNT	NNTNTNTP SK	NTNTNSNTNT	350
p45		. . KAAKEATA	RA . . TAL . RE	ATSSN VGOES	SSS DTSTP SK KSN TTK	
Lmo0394		NVRAADNTRK	KV . . IG FYKK	GT TVNFTAKT	KNNWYKTTYK GKVG YV	
p40	351	NTNSNTNANQ	GSSNNNSNSS	ASAI IAEAQK	HLGKAY SWGG	NGPTT FD CSG	400
p45		NVASNDNNSA	P SAATPSSGG	YSAMI SAANA	QLGKPY SLGA	TGPSA FD CSG	
Lmo0394		SGKCVTTYKA	PVAT TQS . .	FTALNNEARK	HIGKRYKIGA	TGPSC FD CSG	
p60	401	YTKYVFAK . A	GISLPR TSGA	QYASTRISE	SQAKPGDLVF	FDYGS GISHV	450
p45		FTSYAF . RAA	GVSLPR TSGG	QYAAA SKISA	SQAKPGDLVF	FNYGS GIAHV	
Lmo0394		YTQYVYSGKV	KKSI PR TAKQ	QYASAKK IKA	KELKKGDLIF	FNYGKGV AHV	
p60	451	GI YVGNQMI	NAQDNGVKYD	NIHGS GWGKY	LVGFGRV* ~ ~	~ ~	492
p45		GI YVGGQMI	NAQNGVKYD	NI TSGY WAKY	LVGYGRVANF	* ~	
Lmo0394		GI YVGNKML	NAQNGVKYD	TI TSGY WKKY	IAGYGRVANL	K*	

Abbildung 5.23: Sequenzvergleich der zu p60 homologen *L. monocytogenes* Proteine p45 und Lmo0394. Gleiche Aminosäuren zu p60 als Referenzsequenz sind grau unterlegt. Der mit der Hydrolase Funktion assoziierte einzigartige Cysteinrest ist zusätzlich markiert.

Expression der homologen Autolysine in Δiap

Die Transkription bzw. Expression der Leserahmen von p45 (kodiert vom Gen *spl*) und Lmo0394 von Δiap wurde mit denen des Wildtyps verglichen, um eine mögliche, die Mureinhydrolase-Funktion von p60 komplementierende Mutation in diesen Genen zu untersuchen. In den Sequenzen

beider Leserahmen konnte nach Sequenzierung keinerlei Unterschiede von Δiap zum Wildtyp festgestellt werden. Daher wurde die Transkription beider Gene mit semiquantitativer RT-PCR untersucht. Die Detektion spezifischer cDNA erfolgte dabei mit den Oligonukleotid-Paaren *iap*RNA-for / *iap*-RNA-rev (*iap*), *iap*76-for / *iap*76-rev (*spl*), *iap*84-for / *iap*84-rev (Lmo0394) sowie Sod-N / Sod-C (*sod*) als Kontrolle. RNA der Stämme Δiap , RIII und des Wildtyps wurden mit den reversen Oligonukleotiden dieser Paare in cDNA umgeschrieben und geometrische Verdünnungsreihen dieser cDNAs dienten als Matrize in einer PCR-Reaktion, wobei wiederum oben beschriebene Oligonukleotid-Paare zur Amplifikation eingesetzt worden sind. Als Kalibrierungs-Standard wurde die cDNA des „housekeeping“-Genes *sod* verwendet und alle anderen cDNAs wurden auf diesen Standard bezogen. Da die DNA-Banden der PCR-Produkte in den Agarose-Gelen nicht korrekt mit der Kamera (auf Grund fehlender Empfindlichkeit des Gerätes) festgehalten werden konnten, wurden in einer schematischen Darstellung alle mit dem Auge erkennbaren PCR-Produkte eingezeichnet (Abbildung 5.24).

Wt	Verdünnung der cDNA:	2^{-6}	2^{-7}	2^{-8}	2^{-9}	2^{-10}	2^{-11}	2^{-12}	2^{-13}
	<i>sod</i>	—	—	—	—	—	—	—	
	<i>iap</i>	—	—	—	—	—	—	—	
	<i>spl</i>	—	—	—	—				
	Lmo0394	—	—	—	—				

Δiap	Verdünnung der cDNA:	2^{-7}	2^{-8}	2^{-9}	2^{-10}	2^{-11}	2^{-12}	2^{-13}	2^{-14}
	<i>sod</i>	—	—	—	—	—	—	—	
	<i>iap</i>								
	<i>spl</i>	—	—	—					
	Lmo0394	—	—	—	—				

R III	Verdünnung der cDNA:	2^{-11}	2^{-12}	2^{-13}	2^{-14}	2^{-15}	2^{-16}	2^{-17}	2^{-18}
	<i>sod</i>	—	—	—	—	—	—	—	
	<i>iap</i>	—	—	—	—	—	—	—	
	<i>spl</i>	—	—						
	Lmo0394	—	—	—	—				

Abbildung 5.24: Reverse Transkriptions-PCR mit geometrisch verdünnter cDNA der Stämme Δiap , RIII sowie des Wildtyps zur Quantifizierung der RNA von *iap*, *spl*, Lmo0394 sowie *sod* als Standard.

Gemessen an den PCR-Produkten der *sod*-cDNA konnten zwischen den getesteten Stämmen keine Unterschiede bezüglich der cDNA Menge von Lmo0394 entdeckt werden. Die um den Faktor 2 bei Δiap und um den Faktor 4 bei RIII abweichende Mengen an *spl* cDNA sind wahrscheinlich zu gering, um signifikant zu sein und können wahrscheinlich auf Unregelmäßigkeiten während der Versuchsdurchführung zurückgeführt werden. Zusätzlich konnte das von Wuenscher *et al.*, 1993

erhaltene Ergebnis, dass die Raumutante RIII gleiche Mengen *iap* RNA wie wildtypische Bakterien transkribiert, nochmals bestätigt werden.

Von F. Fiedler aus München konnte außerdem der gegen das Protein p45 gerichtete, monoklonale Antikörper L2L2 (Schubert *et al.*, 2000) erhalten werden. In einer Western Blot Analyse (Abbildung 5.11) wurden Überstandsproteine des Wildtyps, von Δiap und von dem *in cis* komplementierten Stamm *iap*⁺ mit diesem Antikörper immungefärbt (siehe 5.1.1.7). Dabei schien die Expression von p45 in allen drei Stämmen quantitativ gleich zu sein.

Somit konnte bei keinem der über Homologie zu p60 gefundenen, putativen Autolysine von *L. monocytogenes* eine erhöhte Transkription bzw. Expression im Stamm Δiap nachgewiesen werden.

In Nachbarschaft zu *iap* gelegene Gene

Nicht nur putative Hydrolasen bzw. Autolysine können Kandidaten für mögliche sekundäre Mutationen im Stamm Δiap sein, sondern auch durch die Deletionsmutagenese beeinflusste chromosomale Regionen. Hier kommen bevorzugt die in Nachbarschaft zum *iap*-Deletions-Locus gelegenen Regionen in Frage. Während stromabwärts von *iap* ein unbekanntes Protein mit Homologie zu Methyltransferasen kodiert wird (Lmo0581), liegt stromaufwärts ein in Gegenrichtung kodiertes Gen (Lmo0583), welches erst kürzlich als *secA2* bezeichnet worden ist (Lenz und Portnoy, 2002). Die Promotor-Regionen beider Proteine grenzen sehr eng an den *iap*-Deletions-Locus und könnten durch die Deletionsmutagenese zerstört worden sein (Abbildung 5.25).

Mit Hilfe von reverser Transkriptions-PCR konnte cDNA und somit die Transkription beider Gene erfolgreich in Δiap als auch in *iap*⁺ nachgewiesen werden.

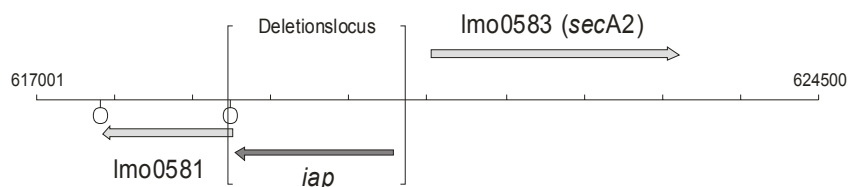


Abbildung 5.25: Schematische Darstellung der in Δiap deletierten Region und der benachbarten Leserahmen Lmo0581 bzw. Lmo0583.

5.1.1.13 Reproduzierbarkeit der Deletion von *iap* durch Herstellung weiterer Deletionsmutanten

Wie in den vorangegangenen Kapiteln ausführlich beschrieben worden ist, führt die Deletion von *iap* u.a. zu einer hochgradigen Virulenz-Attenuierung im experimentellen murinen Listeriose-Modell (5.1.1.9) sowie *in vitro* zu einer leicht verminderten Invasivität bei der Infektion

verschiedener Wirtszellen (5.1.1.8). Der *in cis* komplementierte Stamm *iap+* jedoch kann zwar wieder wildtypische Mengen an p60 Protein exprimieren, verhält sich aber ansonsten sehr unterschiedlich im Vergleich zu wildtypischen Listerien. Zum einen liegt seine *in vivo* Virulenz – gemessen an Bakterienzahlen in verschiedenen befallenen Organen – um eine log-Stufe tiefer als die des Wildtyps und zum anderen kann er auch die Invasivität des Wildtyps in verschiedene Wirtszellen nicht völlig erreichen (siehe Tabelle 5.1).

Aus diesen Gründen wurde angenommen, dass entweder während der Deletionsmutagenese zur Herstellung von Δiap oder bei der Komplementierung von Δiap zu *iap+* eine sekundäre Mutation aufgetreten ist, welche die Ursache für den abweichenden Phänotyp von *iap+* sein könnte. Dabei ist nicht klar, ob diese mögliche Mutation schon in Δiap vorhanden ist. In diesem Fall könnten beide Ergebnisse, nämlich die Virulenz-Attenuierung sowie die verminderte Invasivität, nicht ausschließlich auf die Deletion von *iap* zurückgeführt werden.

Die hypothetische Mutation in Δiap und/oder *iap+* kann dabei ungerichtet oder gerichtet aufgetreten sein, denn evtl. ist die Deletion von *iap* nur in Verbindung mit einer zweiten Mutation möglich (siehe Kapitel 5.1.1.12). Diese kann entweder indirekt durch die Inaktivierung von p60 stattfinden oder zur Komplementation von p60 dienen. Nur durch eine mehrmalige Wiederholung der *iap*-Deletionsmutagenese sowie der *iap*-Komplementierung lässt sich die Natur dieser sekundären Mutation aufklären.

Als Ausgangsstamm für die Konstruktion weiterer *iap*-Deletionsmutanten wurde diesmal *L. monocytogenes* EGD-e gewählt. Unabhängig voneinander wurden zwei Deletionsmutagenesen mit dem *iap*-Mutagenese-Plasmid pLSV-C2+D exakt nach der in Kapitel 5.1.1.1 beschriebenen Vorgehensweise durchgeführt. Ebenso wurde mit der nachfolgenden *in cis* Komplementation dieser Stämme verfahren: Zuerst wurde ein defektes *iap* Gen mit Hilfe des Plasmides pLSV-C2*iap*D ins Chromosom inseriert und anschließend mit dem Plasmid pLSV-repair zu einem kompletten *iap* Gen ergänzt. Mit einer Western Blot Analyse konnte sowohl die totale Abwesenheit des p60 Proteins bei den neuen Deletionsmutanten Δiap II und Δiap III als auch die komplett wiederhergestellte p60-Expression der daraus hergestellten Revertanten (*iap+* II und *iap+* III) nachgewiesen werden. In Tabelle 5.2 befindet sich eine Übersicht über alle konstruierten Stämme:

Bezeichnung	Mutante	Ausgangsstamm
WL-120	Δiap I	<i>L.m.</i> EGD
WL-122	<i>iap+</i> I	Δiap I
	Δiap II	<i>L.m.</i> EGD-e
	<i>iap+</i> II	Δiap II
	Δiap III	<i>L.m.</i> EGD-e
	<i>iap+</i> III	Δiap III

Tabelle 5.2:
Übersicht über alle Δiap -Deletionsmutanten bzw. -Revertanten.

Vergleichende Charakterisierung aller Stämme

Alle drei unabhängig konstruierten Δiap -Deletionsmutanten sowie alle drei iap^+ Revertanten wurden zunächst morphologisch miteinander verglichen. Dabei ergab die lichtmikroskopische Auswertung, dass die zwei neuen Δiap Stämme (Δiap II, Δiap III) kurze Ketten mit vergleichbarer Länge zur ersten Deletionsmutante bilden und dass die korrespondierenden Revertanten (iap^+ II, iap^+ III) wieder als Einzelzellen wachsen.

Anschließend wurden alle Stämme auf ihre interzelluläre Verbreitung und ActA-Verteilung hin untersucht, indem analog der in Kapitel 5.1.1.10 beschriebenen Vorgehensweise Caco-2 Zellen für sechs Stunden infiziert worden sind, gefolgt von einer kombinierten anti-ActA-/ Phalloidin-färbung der intrazellulären Bakterien. Die Auswertung der Fluoreszenzanalyse ergab, dass alle neu konstruierten Δiap -Mutanten den gleichen Phänotyp hatten: Auf Grund einer nicht polaren intrazellulären ActA-Lokalisation waren diese Bakterien nicht mehr dazu in der Lage, sich mit Schweifen aus polymerisiertem Actin durch die primär infizierte Zelle und in Nachbarzellen hinein zu bewegen, während annähernd alle neuen intrazellulären iap^+ Revertanten ActA polar auf ihrer Oberfläche verteilt hatten und dadurch vergleichbar mit wildtypischen Bakterien zur intra- und interzellulären Motilität fähig waren.

Zudem wurde auch die Fähigkeit aller Mutanten untersucht, an Caco-2 und 3T6 Fibroblasten zu adhären und in diese zu invadieren. Diese Experimente wurden exakt wie die in Kapitel 5.1.1.8 beschriebenen durchgeführt. In Abbildung 5.26 sind die Adhärenz- bzw. Invasionsraten aller Mutanten-Stämme in Relation zum korrespondierenden Wildtyp dargestellt, wobei Wt I *L. monocytogenes* EGD und Wt II den Stamm EGD-e bezeichnet. Alle drei iap -Deletionsmutanten adhären an beide Zell-Linien viel stärker als wildtypische Bakterien, während die Adhärenzrate bei den iap^+ Stämmen tendenziell wieder auf Wildtyp-Niveau abfiel.

Bei der Analyse der Invasionsfähigkeit aller drei Δiap -Mutanten kam kein übereinstimmendes Ergebnis zustande: Während die Invasivität von Δiap I in Vergleich zum Wildtyp leicht vermindert war, so stieg sie bei den von EGD-e abstammenden Mutanten Δiap II und Δiap III unter Verwendung von Caco-2 Zellen um das doppelte und unter Verwendung von 3T6 Fibroblasten sogar auf das 4-fache an. Die korrespondierenden Revertanten waren dagegen wieder ebenso invasiv in Caco-2 Zellen wie die wildtypischen Bakterien, in 3T6 Zellen dagegen sanken die Invasionsraten zwar im Vergleich zu den Δiap Stämmen ab, iap^+ II und iap^+ III erreichten aber nicht die etwas niedriger gelegenen Invasionsraten der beiden Wildtypen.

Zusammenfassend scheint also die Abwesenheit von p60 zwar eine höhere Adhärenz der Bakterien an die Wirtszellen zu bewirken, aber dem p60 Protein kann generell keine direkte eindeutige Beteiligung an der Invasion von *L. monocytogenes* in Wirtszellen zugeschrieben werden. P60 scheint eher einen Einfluss auf vorhandene, direkt in die Invasion involvierte Proteine wie z.B. Internalin A oder Internalin B zu haben, die evtl. bei beiden Wildtyp-Stämmen in

unterschiedlicher Menge exprimiert werden. Damit könnte die stark unterschiedliche Invasivität von Δiap I zu Δiap II und Δiap III erklärt werden, wobei letztere beide von demselben Wildtyp abstammen und auch untereinander vergleichbar mit den Wirtszellen interagierten.

Sowohl die kurz-kettige Morphologie von Δiap als auch die intrazelluläre nicht polare ActA-Verteilung und somit die verringerte Motilität der Bakterien können reproduzierbar mit der Deletion von *iap* assoziiert werden.

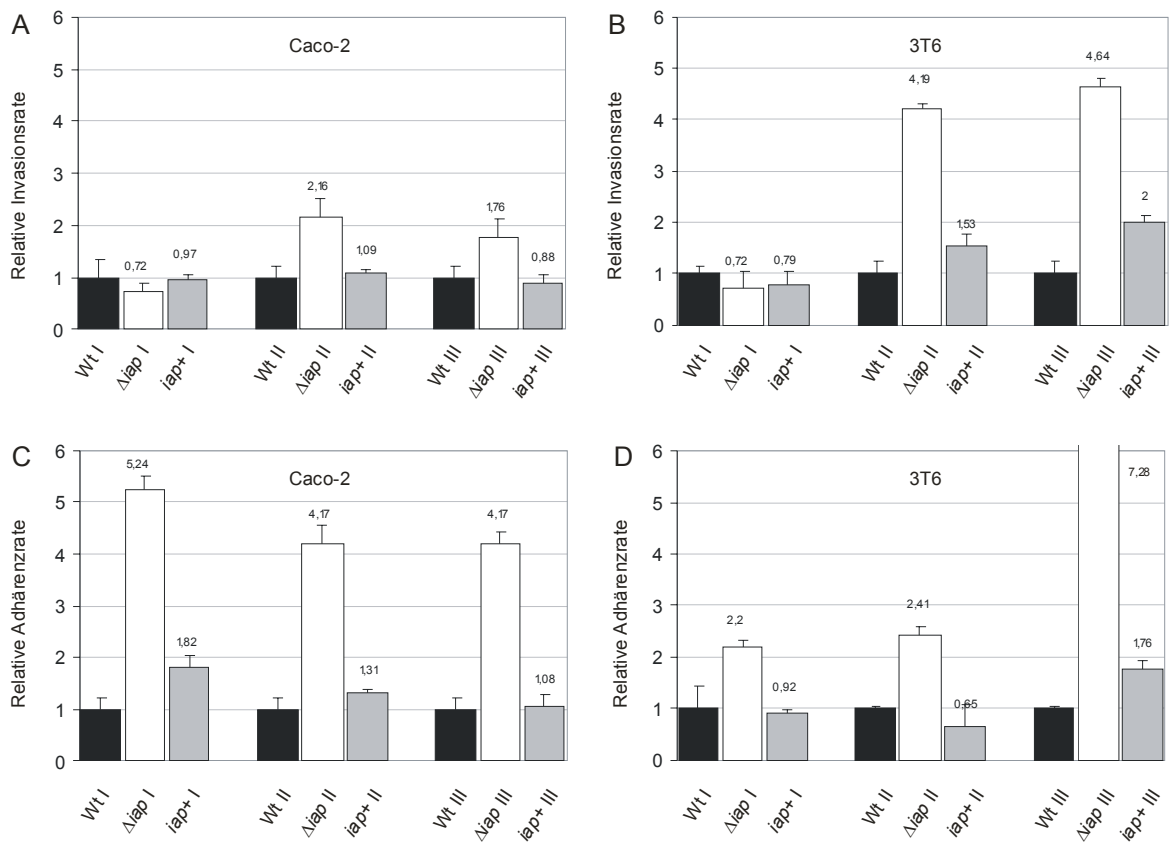


Abbildung 5.26: Invasivität und Adhärenz aller Δiap und *iap*+ Stämme in und an (A,C) Caco-2 bzw. (B;D) 3T6-Fibroblasten. Die Adhärenz- und Invasionsraten wurden relativ zum jeweiligen Wildtyp (WtI=EGD, WtII=EGD-e) kalkuliert.

5.1.1.14 Analyse von Δiap und *iap*+ mit 2D-Gel-Elektrophorese

In allen vorangegangenen Experimenten konnte weder in den verschiedenen Δiap Mutanten noch in den dazugehörigen Revertanten eine sekundäre Mutation gefunden werden, welche aber auf Grund einiger Unterschiede der Revertanten zu den wildtypischen Bakterien vorhanden sein müsste (siehe 5.1.1.12 und 5.1.1.13). Daher wurde des Proteom aller Stämme (siehe Tabelle 5.2) einer 2D-Gel-Analyse unterzogen. Zelluläre Proteine wurden zunächst in IPG-Strips mit einem Gradienten von pH 3-10 aufgetrennt, anschließend in der zweiten Dimension mit SDS-PAGE in

10%-igen Gelen weiter separiert und mit einer Silber-Färbung auf dem zweidimensionalen Gel sichtbar gemacht. Anschließend wurde nach Protein-Spots Ausschau gehalten, die sich entweder in allen drei Δiap -Deletionsmutanten oder in allen drei iap^+ Revertanten signifikant zu den korrespondierenden Protein-Spots der zwei wildtypischen Stämme verändert hatten.

Obwohl teilweise gleiche Protein-Spots der verschiedenen Stämme mit höherer oder niedriger Intensität beobachtet worden sind, konnte bei dieser Art von Gradienten keine übereinstimmenden Verschiebungen in den Intensitäten einzelner Proteine gefunden werden. Das p60 Protein konnte im Übrigen in diesen Gelen nicht lokalisiert werden.

Daraufhin wurden sowohl Überstandsproteine als auch zelluläre Proteine in IPG-Strips mit einem Gradienten von pH 4-7 aufgetrennt, wodurch in diesem Bereich mehr Proteine sichtbar gemacht werden können. Nach Analyse der Überstandsproteine konnten wiederum keine signifikanten Veränderungen in den Intensitäten aller zusammengehörigen Protein-Spots einer Bakterien-Variante (Δiap oder iap^+) detektiert werden. Sehr auffällig waren allerdings große Unterschiede im gesamten Expressionsprofil der Überstandsproteine beider Wildtyp-Stämme (EGD bzw. EGD-e), was wiederum den unterschiedlichen Phänotyp der von EGD vs. EGD-e abstammenden Δiap -Mutanten erklären könnte (siehe 5.1.1.13).

Die 2D-Gel-Analyse der zellulären Proteine ergab dagegen folgendes Ergebnis: Beide wildtypischen Stämme besaßen zwei eng nebeneinander liegende Protein-Spots (Abbildung 5.27), welche anscheinend das gleiche Molekulargewicht hatten und sich nur in ihrem isoelektrischen Punkt voneinander etwas unterschieden. Daher wurde angenommen, dass es sich um zwei Modifikationen ein und desselben Protein handelte. Die Stämme Δiap I und iap^+ I exprimierten beide den Spot mit dem niedrigeren isoelektrischen Punkt nicht (Abb. 5.27, roter Kreis), während der Spot mit dem höheren isoelektrischen Punkt bei Δiap II, Δiap III, iap^+ II und iap^+ III nicht mehr zu erkennen war (Abb. 5.27, grüner Kreis).

Nach MALDI-TOF Analyse beider Spots, durchgeführt von A. Bosserhoff am ZMBH der Universität Heidelberg, stellte sich aber heraus, dass beide Spots jeweils ein anderes Protein repräsentierten. Spot Nr.1 korrespondierte mit dem als Lmo0613 annotierten Protein (*Listeria monocytogenes* genome sequencing project), einer putativen Oxidoreduktase, und Spot Nr. 2 wurde als Lmo0210 (*ldh*) identifiziert, welches eine (von insgesamt vier) Lactat-Dehydrogenasen kodiert.

Alle diese veränderten Expressionen von einzelnen Proteinen umfassten dabei immer sowohl die jeweilige Δiap -Mutante als auch die dazugehörige Revertante, außerdem war die Mutation bei Δiap II und Δiap III – trotz unabhängig voneinander durchgeführter Konstruktion - identisch, so dass ein direkter Zusammenhang zwischen der Abwesenheit von p60 und dieser gerichteten Mutation hergestellt werden kann. Warum gerade diese Proteine inaktiviert worden sind, konnte nicht weiter geklärt werden.

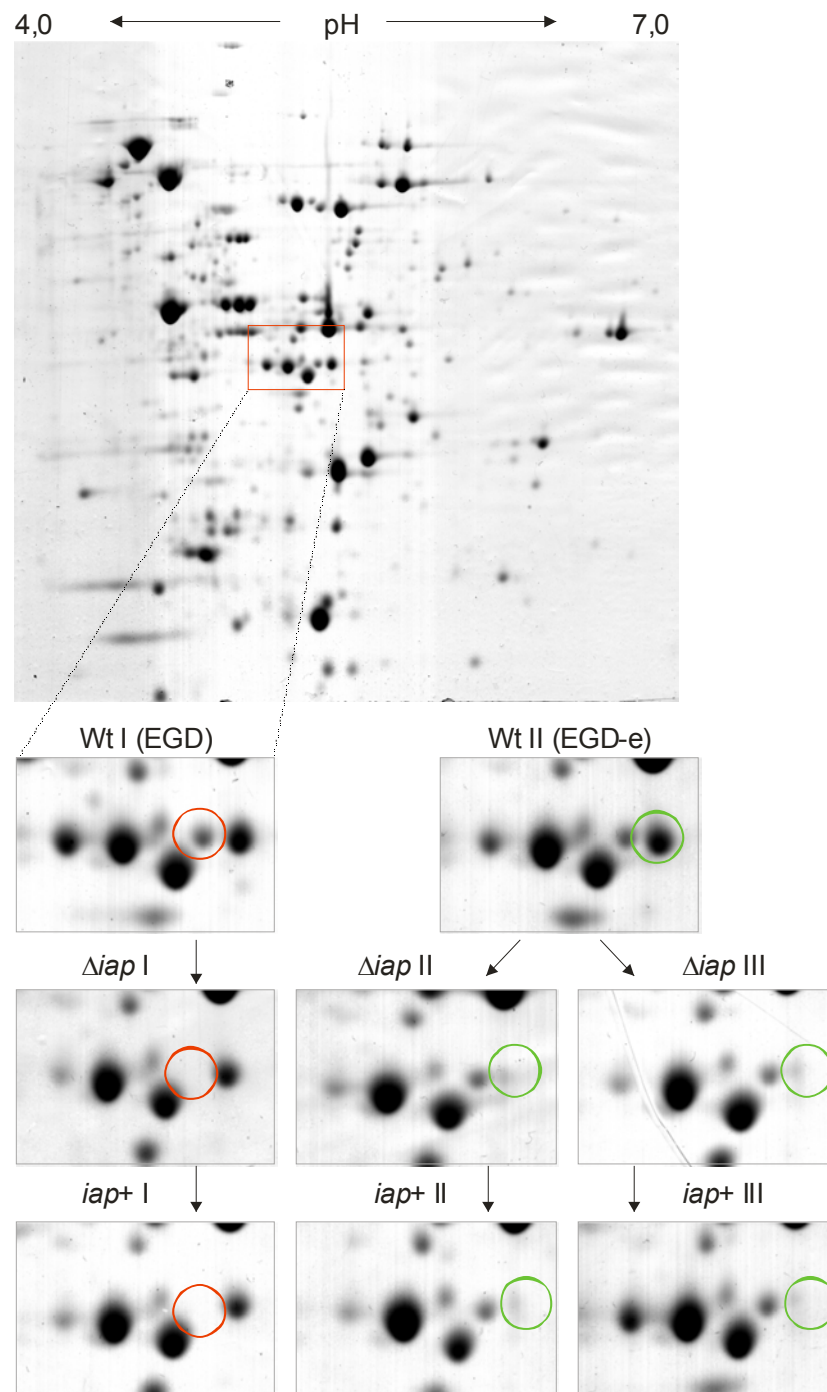


Abbildung 5.27: Ausschnitte der 2D-Gel-Analysen zellulärer Proteinen der Stämme *L.m.* EGD, EGD-e, Δiap I-III und *iap*⁺ I-III. In der Gesamtdarstellung ist das Proteom von *L.m.* EGD bei einem pH-Gradienten von 4-7 in einem 10%-igen SDS-Polyacrylamid-Gel dargestellt. Die Kreise kennzeichnen die bei den Mutanten fehlenden Protein-Spots.

5.2 Untersuchungen zum Gentransfer mit *Listeria monocytogenes* als Vektor

Im zweiten Teil dieser Arbeit wird ein auf *Listeria monocytogenes* basierendes Gentransfer-System („DNA delivery“ System) beschrieben. Dazu wurde ein Plasmid-kodiertes Gen, welches ein Modellprotein kodiert und unter der Kontrolle eines eukaryotischen Promotors steht, mit Hilfe eines *L. monocytogenes* Stammes in das Zytosol einer Wirtszelle eingeschleust und dort zur Expression gebracht. Plasmid-tragende Listerien, welche das zytosolische Kompartiment einer Zelle erreicht haben, werden dort durch ein plasmid-kodiertes, Listerien-spezifisches Phagenlysin 118 lysiert. Die durch die Bakterien-Lysis freigesetzte Plasmid-DNA soll auf diesem Weg in den Zellkern gelangen und das Modellprotein durch die Aktivität des eukaryotischen Promotors exprimiert werden.

Da das geplante Gentransfer-System unter anderem als Vakzinierungsstrategie zur Übertragung von Antigen-kodierender DNA in Antigen-präsentierende Zellen gedacht war, wurde berücksichtigt, dass ein *Listeria*-Plasmid-System konstruiert werden musste, welches besonders für eine *in vivo* Anwendung stabil genug ist. Im ersten Teil dieser Arbeit wurde nach einem Plasmid gesucht, welches *per se* in *Listeria spp.* stabil repliziert wird. Zum anderen wurde versucht, mit Hilfe eines so genannten „balanced lethal“ Plasmid-Systems ein Gentransfer-Plasmid so stabil an seinen Träger zu binden, dass dieser nach Verlust des Plasmides - und somit auch des Plasmid-kodierten Phagenlysin - im Wirt nicht mehr überlebensfähig ist. Die Strategie zur Konstruktion dieses „balanced lethal“ Plasmid-Systems sah vor, ein essentielles Gen aus dem Chromosom zu entfernen und dieses auf dem Plasmid, welches stabilisiert werden soll, *in trans* zu komplementieren.

5.2.1 Konstruktion eines „balanced lethal“ Systems für *Listeria monocytogenes*

5.2.1.1 Segregationsstabilität verschiedener „shuttle“-Plasmide in *Listeria monocytogenes*

In *Listeria spp.* sind einige native Riesen-Plasmide beschrieben worden (Perez-Diaz *et al.*, 1982, Flamm *et al.*, 1984), deren Replikationsursprung aber noch nicht näher charakterisiert worden sind. Daher werden zur Einführung von DNA in *Listeria* ausschließlich „shuttle“-Plasmide verwendet, welche neben dem Replikationsursprung für den Klonierungswirt *E. coli* einen zweiten Replikationsursprung eines nahe verwandten, Gram-positiven Bakteriums besitzen.

Die „shuttle“-Plasmide pHPS9, pMK4, pFLO1, pERL-3 und pRP9 (Tabelle 5.3) wurden zur Bestimmung ihrer jeweiligen Replikationsfähigkeit und Stabilität in den Stamm *L. monocytogenes* EGD Sv 1/2a transformiert und zunächst in BHI-Medium ohne Antibiotika bei 37°C kultiviert. Zu

verschiedenen Zeitpunkten wurde eine Verdünnung der Kulturen sowohl auf eine BHI-Agarplatte als auch auf eine Platte mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert. Die Anzahl der Kolonien auf der Platte ohne Antibiotikum relativ zu der Anzahl der Kolonien auf der Platte mit Antibiotikum ergaben eine Aussage über die Segregationsstabilität der jeweiligen „shuttle“-Plasmide (Abb. 5.28).

Parallel zu dieser Methode wurden die Kulturen zusätzlich zu unterschiedlichen Zeitpunkten auf eine BHI-Agarplatte ohne Antibiotikum ausplattiert, anschließend wurden die Kolonien auf eine Platte mit dem entsprechenden Antibiotikum überstrichen. Die so erhaltenen Daten unterschieden sich aber nicht von denen, welche durch paralleles Ausplattieren erhalten wurden.

Das „shuttle“-Plasmid pERL-3 zeigte in diesen *in vitro* Untersuchungen die höchste Stabilität, d. h., nahezu alle Bakterien, welche 48 Stunden in BHI-Medium ohne Antibiotikum kultiviert worden waren, enthielten ein Resistenz-vermittelndes Plasmid. Der Teil des Plasmides pERL-3, welcher ursprünglich aus einem Gram-positiven Bakterium stammt, wurde daher weiter als Basis zum Aufbau eines stabilen „balanced lethal“ Plasmid-Systems verwendet (siehe 5.1.1.2).

Bezeichnung	Replikations- ursprung	Größe	Antibiotikum
pERL-3	pAM \square 1	7,0 kb	Erythromycin (5 μ g/ml)
pFlo1	ori U	4,2 kb	Tetracyclin (5 μ g/ml)
pHPS9	pTA1060 (rep60)	5,7 kb	Erythromycin (5 μ g/ml)
pRP9		2,9 kb	Chloramphenicol (5 μ g/ml)
pMK4	Bac.R-plasmid incomp. group 8	5,6 kb	Chloramphenicol (5 μ g/ml)

Tabelle 5.3: *E. coli* / *L. monocytogenes* „shuttle“ Plasmide.

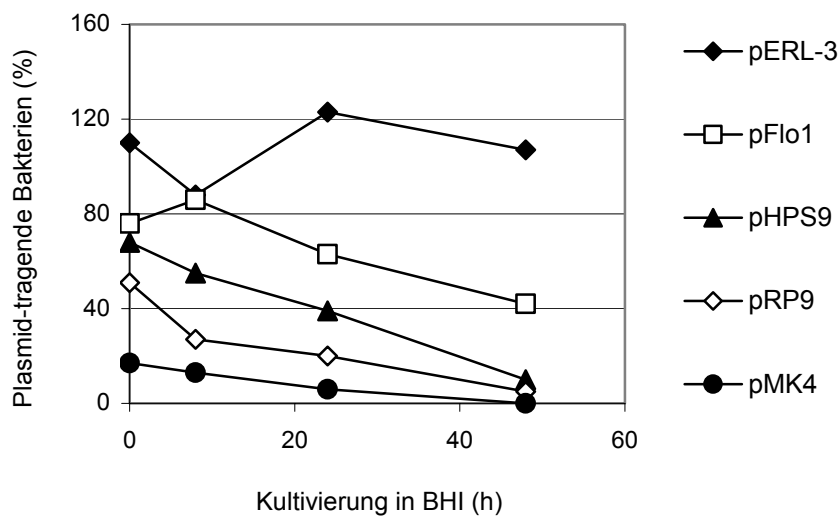


Abbildung 5.28: Stabilität verschiedener „shuttle“-Plasmide nach Kultivierung in BHI-Medium ohne Antibiotika.

5.2.1.2 Konstruktion des Basis-Plasmides pUNK1

Das durch vorangegangene Untersuchungen als hoch stabiles Plasmid in *Listeria* charakterisierte Plasmid pERL-3 entstand als Fusion über *EcoRI*-Schnittstellen aus den Eltern-Plasmiden pIL253 und pLJ (Hartl, M., 1990). pERL-3 besteht aus 7,2 kb DNA (Abb. 5.29) und schien auf Grund seiner Größe ungeeignet für den weiteren Aufbau eines Gentransfer-Plasmides. pIL253 dagegen ist ein

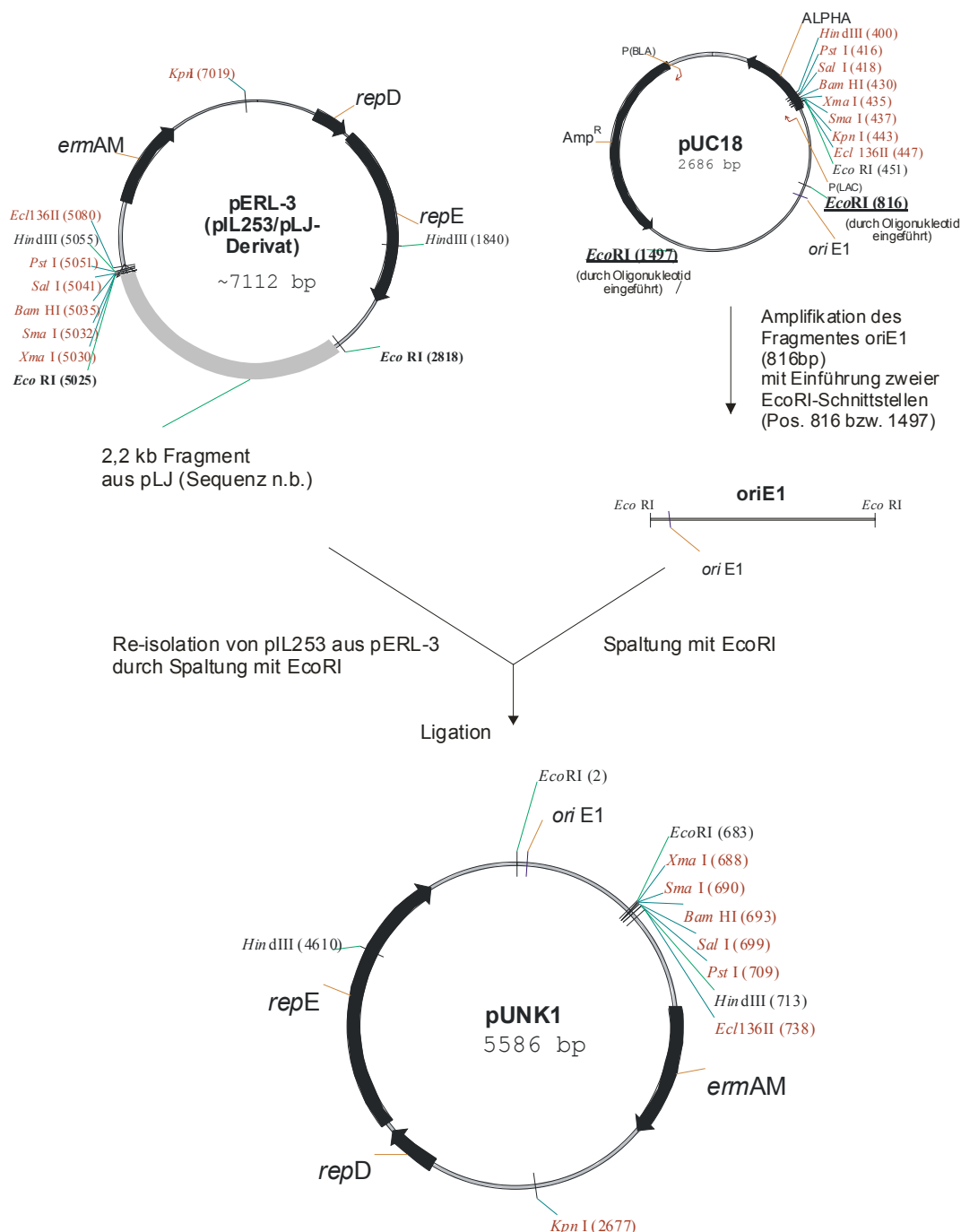


Abbildung 5.29: Konstruktion des „shuttle“-Plasmides pUNK-1.

4,9 kb kleines Plasmid, dessen Replikationsursprung pAM β 1 ursprünglich aus *Enterococcus faecalis* isoliert wurde (Schumann, 1990) und bereits als geeigneter Klonierungsvektor für *L. monocytogenes* beschrieben worden ist (Flamm *et al.*, 1984). Das Plasmid kodiert außerdem ein Erythromycin-Resistenz-Gen (*ermAM*) und verschiedene Gene für Replikationsproteine (*repD*, *repE*) zur Replikation in Gram-positiven Bakterien. Da das Erythromycin-Resistenz-Gen auch im Klonierungswirt *E. coli* Resistenz vermitteln kann, wurde pIL253 aus pERL-3 reisoliert und mit dem von pUC18 stammenden Replikationsursprung *oriE1* zu einem neuen „shuttle“-Plasmid fusioniert:

Mit den Oligonukleotiden „*oriE1-EcoRI-for*“ und „*oriE1-EcoRI-rev*“ (Galen *et al.*, 1999) und pUC18 als Matrize konnte das Fragment *oriE1* (681bp) amplifiziert werden. pIL253 wurde durch *EcoRI*-Restriktion aus pERL-3 herausgeschnitten und konnte anschließend mit dem ebenfalls mit *EcoRI* gespaltenen Fragment *oriE1* zu dem 5586 bp großen, neuen „shuttle“-Plasmid pUNK1 ligiert werden (Abb. 5.29).

Nach Transformation von pUNK1 in *L. monocytogenes* EGD Sv 1/2a wurde die Segregationsstabilität dieses Plasmides in BHI-Medium zu verschiedenen Zeitpunkten bestimmt (Abb. 5.30). Es zeigte sich, dass pUNK1 im Vergleich zu pERL-3 bereits nach 48 h bei 30 % der Bakterien nicht mehr vorhanden war, das Plasmid pFLO1 dagegen konnte in ca. 70 % der Bakterien nicht mehr nachgewiesen werden. pUNK1 wurde daher in den weiteren Arbeiten als stabileres Basis-Plasmid für das Gentransfer-System eingesetzt (siehe 5.2.1.7), während pFLO1 als instabileres Komplementations-Plasmid für die Konstruktion der *trpS*-Deletionsmutante (siehe 5.2.1.4) verwendet worden ist.

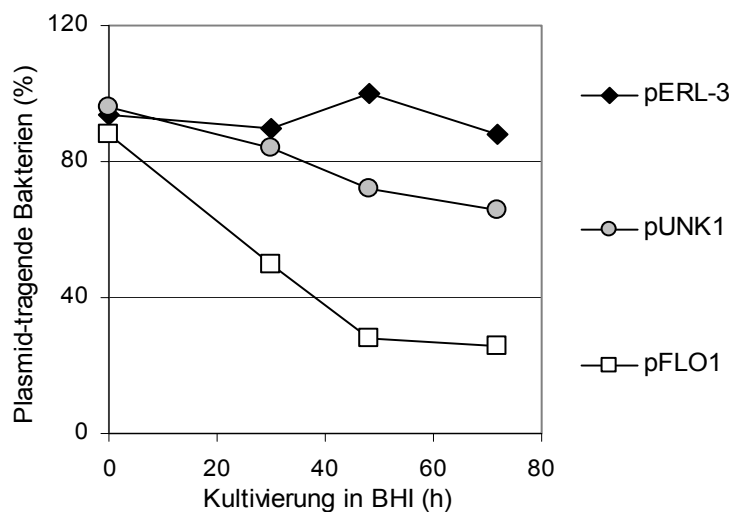


Abb. 5.30: Segregationsstabilität von pUNK1 in BHI-Medium im Vergleich zu seinem Ursprungs-Plasmid pERL-3 und zu pFLO1.

5.2.1.3 Klonierung eines funktionellen *L. monocytogenes trpS*-Gens

Zur Konstruktion eines „balanced lethal“ Plasmid-Systems sollte ein essentielle Gen von *L. monocytogenes* im Genom dieses Bakteriums deletiert werden, parallel dazu muss sich dieses Gen in einer funktionellen Transkriptionseinheit auf einem Komplementations-Plasmid befinden, damit die Lebensfähigkeit der Deletionsmutante erhalten bleibt.

Die Tryptophanyl-tRNA-Synthetase (TrpRS) von *L. monocytogenes*, kodiert vom Gen *trpS*, katalysiert die Verknüpfung von Tryptophan an die entsprechende Tryptophanyl-tRNA, wodurch TrpRS ein essentielles Enzym in der Proteinbiosynthese darstellt. Ausgehend von der *trpS*-Sequenz von *B. subtilis* konnte in der bis dahin zwar sequenzierten, aber noch nicht annotierten, genomischen Sequenz des Stammes *L. monocytogenes* EGD-e (*Listeria monocytogenes* genome sequencing project, 1998) ein homologes Gen mit 65.7 % Identität in der Nukleinsäuresequenz und 73 % Identität in der Aminosäuresequenz gefunden werden. Das *trpS*-Gen von *L. monocytogenes* umfasst 993 bp (*B. subtilis* 990 bp) und wird von einer Terminatorregion begleitet.

Unter der Annahme, dass sich die Promotorregion von TrpRS in einem Bereich von 300-400 bp vor dem Leserahmen des Genes befindet, wurden zwei Oligonukleotide definiert, welche zum einen eine *SalI*-Schnittstelle ca. 350 bp vor dem Translationsstart (*trpS*-*SalI*-for) einführen und zum anderen sechs Histidinreste, gefolgt von zwei Stopcodons und einer weiteren *SalI*-Schnittstelle and das Ende des *trpS*-Leserahmens anhängen (*trpS*-*SalI*-6His-*rev*). Ausgehend von *L. monocytogenes* EGD-e als Matrize und wurde das Fragment *trpS*-6His amplifiziert, welches nach *SalI*-Restriktion in das ebenfalls mit *SalI* linearisierte Plasmid pFLO1 kloniert worden ist.

Um eine Expression von Plasmid-kodiertem TrpRS nachzuweisen, wurde das resultierende Plasmid pFLO-*trpS*-6His in *L. monocytogenes* EGD-e transformiert. Von diesem Stamm wurden anschließend zelluläre Proteine präpariert und in einer Western Blot Analyse untersucht (Abb. 5.31). Zur Detektion wurde ein Tetra-His-Antikörper (Fa. QIAGEN) eingesetzt, welcher spezifisch die Histidinreste des plasmid-kodierten *trpS*-6His erkennen sollte. TrpRS-6His wurde sowohl in *L. monocytogenes* EGD-e als auch in *E. coli* DH10b exprimiert, allerdings nicht auf der erwarteten Höhe von ca. 37 kDa (siehe Abb. 5.31).

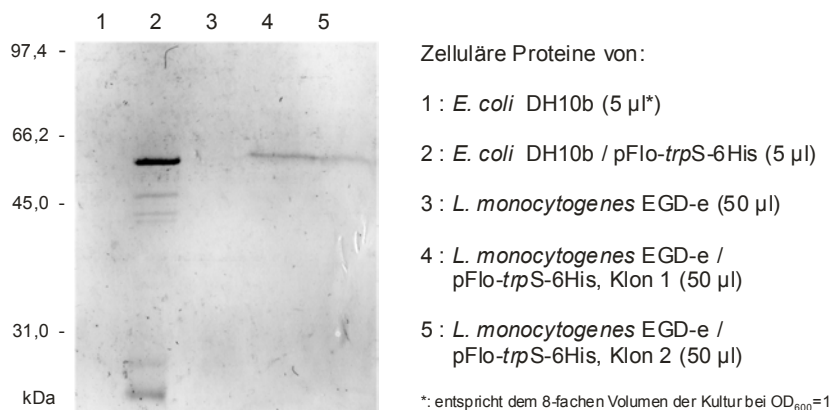


Abbildung 5.31:
Western Blot Analyse von *trpS*-6His exprimierenden *E. coli* bzw. *L. monocytogenes*. Zur Immunfärbung wurde ein Tetra-His-Antikörper verwendet.

Nachdem durch die Expressionsanalyse nachgewiesen wurde, dass die Promotorregion von *trpS* in der ca. 350 bp aufwärts gelegenen Genregion vor dem Leserahmen liegt, wurde ein neues *trpS*-Fragment mit gleichem 5'-Oligonukleotid (*trpS*-SalI-for) und neuem 3'-Oligonukleotid (*trpS*-SalI-rev) mittels PCR amplifiziert. Auf diesem Fragment befindet sich neben der *trpS*-Promotorregion und dem ursprünglichen Leserahmen von *L. monocytogenes trpS* ohne His-Tag auch die Terminatorregion des Gens. Dieses Fragment wurde ebenfalls über *SalI*-Schnittstellen in pFLO1 kloniert, das resultierende Plasmid pFLO-*trpS* wurde als Komplementations-Plasmid bei der nachfolgenden Deletionsmutagenese eingesetzt.

5.2.1.4 Konstruktion der *L. monocytogenes* Deletionsmutante $\Delta trpS$ / pFLO-*trpS*

Die Deletion von *trpS* im Chromosom von *L. monocytogenes* sollte die Promotorregion, den Leserahmen und die Terminatorregion des Gens umfassen, damit nach Deletion eine unbeabsichtigten Rekombination von chromosomalen, homologen Elementen mit dem Komplementations-Plasmid pFLO-*trpS* vermieden wird.

Zur Konstruktion eines *trpS*-Mutagenese-Plasmides wurde ein die Deletionsregion 5'-flankierendes Fragment A (342 bp) mit den Oligonukleotiden del*trpS*-A-for und del*trpS*-A-rev amplifiziert, während mit Hilfe der Oligonukleotide del*trpS*-B-for und del*trpS*-B-rev ein 3'-flankierendes Fragment B (382 bp) entstand. Die Sequenz beider Fragmente wurde der des vom „*Listeria monocytogenes* genome sequencing project“ sequenzierten Stammes *L. monocytogenes* EGD-e entliehen. Beide Fragmente wurden über eine *PspAI*-Schnittstelle zu Fragment AB ligiert, dieses mit Hilfe der Oligonukleotide del*trpS*-A-for und del*trpS*-B-rev nochmals in einer PCR-Reaktion amplifiziert und über *EcoRI*- und *BamHI*-Schnittstellen in das Plasmid pUC18 inseriert. Nach Vervielfältigung des resultierenden Plasmides pUC18-del*trpS*-AB wurde das Fragment in das Plasmid pLSV1 subkloniert.

Nach Transformation des *trpS*-Mutagenese-Plasmides pLSV-del*trpS*-AB in den *L. monocytogenes* Stamm EGD-e, Zwischenzüchtung bei 30°C und anschließender Kultivierung auf BHI-Agarplatten mit Erythromycin bei 43°C konnten einige Klone präpariert werden, welche das Plasmid chromosomal inseriert hatten. Von diesen wurde ein Klon ausgewählt, welcher eine homologe Rekombination mit dem Plasmid über das Fragment del*trpS*A vollzogen hatte. Dieser Klon wurde elektrokompent gemacht und mit dem Komplementations-Plasmid pFLO-*trpS* transformiert. Anschließend konnte nach 20 Passagen bei 37°C die *trpS*-Deletionsmutante ($\Delta trpS$ / pFLO-*trpS*) isoliert werden.

Die chromosomale Deletion des essentiellen Gens *trpS* konnte erst nach der zweiten Durchführung der gesamten Prozedur bewerkstelligt werden. Im Rahmen der ersten Deletionsmutagenese kam es zu unerwarteten Rekombinations-Ereignissen, u.a. lies sich nach Insertion des Mutagenese-Plasmides

das *trpS*-Gen oder ein Teil davon mittels PCR ca. 6 kb stromabwärts vom ursprünglichen Locus nachweisen.

Aus diesem Grund wurde die erfolgreich hergestellte Deletionsmutante $\Delta trpS$ / pFLO-*trpS* nicht nur durch die Sequenzierung des Deletions-Locus verifiziert, sondern auch durch Southern Blot Analyse auf eventuell vorhandene, aber im Chromosom verlagerte Fragmente des *trpS*-Gens kontrolliert. Chromosomale DNA von $\Delta trpS$ / pFLO-*trpS* und wildtypischen Bakterien sowie das Plasmid pFLO-*trpS* wurden mit *HincII* gespalten, in einem Agarose-Gel aufgetrennt und auf eine Nylon-Membran gebロットet. Als Sonde diente ein 518 bp großes Fragment des *trpS*-Gens, welches mit den Oligonukleotiden *trpS*-check-for und *trpS*-check-rev amplifiziert worden ist.

Beim Wildtyp konnte *trpS* korrekt auf einem ca. 1400 bp großem DNA-Fragment detektiert werden (Abbildung 5.32), während auf dem Plasmid pFLO-*trpS* u.a. ein Fragment von ca. 950 bp mit der Sonde spezifisch hybridisierte. Zusätzlich wurden aber auch andere *HincII*-Spaltfragmente bzw. partial verdaute Plasmid-DNA von der Sonde erkannt. Im Stamm $\Delta trpS$ / pFLO-*trpS* hybridisierten ebenfalls diese vom Plasmid abstammenden DNA-Fragmente mit der *trpS*-Sonde, wobei das originale, chromosomale *trpS*-Fragment von ca. 1400 bp nicht mehr detektiert wurde. Zusätzlich erschien jedoch eine neue Bande von 600-800 bp, welche nicht dem Plasmid pFLO-*trpS* zugeordnet werden konnte. Ob diese Bande von einem evtl. verschobenen partialen *trpS*-Gen oder von einer funktionellen Transkriptionseinheit abstammt, kann nur mit weiteren funktionellen Untersuchungen, wie z. B. einer Plasmid-Stabilitäts-Untersuchung, geklärt werden. $\Delta trpS$ / pFLO-*trpS* wurde außerdem mittels Southern Blot Analyse auf die Anwesenheit von pLSV-Derivaten bzw. des von pLSV kodierten Erythromycin-Resistenz-Gens untersucht. Der Stamm schien jedoch völlig frei von solchen DNA-Fragmenten zu sein.

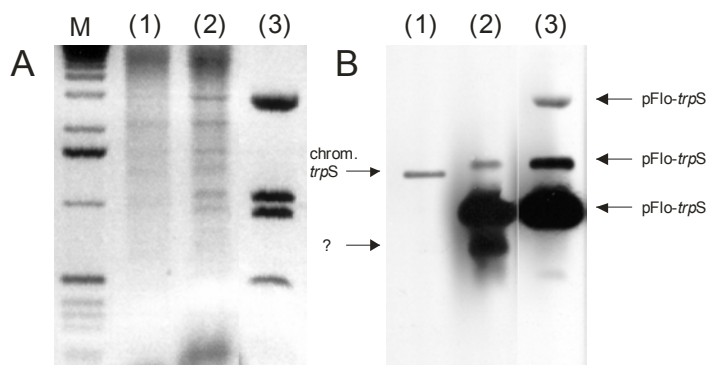


Abbildung 5.32: Southern Blot Analyse von $\Delta trpS$ / pFLO-*trpS* auf die Anwesenheit eines chromosomalen *trpS*-Gens. (A) Agarose-Gel-Elektrophorese der mit *HincII* gespaltenen DNA. (B) Southern Blot dieser DNA nach Hybridisierung mit einer ECL-markierten *trpS*-Sonde. Verwendete DNA: (1) Chromosomale DNA von *L. m.* EGD-e, (2) chromosomale DNA von $\Delta trpS$ / pFLO-*trpS*, (3) pFLO-*trpS*.

5.2.1.5 Segregationsstabilität und Austausch von Plasmiden in der $\Delta trpS$ -Deletionsmutante

Die Deletionsmutante $\Delta trpS$ / pFLO-*trpS* wurde nach Anzucht in BHI-Medium mit Erythromycin 5x in einer 1:1000-Verdünnung in BHI-Medium bis zur stationären Phase weiter passagiert, wodurch ca. 50 Generationen (s. Anhang) der Plasmid-tragenden Mutante erzeugt worden sind. Nach Ausplattierung auf BHI-Agar wurden 200 Kolonien auf BHI-Agar mit Tetracyclin überführt. Alle Kolonien erwiesen sich als Tetracyclin-resistent.

Parallel dazu wurde die Plasmid-DNA von 24 Kolonien durch Minipräparation isoliert und nach *SalI*-Restriktion mittels Agarose-Gel-Elektrophorese detektiert. Alle Kolonien trugen eindeutig das Plasmid pFLO-*trpS* (Abb. 5.33).

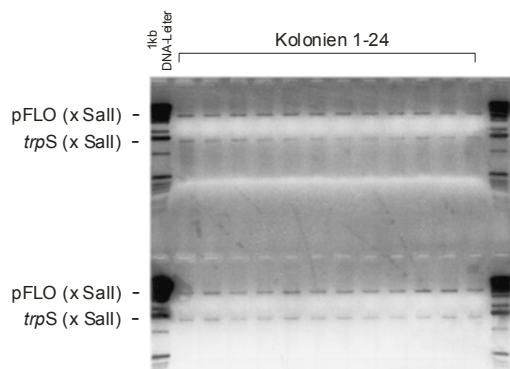


Abbildung 5.33: Nachweis von pFLO-*trpS* in $\Delta trpS$ / pFLO-*trpS* durch Restriktionsanalyse mit *SalI*.

Durch Subklonierung des *trpS*-Fragmentes von pFLO-*trpS* in pUNK1 entstand das zweite Komplementations-Plasmid pUNK-*trpS* (später als pSP0 bezeichnet). Dieses Plasmid wurde in $\Delta trpS$ / pFLO-*trpS* transformiert und der Stamm für ca. 20 Generationen in BHI-Medium mit Erythromycin kultiviert. Nach Ausplattierung dieser Kultur auf BHI-Agar mit Erythromycin wurden 200 Kolonien auf BHI-Agar mit Tetracyclin

überführt. Nur 10 % der Kolonien erwiesen sich dabei als Tetracyclin-resistent. In einer PCR-Analyse mit Gesamt-DNA einer Tetracyclin-resistenten Kolonie als Matrize konnte eindeutig nachgewiesen werden, dass dieser, als $\Delta trpS$ / pSP0 bezeichnete Stamm, keine Kopie des Plasmides pFLO-*trpS* mehr trägt (Abbildung 5.34).

Es ist also möglich, verschiedene *trpS*-tragende Plasmide mit unterschiedlichen Resistenzmarkern innerhalb dieses neuen „balanced lethal“ Plasmid-Systems untereinander auszutauschen, ohne die jeweilige Stabilität des von den Bakterien replizierten Plasmides zu beeinträchtigen.

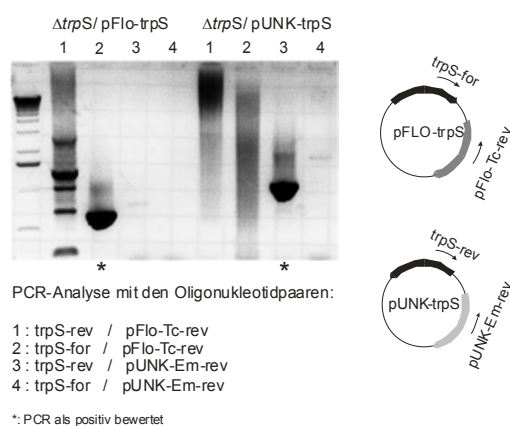


Abbildung 5.34: Austausch der Plasmide pUNK-*trpS* und pFlo-*trpS* in $\Delta trpS$.

5.2.1.6 *In vivo* -Stabilität von $\Delta trpS$ / pSP0-P_{CMV}

Das Plasmid pSP0-P_{CMV} (siehe 5.2.1.7) wurde sowohl in *L. monocytogenes* EGD-e (Wildtyp) als auch in $\Delta trpS$ / pFLO-*trpS* transformiert und der Stamm $\Delta trpS$ / pSP0-P_{CMV} durch Plasmid-Austausch isoliert (siehe 5.2.1.5). EGD-e/ pSP0-P_{CMV} und $\Delta trpS$ / pSP0-P_{CMV} wurden in BHI-Medium mit Erythromycin bis zu einer Dichte von 180 KE ($\approx 1 \times 10^9$ Bakterien / ml) kultiviert, anschließend wurde je eine BALB/c -Maus mit 10^9 Bakterien pro Stamm orogastrisch infiziert. Vier Tage nach Infektion wurden die Bakterien aus Leber und Milz reisoliert und auf BHI-Agar ausplattiert. Nach Übertragung von 150 Kolonien des Stammes EGD-e / pSP0-P_{CMV} auf BHI-Agar mit Erythromycin konnten 94 Kolonien (63 %) als Em-resistent bestimmt werden, während sich alle 260 untersuchten Kolonien des Stammes $\Delta trpS$ / pSP0-P_{CMV} als Em-resistent erwiesen (Abb. 5.35).

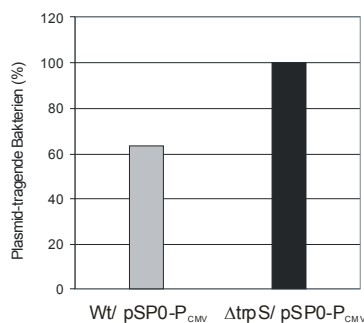


Abbildung 5.35: *In vivo* Stabilität von pSP0-P_{CMV} in $\Delta trpS$ bzw. im Wildtyp (Wt).

5.2.1.7 Konzeption und Konstruktion von Plasmiden für den Transfer und Expression von Genen unter eukaryotischer Promotorkontrolle

Sowohl pFLO-*trpS* (siehe 5.2.1.5) als auch pSP0-P_{CMV} (siehe 5.2.1.6) erwiesen sich als 100 % stabilisiert in der *trpS*-Deletionsmutante ($\Delta trpS$). Da pUNK1 das *per se* stabilere Plasmid in *Listeria* zu sein schien (siehe 5.1.1.3), wurde es als Ausgangsplasmid für den Aufbau verschiedener Gentransfer-Plasmide verwendet, während pFLO-*trpS* weiter als Komplementations-Plasmid diente.

Listeria monocytogenes soll im Rahmen des zu konstruierenden Gentransfer-Systems im Zytosol der Wirtszelle mit Hilfe des Listerien-spezifischen Phagenlysin 118 lysiert werden, damit Plasmid-DNA freigesetzt werden kann, welche eine Expressionskassette eines Modellproteins oder Antigens kodiert. Phagenlysin 118 ist eine Endopeptidase des Phagen A118, welche listerielles Peptidoglykan zwischen L-Alanin und D-Glutamat hydrolysiert (Loessner *et al.*, 1995). Der Phage A118 codiert ebenfalls für ein Holin-Gen, dessen Produkt ein Membranprotein darstellt, welches Poren in der bakteriellen Zellwand bildet. Nach Expression des Phagenlysin 118 im Zytosol von

Listeria gelangt dieses in Verlauf einer Phageninfektion durch die Holin-Poren zu seinem Substrat, dem Peptidoglykan und lysiert so die bakterielle Zellwand (Loessner *et al.*, 1995).

Dietrich *et al.* publizierten 1998 eine Lysis-Kassette, bei der das Gen für das Phagenlysin 118 unter der Kontrolle des ActA-Promotors von *L. monocytogenes* steht (P_{actA} -*ply118*). Der ActA-Promotor ist vom Transkriptionsaktivator PrfA abhängig und wird vorwiegend erst im Zytosol von eukaryotischen Zellen aktiv (Portnoy *et al.*, 1992). Obwohl dieses vom ActA-Promotor kontrollierte Phagenlysin ohne Anwesenheit von Holin-Poren nicht aus der Bakterienzelle gelangen kann, konnte bereits gezeigt werden, dass diese Lysis-Kassette wirksam ist: Listerien, welche mit P_{actA} -*ply118* ausgestattet wurden, lysierten verstärkt, aber nicht vollständig im Zytosol der Makrophagen-Zell-Linien J774.A1 und P388.D1 (Dietrich *et al.*, 1998). Gleichzeitig konnte ein erhöhter Plasmid-DNA-Transfer von *Listeria* ins Zytosol der Wirtszellen nachgewiesen werden.

M. Steigerwald klonierte 1998 im Rahmen seiner Diplomarbeit zusätzlich eine zweite Lysis-Kassette, und bei dieser wurde nicht nur der ActA-Promotor sondern auch das ActA-Signalpeptid über eine *Bam*HI-Schnittstelle mit dem Phagenlysinen fusioniert (P_{actA} - SP_{actA} -*ply118*). Dieses Konstrukt soll das Phagenlysin 118 nach Expression in *Listeria* aus dem Bakterium exportieren, wobei es ins Zytosol der Wirtszelle gelangen soll. Dort könnte dieses Phagenlysin sowohl seinen eigenen Produzenten als auch andere Listerien-Zellen lysieren.

Sowohl P_{actA} -*ply118* als auch die zweite Lysis-Kassette P_{actA} - SP_{actA} -*ply118* wurden zusammen mit einer eukaryotischen Expressions-Kassette auf das Ausgangsplasmid pSP0 kloniert, um die Wirkung beider Phagenlysin-Kassetten zusammen mit neuen „balanced lethal“ Plasmid-System $\Delta trpS/ ptrpS$ zu testen. Zur Expression eines Modellproteins oder Antigens wurde der „Immediate early“ Zytomegalievirus-Promotor gewählt, welcher sich zusammen mit einem „splice donor/ splice acceptor“ (SD/SA) –Intron und einem Polyadenylierungssignal von SV40 auf dem Expressions-Plasmid pCMV β der Fa. BD Biosciences Clontech befindet.

Die Klonierung der Gentransfer-Plasmide wurde im folgenden beschrieben durchgeführt: In einem ersten Schritt wurde das β -Galaktosidase-Gen *lacZ* aus der Expressions-Kassette von pCMV β mit *Not*I herausgespalten und das Plasmid erneut ligiert. Nach erneuter Restriktion des verkleinerten Plasmides mit *Pst*I und *Sal*I konnte ein 1023 bp großes Fragment (als P_{CMV} bezeichnet) isoliert werden, welches aus dem CMV-Promotor, dem SD/SA-Intron, einer freien *Not*I-Schnittstelle zur Inserierung variabler Gene und einem nachfolgenden Polyadenylierungssignal zusammengesetzt ist. Dieses Fragment wurde über die Schnittstellen *Pst*I und *Sal*I in das Plasmid pUNK1 kloniert, resultierend in pUNK- P_{CMV} .

In einem zweiten Schritt wurde das Fragment P_{actA} -*ply118* mit den Restriktionsenzymen ECL136II und *Sal*I aus dem Plasmid pUC18ActPr118 (Dietrich, 1998) herausgeschnitten und in das mit *Sal*I und *Sma*I linearisierte Plasmid pUNK- P_{CMV} inseriert. Das resultierende Plasmid pUNK- P_{CMV} P_{actA} -

ply118 wurde in einem abschließenden *SalI*-Verdau linearisiert und mit dem Fragment *trpS* (siehe 5.2.1.3) ligiert. Das entstandene Plasmid erhielt die Bezeichnung pSP1- P_{CMV} (Abbildung 5.36).

Parallel dazu konnte das Fragment P_{actA} - SP_{actA} -*ply118* mit ECL136II und *SalI* aus dem Plasmid pFLO118 (Steigerwald, 1999) gespalten und in die Schnittstellen *SalI* und *SmaI* von pUNK- P_{CMV} eingesetzt werden. pUNK- P_{CMV} P_{actA} - SP_{actA} -*ply118* wurde ebenfalls nach *SalI*-Restriktion mit dem Fragment *trpS* ligiert, resultierend in dem zweiten Gentransfer-Plasmid pSP2- P_{CMV} (Abb. 5.36).

In einem letzten Schritt wurde das Fragment *trpS* (siehe 5.2.1.3) nach *SalI*-Restriktion in die *SalI*-Schnittstelle des Plasmides pUNK- P_{CMV} kloniert, dadurch entstand das Gentransfer-Plasmid pSP0- P_{CMV} ohne Lysis-Kassette (Abb. 5.36).

Alle drei Gentransfer-Plasmide wurden in den *L. monocytogenes* Stamm $\Delta trpS$ / pFLO-*trpS* transformiert und durch Plasmidaustausch (siehe 5.2.1.5) die Stämme $\Delta trpS$ / pSP0- P_{CMV} , $\Delta trpS$ / pSP1- P_{CMV} sowie $\Delta trpS$ / pSP2- P_{CMV} isoliert.

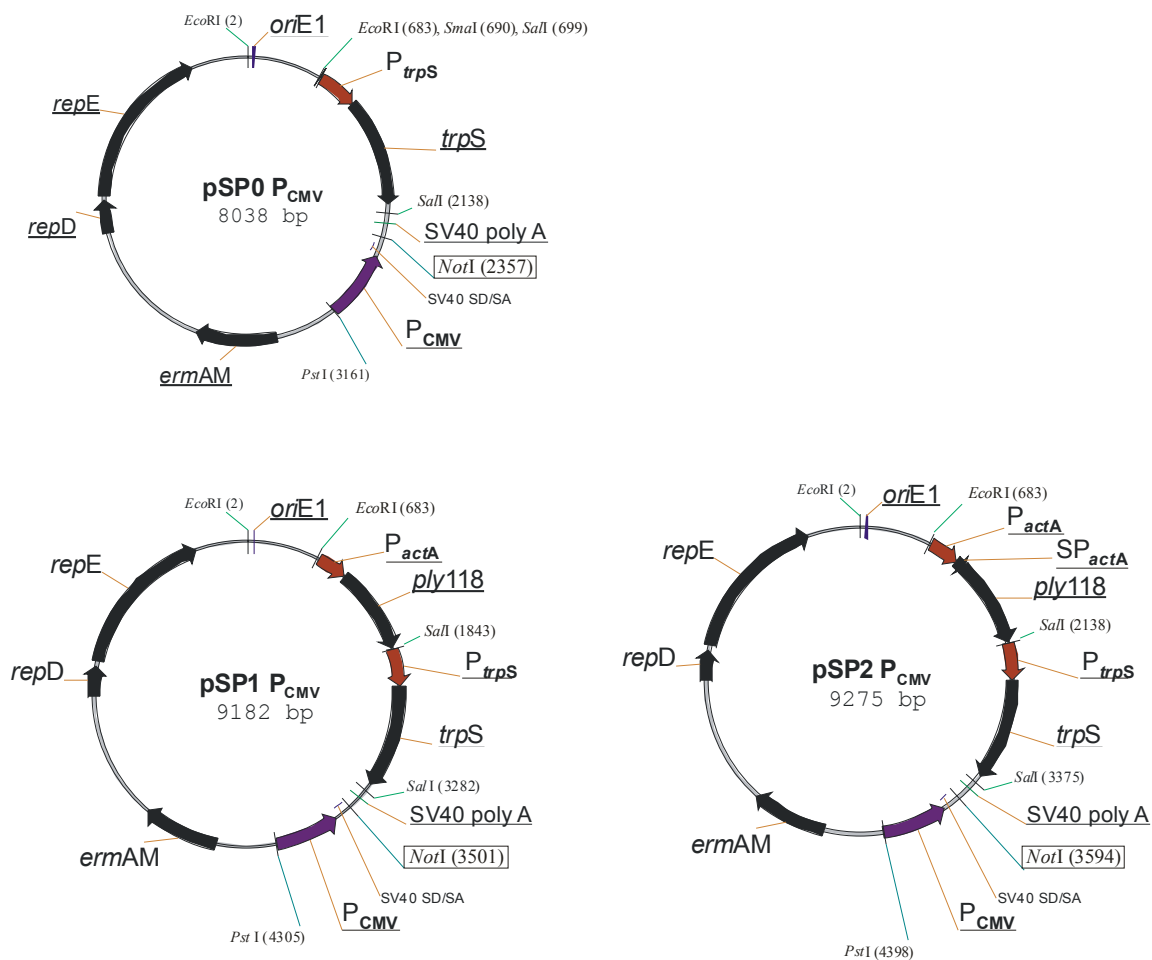


Abbildung 5.36: Schematische Darstellung der Gentransfer-Plasmide pSP0- P_{CMV} , pSP1- P_{CMV} und pSP2- P_{CMV} .

5.2.2 Charakterisierung der *L. monocytogenes* Gentransferstämme $\Delta trpS/ pSP0\text{-}P_{CMV}$, $\Delta trpS/ pSP1\text{-}P_{CMV}$ und $\Delta trpS/ pSP2\text{-}P_{CMV}$

5.2.2.1 Wachstum der Stämme in BHI-Medium

L. monocytogenes EGD-e (Wt), $\Delta trpS/ pSP0\text{-}P_{CMV}$, $\Delta trpS/ pSP1\text{-}P_{CMV}$ sowie $\Delta trpS/ pSP2\text{-}P_{CMV}$ wurden je dreimal aus einer Übernachtskultur 1:100 in BHI-Medium verdünnt und bei 37°C kultiviert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurde die OD bei 600 nm der einzelnen Kulturen bestimmt (Abbildung 5.37).

Das Wachstum aller drei $\Delta trpS$ -Stämme erwies sich als deutlich verlangsamt gegenüber dem Wildtyp-Stamm, die Kulturen erreichten jedoch alle eine ähnliche Bakteriendichte. Auffällig war, dass $\Delta trpS/ pSP2\text{-}P_{CMV}$, der Stamm mit dem ActA-Signalpeptid zum Export des Phagenlysin, nach ca. 10 Stunden teilweise zu lysieren schien, während man bei $\Delta trpS/ pSP1\text{-}P_{CMV}$ erst einen Rückgang der OD_{600} nach Kultivierung über Nacht beobachten konnte. Später aufgenommene Wachstumskurven in verschiedenen BHI-Medium-Chargen ergaben weitere starke Schwankungen im Wachstum dieser Stämme. In einigen BHI-Chargen konnte z.B. der Stamm $\Delta trpS/ pSP2\text{-}P_{CMV}$ nur bis zu einer mOD_{600} von ca. 400-500 wachsen, gefolgt von einer starken Lysis der Bakterien, während $\Delta trpS/ pSP1\text{-}P_{CMV}$ in den meisten BHI-Chargen eine ähnliche OD_{600} erreichte wie der Stamm $\Delta trpS/ pSP0\text{-}P_{CMV}$ ohne Phagenlysin.

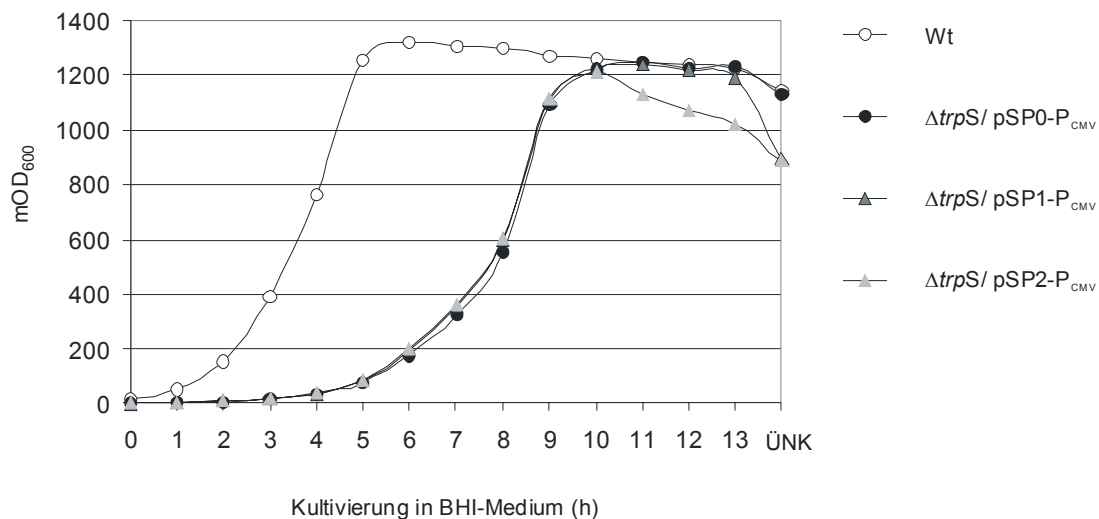


Abbildung 5.37: Wachstumskurven der Stämme $\Delta trpS/ pSP0\text{-}P_{CMV}$, $\Delta trpS/ pSP1\text{-}P_{CMV}$ und $\Delta trpS/ pSP2\text{-}P_{CMV}$ in BHI-Medium.

5.2.2.2 Stabilität der Gentransfer-Stämme in verschiedenen Medien bzw. Puffern

Nicht nur in BHI-Medium schien der Gentransfer-Stamm $\Delta trpS/ pSP2-P_{CMV}$ (mit $P_{actA}-SP_{actA-ply118}$) zu lysieren, sondern sogar nach Aufnahme in PBS konnte eine Abnahme der Bakteriendichte des Stammes beobachtet werden. Ursache dieses Effektes schien eine unerwünschte, extrazelluläre Aktivität des ActA-Promotors zu sein, zusätzlich schien das mit dem ActA-Signalpeptid fusionierte Phagenlysin 118 im Vergleich zum nicht fusionierten Protein die Bakterien besonders effektiv zu lysieren.

Daher musste ein Medium oder Puffer gesucht werden, in dem alle drei Gentransfer-Stämme ($\Delta trpS/ pSP0-P_{CMV}$, $\Delta trpS/ pSP1-P_{CMV}$ und $\Delta trpS/ pSP2-P_{CMV}$) stabil kultiviert oder überführt werden können, ohne dass der ActA-Promotor aktiviert wird. Einerseits kann man die Gentransfer-Effizienz dieser Stämme *in vitro* Versuchen nur dann vergleichen, wenn alle Stämme extrazellulär gleichermaßen stabil sind und andererseits müssen alle drei Stämme bei einer *in vivo* Anwendung zusätzlich die saure Magenpassage überleben und unlysiert den Darm zum Eintritt in den Wirt erreichen.

Aus diesen Gründen wurden die drei Stämme $\Delta trpS/ pSP0-P_{CMV}$, $\Delta trpS/ pSP1-P_{CMV}$ und $\Delta trpS/ pSP2-P_{CMV}$ in BHI-Medium bei 37°C zunächst bis zu einer OD_{600} von 0,6-0,7 (exponentielle Phase) kultiviert, dann wurden je 5 ml der Kulturen einzeln abzentrifugiert und in 5 ml BHI, PBS, PBS + 2 % Glukose, $H_2O_{deion.}$ und MWB-Medium resuspendiert. MWB-Medium ist ein chemisch definiertes Minimalmedium für Listerien (Ranga *et al.*, 1991). Die einzelnen Suspensionen wurden 24 Stunden parallel bei RT und 4°C inkubiert und anschließend die OD_{600} bestimmt (Abbildung 5.38). Zusätzlich wurde untersucht, ob der ActA-Promotor im sauren Milieu des Magen angeschaltet wird, dazu wurden BHI, MWB-Medium und PBS auf pH-Werte von 2 bis 6 mit HCl angesäuert.

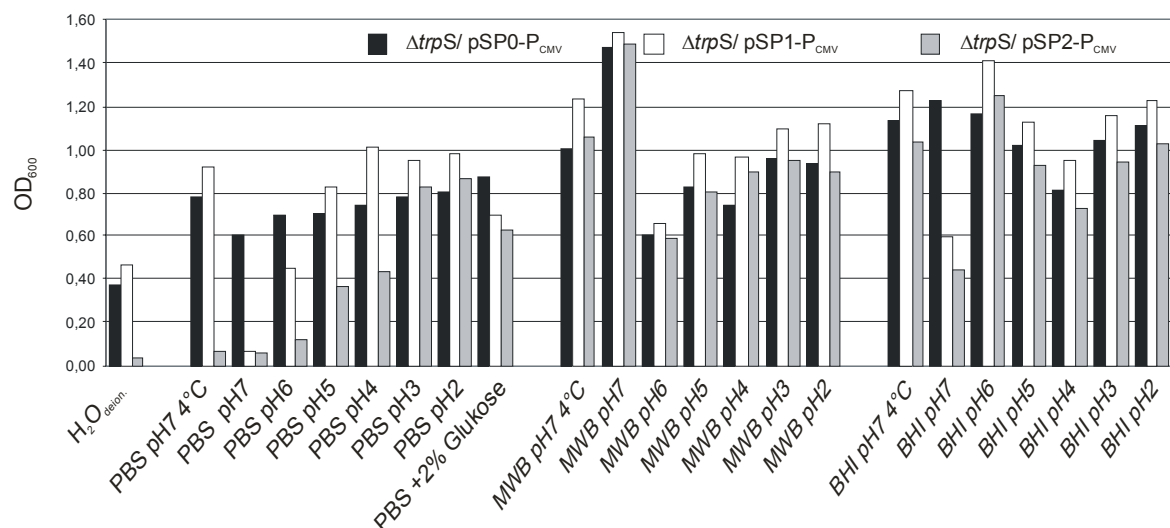


Abbildung 5.38: Lysis von $\Delta trpS/ pSP0-P_{CMV}$, $\Delta trpS/ pSP1-P_{CMV}$ und $\Delta trpS/ pSP2-P_{CMV}$ in verschiedenen Medien und Puffern.

Im Vergleich zum Gentransfer-Stamm $\Delta trpS/ pSP0-P_{CMV}$ ohne Phagenlysin lysierte $\Delta trpS/ pSP1-P_{CMV}$ mit $P_{actA-ply118}$ -Kassette stark bei RT in neutralem PBS und teilweise in PBS pH 6 sowie BHI-Medium (siehe auch Abb. 5.37). $\Delta trpS/ pSP2-P_{CMV}$, der Stamm mit ActA-Signalpeptid ($P_{actA-SP_{actA-ply118}}$), zeigte eine starke Lysis in $H_2O_{deion.}$ in PBS bei 4°C und RT, sowie eine teilweise Lysis bei RT in BHI-Medium und PBS bei pH 4-6. Alle drei Stämme erwiesen sich jedoch als konsistent in MWB-Medium und PBS + 2 % Glukose.

Nach Ansäuerung der Medien schien das Phagenlysin zunächst inaktiv zu werden, mit weiter abnehmenden pH wurden die Bakterien aber abgetötet, was sich durch ihr Absinken im Medium äußerte.

Da das MWB-Minimalmedium für Listerien sich als zu aufwendig herstellbar erwies, wurden weitere Medien und Wachstumsbedingungen zur Kultivierung der Gentransfer-Stämme getestet. Leimeister-Wächter *et al.* veröffentlichten 1992, dass die Expression der Virulenz-Gene von *L. monocytogenes* thermoreguliert ist, d.h., bei Wachstumstemperaturen unter 30°C scheinen Virulenz-Gene nicht transkribiert zu werden. Ebenso kann durch die Anwesenheit des β -Glukosides Cellobiose die Transkription von *actA* und anderer PrfA-regulierten Gene supprimiert werden (Park *et al.*, 1993, Renzoni *et al.*, 1997).

Von den Gentransfer-Stämmen $\Delta trpS/ pSP0-P_{CMV}$, $\Delta trpS/ pSP1-P_{CMV}$ und $\Delta trpS/ pSP2-P_{CMV}$ wurden daher Wachstumskurven bei 37°C und RT aufgenommen, dabei wurde zum einen zwei verschiedene BHI-Medium-Chargen (Fa. Scharlau versus Fa. Difco) bzw. BHI-Medium mit 25 mM Cellobiose getestet (Abbildung 5.39).

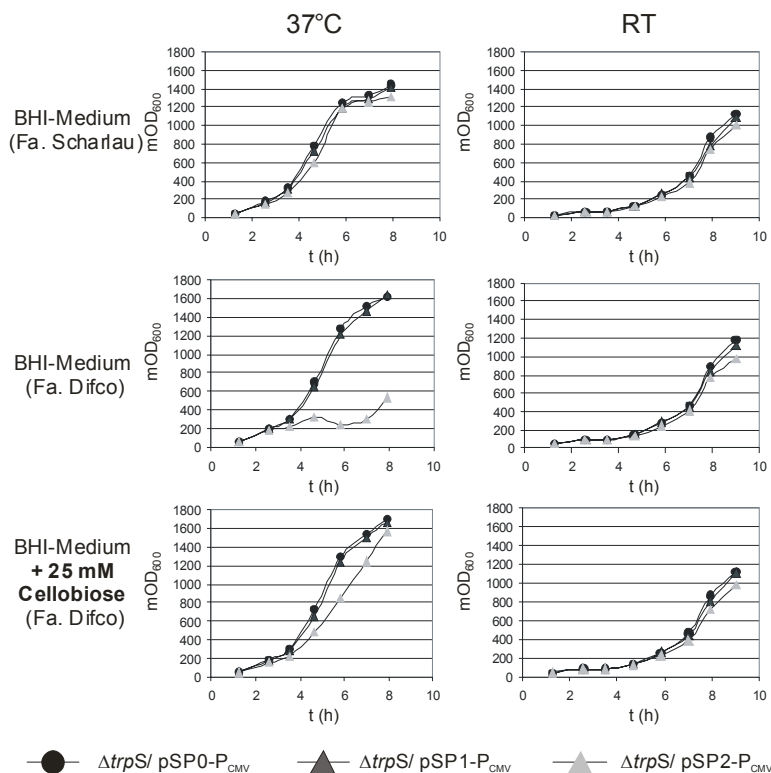


Abbildung 5.39: Wachstum von $\Delta trpS/ pSP0-P_{CMV}$, $\Delta trpS/ pSP1-P_{CMV}$ und $\Delta trpS/ pSP2-P_{CMV}$ in Abhängigkeit von der Temperatur bzw. in Anwesenheit von Cellobiose.

Der Stamm $\Delta trpS/ pSP2-P_{CMV}$ wurde auch in diesem Experiment in einem der BHI-Medien (Fa. Difco) am schnellsten lysiert, dieser Effekt konnte aber sowohl durch 25 mM Cellobiose als auch durch Wachstum bei RT aufgehoben werden.

5.2.2.3 Wachstum der Gentransfer-Stämme in verschiedenen Zell-Linien

Zur Beurteilung des intrazellulären Verhaltens wurden sowohl die murine Makrophagen-Zell-Linie J774.A1 als auch die humane epitheliale Colonzell-Linie Caco-2 mit den Stämmen $\Delta trpS/$ pSP0- P_{CMV} , $\Delta trpS/$ pSP1- P_{CMV} , $\Delta trpS/$ pSP2- P_{CMV} und dem Wildtyp infiziert. Dazu wurden alle Stämme bis zu einer $OD_{600} = 1$ in MWB-Minimalmedium (siehe 5.2.2.2) bei 37°C kultiviert, einmal in Minimalmedium gewaschen und in gleichem Volumen MWB-Medium incl. 20 % Glycerin bei -80°C bis zum Gebrauch gelagert. J774.A1-Makrophagen wurden mit einer $MOI=5$ und Caco-2 – Zellen mit einer $MOI=20$ in Triplets für eine Stunde infiziert, nachdem die Bakterien auf diese $MOIs$ in RPMI verdünnt worden waren. Nach drei Wasch-Schritten mit $PBS(Ca^{2+}/Mg^{2+})$ wurden alle Infektionsansätze mit RPMI/FKS + 100 $\mu g/ml$ Gentamycin behandelt. Anschließend wurden im Abstand von je einer Stunde die Infektionsansätze nach zwei Wasch-Schritten geerntet, die Zellen mit Ultraschall aufgebrochen, und die Bakteriensuspension in Verdünnungsreihen zur quantitativen Auswertung ausplattiert. Außerdem wurden die in RPMI verdünnten Bakterien nach Infektionsstart ebenfalls ausplattiert, um eventuelle Lysiseffekte der Stämme in RPMI abzuschätzen, jedoch konnten keine verringerten Zellzahlen bei den Phagenlysin-tragenden Gentransfer-Stämmen beobachtet werden, d.h., RPMI scheint in einem Zeitraum von ca. einer Stunde keine Aktivierung des ActA-Promotors zu induzieren.

Der Wildtyp und die Stämme $\Delta trpS/$ pSP0- P_{CMV} , und $\Delta trpS/$ pSP1- P_{CMV} zeigten ein ähnliches Invasionsverhalten (Abbildung 5.40:A, C), dagegen konnten bei dem Stamm $\Delta trpS/$ pSP2- P_{CMV} mit der Kassette P_{actA} - SP_{actA} - $ply118$ eine Stunde nach Gentamycinzugabe (= 2 h *p.i.*) nur 1,4 % (bei J774.A1) bzw. 0,3 % (bei Caco-2) intrazelluläre Bakterien in Relation zu $\Delta trpS/$ pSP0- P_{CMV} , dem Stamm ohne Phagenlysin, nachgewiesen werden. Ob diese Bakterien extrazellulär bei Zellkontakt oder rasch nach Eintritt in die Zellen gestorben sind, konnte anhand dieser Daten nicht festgestellt werden.

Nach Beurteilung der intrazellulären Bakterienzahl/ Napf im Verlauf von fünf Stunden nach Gentamycinzugabe (Abbildung 5.40:B, D) konnte beim Wildtyp, bei $\Delta trpS/$ pSP0- P_{CMV} , und auch bei $\Delta trpS/$ pSP1- P_{CMV} ein intrazelluläres Wachstum der Bakterien beobachtet werden. $\Delta trpS/$ pSP2- P_{CMV} dagegen schien sich in Caco-2 Zellen in diesem Zeitraum nicht weiter signifikant zu vermehren, und in J774.A1 Makrophagen war zusätzlich zur oben beschriebenen, frühen Lysis des Stammes eine weitere signifikante Reduktion der Lebendbakterienzahlen um 75 % beobachten.

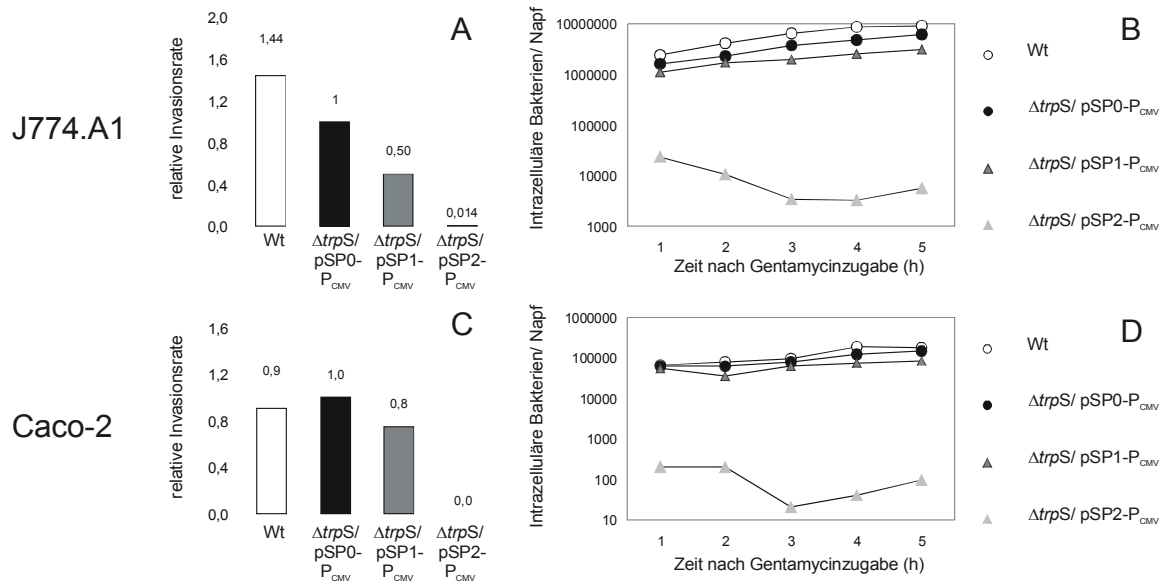


Abbildung 5.40: Relative Invasionsrate (A, C) bzw. intrazelluläres Wachstum (B, D) von $\Delta trpS/ pSP0-PCMV$, $\Delta trpS/ pSP1-PCMV$ und $\Delta trpS/ pSP2-PCMV$ in Caco-2 (C, D) und P388.D1 (A, B).

5.2.2.4 TEM-Aufnahmen der intrazellulären Stämme $\Delta trpS/ pSP0-PCMV$, $\Delta trpS/ pSP1-PCMV$ und $\Delta trpS/ pSP2-PCMV$

Transmissions-Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Gentransfer-Stämme nach Infektion von Zellen sollten zeigen, wie weit die bakteriellen Strukturen von den beiden verschiedenen Phagenlysin-Varianten beeinflusst werden. P388.D1 Makrophagen wurden mit den Stämmen $\Delta trpS/ pSP0-PCMV$, $\Delta trpS/ pSP1-PCMV$ und $\Delta trpS/ pSP2-PCMV$ infiziert, 12 Stunden nach Infektion fixiert und nach einer Standardmethode der elektronenmikroskopischen Abteilung des Biozentrums eingebettet (siehe 4.6.2).

Die Aufnahmen in Abbildung 5.41 zeigen P388.D1 Zellen, in deren Zytosol sich Bakterien der Stämme $\Delta trpS/ pSP0-PCMV$ (A+D), $\Delta trpS/ pSP1-PCMV$ (B+E) und $\Delta trpS/ pSP2-PCMV$ (C+F) befinden, was daran zu erkennen ist, dass die Bakterien teilweise von Aktin-Filamenten umgeben sind. Obwohl die beiden letzteren Stämme Phagenlysin 118 exprimieren, konnte bei ihnen keinerlei morphologische Veränderungen, ihre Zellwand oder andere bakterielle Strukturen betreffend, festgestellt werden. Im Gegensatz zu Bakterien, die sich desintegriert in den Phagosomen der Makrophagen befanden (Abb. 5.41, D rechts), schienen alle im Zytosol der Zellen befindlichen Bakterien unbeeinträchtigt zu sein.

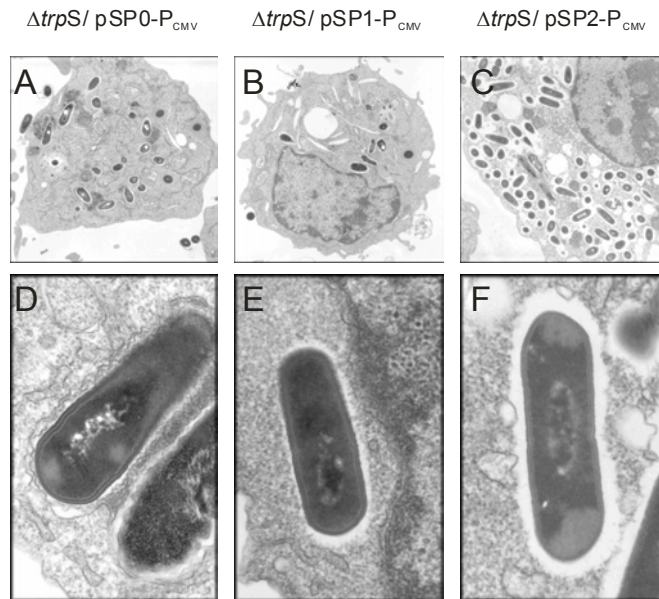


Abb. 5.41: Transmissions-Elektronenmikroskopische Aufnahmen von $\Delta trpS/$ pSP0- P_{CMV} (A,D), $\Delta trpS/$ pSP1- P_{CMV} (B,E) und $\Delta trpS/$ pSP2- P_{CMV} (C,F) in P388.D1 Zellen.

5.2.2.5 Infektion von BALB/c Mäusen mit den Gentransfer-Stämmen

BALB/c Mäuse wurden sowohl mit den Gentransfer-Stämmen als auch mit wildtypischen Listerien infiziert, um zum einen das Replikationsverhalten von $\Delta trpS/ ptrpS$ im Vergleich zum Wildtyp in Milz bzw. Leber zu beurteilen, zum anderen sollte die Effektivität beider Phagenlysin-Kassetten *in vivo* getestet werden. $\Delta trpS/$ pSP0- P_{CMV} , $\Delta trpS/$ pSP1- P_{CMV} , $\Delta trpS/$ pSP2- P_{CMV} sowie der Wildtyp-Stamm (*L.m.* EGD-e) wurden in MWB-Minimalmedium (siehe 5.2.2.2) bis zu einer $OD_{600} \approx 1$ kultiviert, 1 x mit MWB-Medium gewaschen und in 1/10 VT MWB-Medium resuspendiert. Je 5 Tiere konnten anschließend mit ca. 10^9 Bakterien/ Stamm orogastrisch infiziert werden, und 4 Tage nach Infektion wurde die Lebendbakterienzahl in Milz und Leber durch Ausplattieren von Verdünnungsreihen der Organsuspensionen bestimmt (Abbildung 5.42). Organsuspensionen der Tiere, welche mit den Stämmen $\Delta trpS/$ pSP1- P_{CMV} und $\Delta trpS/$ pSP2- P_{CMV} infiziert worden waren, wurden dabei komplett auf mehreren Platten verteilt ausplattiert.

Der Gentransfer-Stamm ohne Phagenlysin ($\Delta trpS/$ pSP0- P_{CMV}) erreichte eine ähnlich hohe Bakterienzahl in Leber und Milz von ca. 10^5 Bakterien pro Organ wie der Wildtyp, was bedeutet, dass die Plasmidabhängigkeit dieses Stammes die *in vivo* Replikation und Virulenz nicht beeinträchtigt. In Gegensatz zu den Zellkulturversuchen (siehe 5.2.2.3) konnten insgesamt nur drei Bakterien des Stammes $\Delta trpS/$ pSP1- P_{CMV} aus allen fünf Mäusen isoliert werden, Bakterien des Stammes $\Delta trpS/$ pSP2- P_{CMV} dagegen konnten 4 Tage nach Infektion gar nicht mehr detektiert werden.

Somit scheinen Phagenlysin-tragenden Gentransfer-Stämme $\Delta trpS/$ pSP1- P_{CMV} und $\Delta trpS/$ pSP2- P_{CMV} sehr stark Virulenz-attenuiert zu sein.

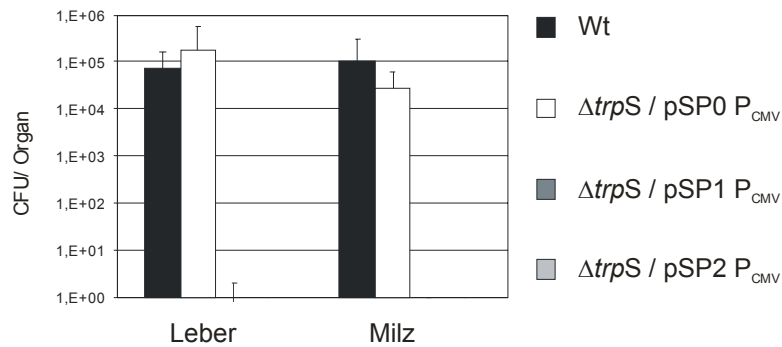


Abbildung 5.42: Orogastrische Infektion von BALB/c mit $\Delta trpS / pSP0 P_{CMV}$, $\Delta trpS / pSP1 P_{CMV}$ und $\Delta trpS / pSP2 P_{CMV}$ und Bestimmung der Bakterienzahlen in Milz und Leber (d 4 p.i.).

5.2.3 Untersuchungen zum Gentransfer mit den *L. monocytogenes* Stämmen $\Delta trpS / pSP0 P_{CMV}$, $\Delta trpS / pSP1 P_{CMV}$ und $\Delta trpS / pSP2 P_{CMV}$

5.2.3.1 *In vitro* Gentransfer-Effizienz der Stämme $\Delta trpS / pSP0 P_{CMV}$, $\Delta trpS / pSP1 P_{CMV}$ und $\Delta trpS / pSP2 P_{CMV}$ nach Infektion verschiedener Zelllinien

Die *L. monocytogenes* Gentransfer-Stämme besitzen auf dem stabilisierten Plasmid eine *NotI*-Schnittstelle, in die ein beliebiges Gen für ein Antigen oder ein Reporterprotein unter der Kontrolle des CMV-Promotors inseriert werden kann. J. Stritzker klonierte 2001 das Gen für das „enhanced green fluorescent protein“ EGFP in die *NotI*-Schnittstelle der Plasmide $pSP0 P_{CMV}$, $pSP1 P_{CMV}$ und $pSP2 P_{CMV}$, die resultierenden Plasmide bzw. Stämme bekamen die Bezeichnung $\Delta trpS / pSP0 P_{CMV} EGFP$, $\Delta trpS / pSP1 P_{CMV} EGFP$ und $\Delta trpS / pSP2 P_{CMV} EGFP$.

Für eine Infektion von Zell-Linien wurden diese drei EGFP-kodierenden Stämme in BHI-Medium + 50 mM Cellobiose bei 37°C bis 180 KE kultiviert, mit PBS + 50 mM Cellobiose gewaschen und in PBS/Glycerin + 50 mM Cellobiose bei -80°C bis zur Infektion gelagert. HeLa Zellen wurden in 24-Napf-Platten mit diesen drei Stämmen und einer MOI von ca. 50 für eine Stunde infiziert, danach dreimal mit PBS(Ca^{2+}/Mg^{2+}) gewaschen und in Gentamycin-haltigem RPMI/FKS weiter kultiviert.

24 Stunden nach Infektion wurde der Zellrasen mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskopes und einer Kamera fotografiert (Abbildung 5.43).

$\Delta trpS / pSP0 P_{CMV} EGFP$, der Stamm ohne Phagenlysin 118, ist in der Lage, Plasmid-DNA in Wirtszellen freizusetzen, so dass ein Teil der infizierten HeLa Zellen mehr oder weniger stark grün fluoresziert. $\Delta trpS / pSP1 P_{CMV} EGFP$ scheint mit Hilfe der Phagenlysin-Kassette eine höhere Gentransfer-Effizienz zu besitzen, da man augenscheinlich eine erheblich größere Anzahl an leuchtenden Zellen beobachten kann. Besonders die Anzahl an besonders stark leuchtenden HeLa

Zellen war ca. um das 5-fache erhöht. Überraschenderweise scheint der Stamm $\Delta trpS/$ pSP2- $P_{CMV}EGFP$, welcher das Phagenlysin 118 mit ActA-Signalpeptid kodiert, eine viel schlechtere Gentransfer-Effizienz als der Stamm ohne Phagenlysin zu besitzen. Anscheinend gelangen nicht genug Bakterien ins Zytoplasma der Zellen, um Plasmid-DNA zu transferieren; dies deckt sich mit den Ergebnissen in Kapitel 5.2.2.3, wo gezeigt werden konnte, dass dieser Stamm entweder vor Eintritt in die Zelle oder sehr rasch danach lysiert. Mit den Zell-Linien Caco-2 und P388.D1 konnten diese Ergebnisse ebenfalls bestätigt werden.

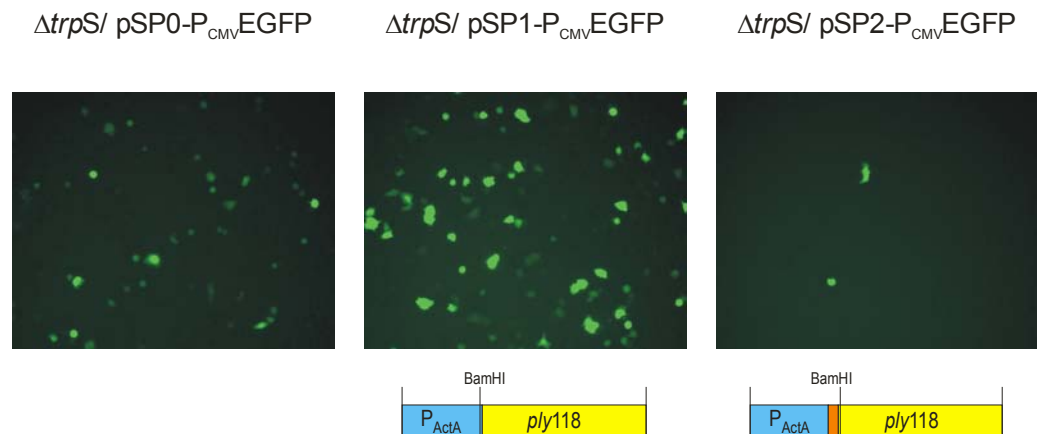


Abbildung 5.43: Gentransfer-Effizienz von $\Delta trpS/$ pSP0- $P_{CMV}EGFP$, $\Delta trpS/$ pSP1- $P_{CMV}EGFP$ und $\Delta trpS/$ pSP2- $P_{CMV}EGFP$ in HeLa Zellen.

5.2.3.2 Intrazelluläres Verhalten der Stämme $\Delta trpS/$ pSP0- P_{CMV} , $\Delta trpS/$ pSP1- P_{CMV} und $\Delta trpS/$ pSP2- P_{CMV} nach Infektion verschiedener Zell-Linien

Daten von J. Stritzker (Stritzker, 2001) sowie von Grillot-Courvalin *et al.*, 2002, zeigten deutlich, dass sich nicht nur die einzelnen *L. monocytogenes* Stämme, sondern auch die Zell-Linien erheblich in ihrer Gentransfer-Effizienz unterscheiden. Diese scheint in epithelialen, nicht-professionellen phagozytischen Zell-Linien wie Caco-2 und HeLa hoch zu sein, da ca. 10 % aller Zellen 24 Stunden (bei HeLa) bzw. 48 Stunden (bei Caco-2) nach Infektion durch EGFP-Expression im Fluoreszenzmikroskop aufleuchten. Betrachtet man dagegen J774.A1- oder P388.D1-Makrophagen, so liegt der Anteil an grün-fluoreszierenden Zellen unter 1 % (Dietrich *et al.*, 1998, Grillot-Courvalin *et al.*, 2002).

Um genauer zu untersuchen, warum erstens die neuen Gentransfer-Stämme so unterschiedlich viele Wirtszellen transfizieren und warum zweitens die Zelllinien so unterschiedlich reagieren, wurden Immunfluoreszenz-Versuche mit intrazellulär markierten Bakterien in Wirtszellen durchgeführt. $\Delta trpS/$ pSP0- $P_{CMV}EGFP$, $\Delta trpS/$ pSP1- $P_{CMV}EGFP$ und $\Delta trpS/$ pSP2- $P_{CMV}EGFP$ wurden zunächst mit Hilfe von Cellobiose für die Infektion von Zellen vorbereitet (siehe 5.2.3.1). HeLa, Caco-2 und

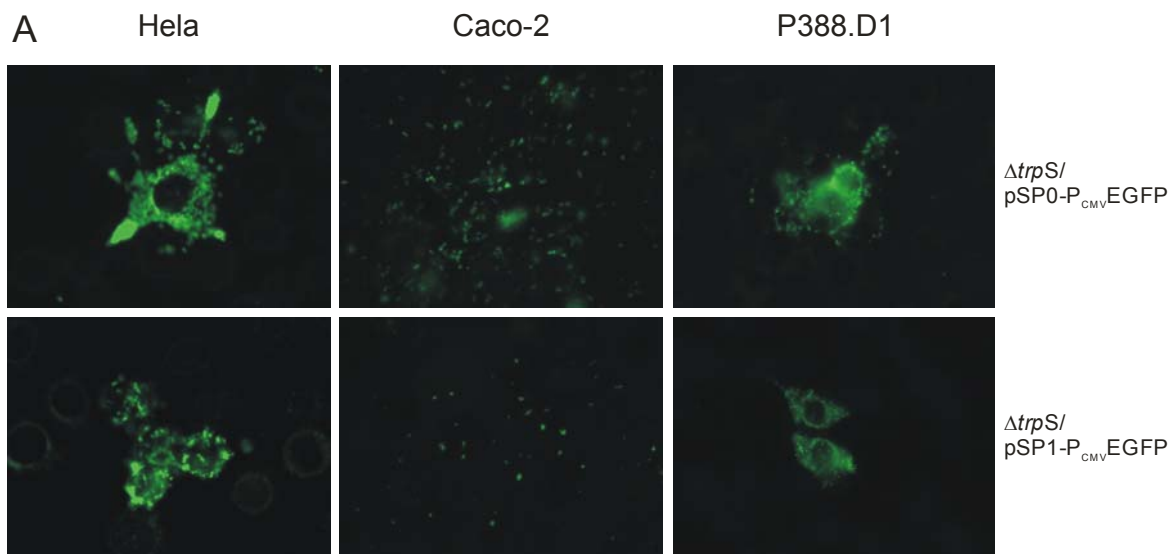
P388.D1 wurden mit einer niedrigen MOI dieser Stämme (HeLa und Caco-2 mit MOI=1, P388.D1 mit MOI=0,1) infiziert. Nach Fixierung des Zellrasens 12 Stunden bzw. 24 Stunden nach Infektion wurden die Zellen mit einem anti-ActA-Antiserum (Pfeuffer *et al.*, 2000) gefärbt, gefolgt von einer zweiten Inkubation mit einem Alexa Fluor-gekoppeltem Ziege-anti-Kaninchen-IgG(H+L) Konjugat.

Drei wichtige Beobachtungen konnten nach Mikroskopie dieser Präparate gemacht werden:

Betrachtet man erstens die Anzahl an intrazellulären Bakterien pro einer Wirtszelle, so befinden sich schon 12 Stunden nach Infektion mehr als 100 einzelne Bakterien in einer HeLa Zelle, 50-100 Bakterien in einer P388.D1 Zelle und nur wenige Bakterien (< 50) in einer Caco-2 Zelle, parallel dazu sieht man aber eine starke Verteilung („spreading“) der Bakterien im Caco-2 Zellrasen und nur kleine Bakterienfoci in HeLa und P388.D1. Diese Beobachtungen treffen auf alle drei Bakterienstämme, $\Delta trpS/$ pSP0- P_{CMV} EGFP, $\Delta trpS/$ pSP1- P_{CMV} EGFP (Abbildung 5.44 A) und $\Delta trpS/$ pSP2- P_{CMV} EGFP (nicht dokumentiert) gleichermaßen zu.

Zweitens, 24 Stunden nach Infektion konnte man (im Vergleich zu 12 h *p.i.*) bei allen drei Zell-Linien und bei allen drei Stämmen eine Vergrößerung der Infektionsherde beobachten, was bedeutet, dass auch die beiden Phagenlysin-tragenden Stämme zur intrazellulären Vermehrung und interzellulären Motilität in diesem Zeitfenster fähig sind. Auf Grund der hohen Bakteriendichte in HeLa und der dadurch deutlicheren Anfärbbarkeit durch anti-ActA-Antiserum wurde dieser Effekt hier nur anhand von HeLa Zellen dokumentiert (Abbildung 5.44 B).

Drittens, der Stamm $\Delta trpS/$ pSP1- P_{CMV} EGFP zeigte nach ActA-Färbung nicht die erwartete polare Verteilung des Proteins an den Zellpolen der Bakterien, sondern ein eher unregelmäßigeres Verteilungsmuster. Insgesamt schienen diese Bakterien auch viel schwächer angefärbt worden zu sein im Vergleich zu den Stämmen $\Delta trpS/$ pSP0- P_{CMV} EGFP und $\Delta trpS/$ pSP2- P_{CMV} EGFP. Besonders deutlich war dieser Effekt wiederum in HeLa Zellen zu beobachten (Abbildung 5.44 C).



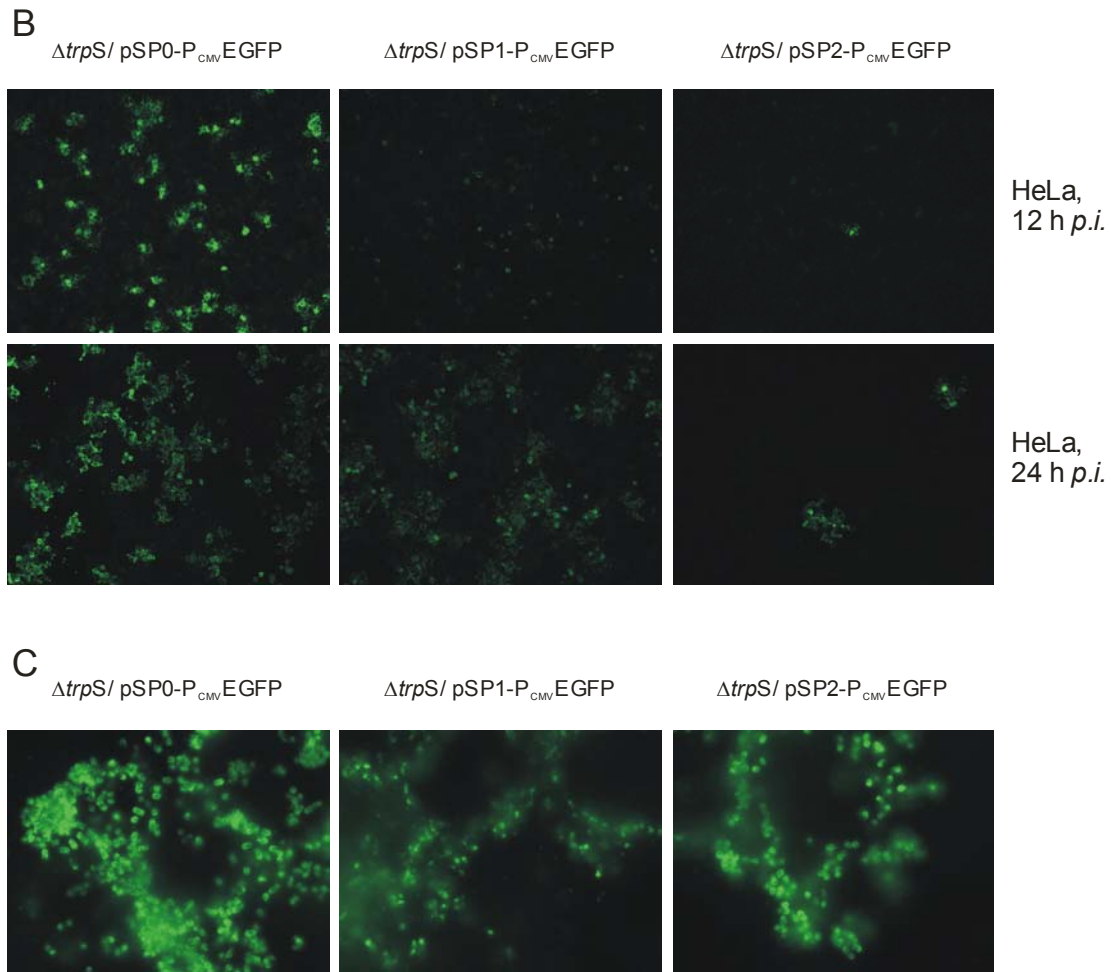


Abbildung 5.44: ActA-Markierung intrazellulärer Gentransfer-Stämme. (A) Verteilung von $\Delta trpS/$ pSP0-P_{CMV} und $\Delta trpS/$ pSP1-P_{CMV} im Zellrasen verschiedener Wirtszellen (40x Obj.). (B) Ausbreitung von $\Delta trpS/$ pSP0-P_{CMV}, $\Delta trpS/$ pSP1-P_{CMV} und $\Delta trpS/$ pSP2-P_{CMV} in HeLa Zellen, 12 und 24 h p.i. (10x Obj.). (C) ActA-Verteilung auf der Oberfläche intrazellulärer Bakterien (100x Obj.)

5.2.3.3 Können die Stämme $\Delta trpS/ pSP0-P_{CMV}$, $\Delta trpS/ pSP1-P_{CMV}$ und $\Delta trpS/ pSP2-P_{CMV}$ Aktin polymerisieren?

Da die Gentransfer-Stämme besonders in HeLa Zellen eine stark eingeschränkte interzelluläre Motilität aufzuweisen scheinen und der Stamm $\Delta trpS/ pSP1-P_{CMV}EGFP$ sich mit einem anti-ActA-Antiserum nur sehr unregelmäßig anfärben lässt, hat sich die Frage gestellt, ob alle drei Stämme in jeder Zelllinie gleichermaßen zelluläres Aktin zur Fortbewegung in benachbarte Zellen rekrutieren können.

HeLa, Caco-2 und P388.D1 Zellen wurden analog der in 5.2.3.2 beschriebenen Vorgehensweise mit den Stämmen $\Delta trpS/ pSP0-P_{CMV}EGFP$ und $\Delta trpS/ pSP1-P_{CMV}EGFP$ infiziert. 24 Stunden nach Infektion wurden die Zellen fixiert und mit anti-ActA-Antiserum und einem Alexa Fluor-Konjugat gefärbt, zusätzlich wurde noch eine Inkubation mit Phalloidin-TRITC zur Darstellung des zellulären Aktins durchgeführt.

Anhand der Aktinfärbung kann man bei allen drei Zell-Linien deutlich erkennen, dass viele intrazelluläre Bakterien Aktinschweife ausgebildet hatten und somit zur intrazellulären Bewegung und Ausbildung von Einstülpungen in benachbarte Zellen fähig sein sollten (Abb.5.21). Dennoch scheinen die Bakterien zwar in Caco-2 und P388.D1, aber nicht in HeLa Zellen diese sekundäre Invasion von Nachbarzellen auszuführen. Dieses Phänomen lässt sich am deutlichsten an den klaren Zellgrenzen zwischen stark mit Bakterien angefüllten Zellen und direkt daneben liegenden, leeren Zellen erkennen.

Bemerkenswert ist auch, dass Bakterien des Stammes $\Delta trpS/ pSP1-P_{CMV}EGFP$ viel häufiger mit Aktinschweifern versehen zu sein scheinen als Bakterien des Stammes ohne Phagenlysin, eventuell kommt dieser Effekt durch eine noch unregelmäßigere bzw. polarere ActA-Verteilung unter Phagenlysin-Einwirkung zustande.

Bei COS-1 Zellen (Nierenepithelzellen von grünen Meerkatzen), welche nach Infektion mit Gentransfer-Stämmen eine ähnlich hohe EGFP-Expressionsrate wie HeLa Zellen haben, konnte nach analog durchgeführten Immunfluoreszenzversuchen ein vergleichbares Verteilungsmuster an intrazellulären Bakterien wie bei Caco-2 Zellen beobachtet werden. Sowohl $\Delta trpS/ pSP0-P_{CMV}EGFP$ als auch $\Delta trpS/ pSP1-P_{CMV}EGFP$ Bakterien bewegen sich schnell innerhalb eines COS-1 Zellrasens und können Aktinschweife ausbilden.

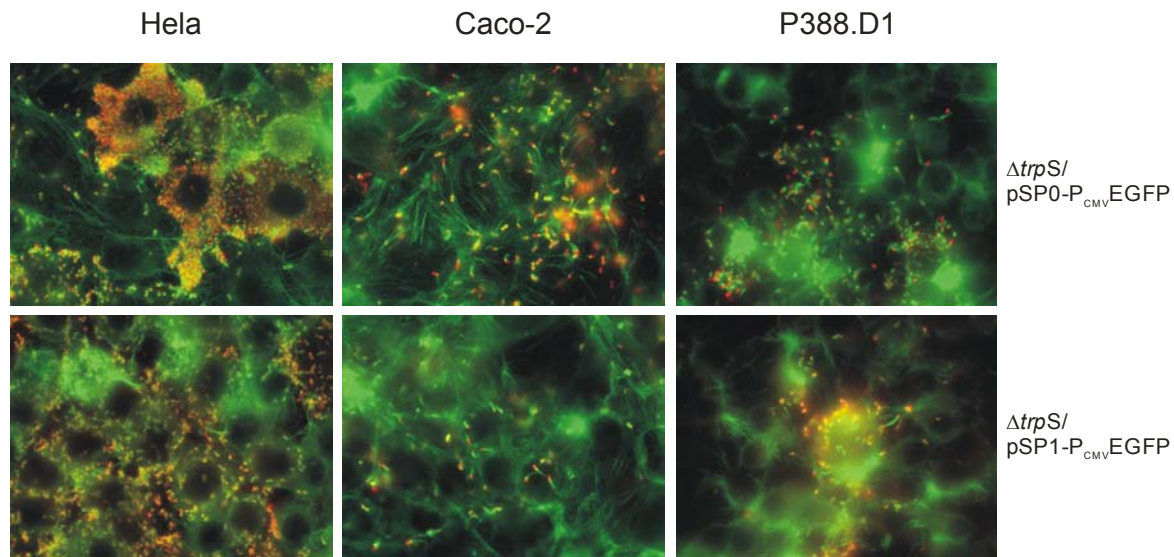


Abbildung 5.45: Anti-ActA- /Phalloidin- Färbung von intrazellulären Bakterien der Stämme $\Delta trpS/$ pSP0-P_{CMV} und $\Delta trpS/$ pSP1-P_{CMV}.

5.2.3.4 Kolokalisation von intrazellulären Bakterien der Stämme $\Delta trpS/$ pSP0-P_{CMV} und $\Delta trpS/$ pSP1-P_{CMV} mit DsRed-exprimierenden Wirtszellen

In den vorangehenden Immunfluoreszenz-Versuchen wurde festgestellt, dass die mit Phagenlysin ausgestatteten Gentransfer-Stämme $\Delta trpS/$ pSP1-P_{CMV}EGFP und $\Delta trpS/$ pSP2-P_{CMV}EGFP ähnlich schnell in Wirtszellen replizieren und in benachbarte Wirtszellen gelangen können wie der Stamm ohne Phagenlysin $\Delta trpS/$ pSP0-P_{CMV}EGFP. Nach Infektion mit diesen *Listeria*-Stämmen exprimieren ein Anteil der infizierten Zellen augenscheinlich EGFP. Daraus ergeben sich verschiedene Fragen: Warum erhöht sich die Gentransfer-Effizienz durch das Phagenlysin-Konstrukt des Stammes $\Delta trpS/$ pSP1-P_{CMV}EGFP, obwohl dieser Stamm nicht sichtbar innerhalb der Wirtszellen lysiert? Warum exprimieren einige Wirtszellen EGFP, während eine viel größere Anzahl an Zellen im Zellrasen mit *Listerien* infiziert ist? Zur Wirkung des Phagenlysins kann man sich vorstellen, dass einige der intrazellulären Bakterien pro Zelle sterben und DNA freisetzen, während der Rest der Bakterien weiter wächst, oder dass in einigen Zellen die Bakterien verstärkt absterben und dort später der Gentransfer durch EGFP-Expression sichtbar wird. Diese Frage kann man nur durch Kolokalisation von intrazellulären, lebenden Bakterien und EGFP-Expression als Marker für erfolgreichen Gentransfer beantworten.

Listerien können im Zytosol von Wirtszellen ohne weitere Färbetechniken in Echtzeit lokalisiert werden, wenn sie mit einem Plasmid ausgestattet sind, welches ein Bakterien-adaptiertes GFP (GFPmut2, Cormack *et al.*, 1995) unter der Kontrolle eines listeriellen, zytosolischen Promotors wie P_{actA} oder P_{hpt} exprimiert (Dietrich *et al.*, 1998, Beck, 2002). Diese Bakterien beginnen ca. 2-4

Stunden nach Infektion, im Zytosol der Wirtszellen grün zu fluoreszieren. Um einen Marker zu erhalten, der sich von der Grünfluoreszenz der Bakterien deutlich unterscheidet, wurde das Gen *rfp* für das rot-fluoreszierende Protein DsRed in die Plasmide pSP0- P_{CMV} und pSP1- P_{CMV} kloniert. Dazu wurde *rfp* inklusive einer Translations-Initiationsregion vom Plasmid pDsRed-N1 (Fa. BD Biosciences Clontech) mit Hilfe der Oligonukleotide DsRed-NotI-for und DsRed-NotI-rev amplifiziert, mit *NotI* gespalten und in die *NotI*-Schnittstellen der Plasmide inseriert, resultierend in pSP0- P_{CMV} DsRed und pSP1- P_{CMV} DsRed.

Die Stämme $\Delta trpS/$ pSP0- P_{CMV} DsRed und $\Delta trpS/$ pSP1- P_{CMV} DsRed wurden zusätzlich mit dem Plasmiden $P_{hpt-gfp}$ oder $P_{actA-gfp}$ transformiert, anschließend wurden HeLa Zellen mit einer MOI von 5 dieser Bakterien infiziert. 36 Stunden ($P_{hpt-gfp}$) bzw. 48 Stunden ($P_{actA-gfp}$) nach Infektion konnten sowohl grün leuchtende, intrazelluläre Bakterienherde als auch gleichzeitig rot-fluoreszierende, DsRed-exprimierende HeLa Zellen dokumentiert werden (Abbildung 5.46). Dabei wurden mehr rot leuchtende Zellen nach Infektion mit $\Delta trpS/$ pSP1- P_{CMV} DsRed, dem Stamm mit $P_{actA-ply118}$, beobachtet als nach Infektion mit dem Stamm ohne Phagenlysin 118. Einige DsRed-exprimierende Zellen waren dabei nicht kolokalisiert mit $P_{hpt-gfp}$ -exprimierenden, grün leuchtenden Bakterienherden, was auf einen Verlust des Plasmides $P_{hpt-gfp}$ vor Infektion hinweist. Andere DsRed-exprimierende Zellen lagen an oder in grünen fluoreszierenden Infektionsherden, waren aber selbst nie mit einer hohen Zahl an intrazellulären, grün leuchtenden Bakterien ausgefüllt. Selten konnten einzelne Bakterien mit diesen Zellen kolokalisiert werden. Da diese Beobachtungen für beide Stämme gemacht werden konnten, scheint diese Art von Gentransfer eine Folge sowohl einer Phagenlysin-unabhängigen als auch einer durch Phagenlysin verstärkten Bakterienlysis zu sein.

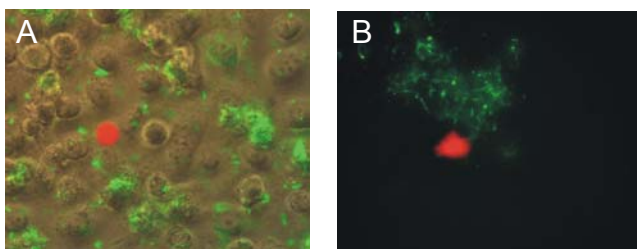


Abbildung 5.46: DsRed-Expression von HeLa-Zellen, welche mit GFP-markierten Bakterien der Stämme (A) $\Delta trpS/$ pSP0- P_{CMV} / $P_{actA-gfp}$ und (B) $\Delta trpS/$ pSP1- P_{CMV} / $P_{hpt-gfp}$ infiziert worden sind.

5.2.3.5 Abhängigkeit der *in vitro* Gentransfer-Effizienz von der Gentamycin-Konzentration

Schwankende Ergebnisse in verschiedenen, hier nicht weiter beschriebenen Gentransfer-Versuchen gaben den Anlass, die Gentransfer-Effizienz der Stämme $\Delta trpS/$ pSP0- P_{CMV} EGFP und $\Delta trpS/$ pSP1- P_{CMV} EGFP in Abhängigkeit von der verwendeten Gentamycin-Konzentration zu untersuchen. Zellmembranen von Säugetierzellen sind relativ undurchlässig für Gentamycin

(Vandaux und Waldvogel, 1979), daher überleben nach Zugabe von Gentamycin im Zellkultur-Medium normalerweise nur intrazellulär lokalisierte Bakterien. Die optimale Gentamycin-Konzentration für eine hohe Gentransfer-Effizienz war bislang noch nicht bestimmt worden, in vorangegangenen Versuchen ist aber oftmals eine Konzentration von 100 $\mu\text{g/ml}$ Gentamycin für eine Kulturzeit von 24-48 Stunden verwendet worden.

Caco-2 Zellen wurden mit einer MOI von 5 der Stämme $\Delta trpS/ pSP0\text{-}P_{CMV}EGFP$ und $\Delta trpS/ pSP1\text{-}P_{CMV}EGFP$ für eine Stunde infiziert. Nach einigen Wasch-Schritten wurden die infizierten Zellen für 48 Stunden in RPMI/FKS mit verschiedenen Gentamycin-Konzentrationen (5-100 $\mu\text{g/ml}$) kultiviert. Anschließend wurden die Zellen trypsiniert, in PBS aufgenommen und nach einer 7-Actinomycin D-Färbung (7-AAD), sofort mit dem Durchfluss-Zytometer gemessen.

Wie aus Abbildung 5.47 A zu entnehmen ist, nimmt die Gentransfer-Effizienz des Stammes $\Delta trpS/ pSP1\text{-}P_{CMV}EGFP$ mit zunehmender Gentamycin-Konzentration ab, während der Stamm $\Delta trpS/ pSP0\text{-}P_{CMV}EGFP$ sein Optimum bei 40 $\mu\text{g/ml}$ Gentamycin hat. Dies scheint mit der hohen Anzahl an toten Zellen bei niedrigeren Gentamycin-Konzentrationen zusammenzuhängen (Abb. 5.47 B). Eine Gentamycin-Konzentration von 5 $\mu\text{g/ml}$ dagegen scheint extrazelluläre Bakterien nicht ausreichend abzutöten, da bei dieser Konzentration der Anteil an toten Caco-2 Zellen (besonders nach Infektion mit $\Delta trpS/ pSP1\text{-}P_{CMV}EGFP$) besonders hoch ist (Abb. 5.47 B). Dieses Phänomen weist auf eine hohe Rate an Re-Infektionen hin. Ab einer Konzentration von 40 $\mu\text{g/ml}$ scheint Gentamycin auch einige intrazelluläre Bakterien zu töten, was man aus Abb. 5.47 B entnehmen kann, da ab dieser Konzentration der Anteil an toten Caco-2 Zellen stark absinkt. Da die optimale Gentamycin-Konzentration für Langzeit-Infektionen zwischen 5 $\mu\text{g/ml}$ und 40 $\mu\text{g/ml}$ zu liegen scheint, wurde in nachfolgenden Gentransfer-Versuchen die Infektion zunächst für eine Stunde mit 100 $\mu\text{g/ml}$ gestoppt und die Zellen für die restliche Kulturdauer mit 15 $\mu\text{g/ml}$ Gentamycin behandelt.

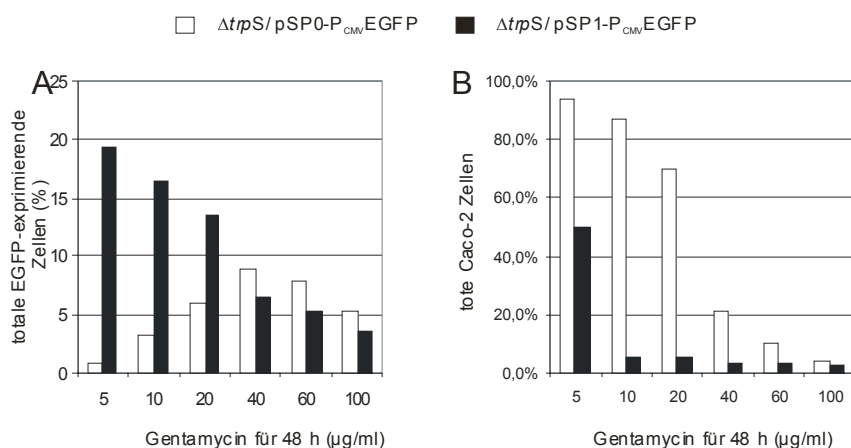


Abbildung 5.47: Abhängigkeit des *in vitro* Gentransfers von der Gentamycin-Konzentration. (A) Anzahl der totalen EGFP-exprimierenden Caco-2 Zellen bei verschiedenen Gentamycin-Konzentrationen nach Infektion mit $\Delta trpS/ pSP0\text{-}P_{CMV}EGFP$ und $\Delta trpS/ pSP1\text{-}P_{CMV}EGFP$. (B) Anzahl der toten Caco-2 Zellen.

5.2.4 Gentransfer mit attenuierten *Listeria monocytogenes* Stämmen

5.2.4.1 Virulenz-Attenuation durch Deletion von *actA* oder *iap*

Für den Einsatz als Vektor von DNA-Vakzinen muss *L. monocytogenes* $\Delta trpS$ bezüglich seiner Virulenz attenuiert sein, sollte aber trotzdem noch professionelle Antigen-präsentierende Zellen wie Dendritische Zellen infizieren können. Am Modell der experimentellen murinen Listeriose konnte bereits gezeigt werden, dass die Deletionsmutante $\Delta trpS$, welche auf Grund der *trpS*-Trans-Komplementierung einem *L. monocytogenes* Wildtyp entspricht, nicht Virulenz-attenuiert ist (siehe 5.2.2.5). Dagegen wird dieser Stamm durch beide getesteten Phagenlysin-Kassetten P_{actA} -ply118 und P_{actA} -SP_{*actA*}-ply118 hochgradig attenuiert.

Bei einem anderen Wirt, wie z.B. dem Menschen, folgt *L. monocytogenes* als humanpathogener Erreger aber anderen Infektionsrouten durch den Wirtsorganismus und kann den menschlichen Wirt wahrscheinlich mit einer niedrigeren Infektionsdosis stärker infizieren, so dass eine weitere Virulenz-Attenuation sinnvoll sein könnte.

Eine einfach zu erreichende Virulenz-Attenuation des Stammes $\Delta trpS$ wäre die zusätzliche Deletion von $\Delta actA$ oder Δiap . Δiap konnte in dieser Arbeit als eine in der Maus um 2-3 log Stufen attenuierte Mutante charakterisiert werden, welche durch ihre eingeschränkte interzelluläre Motilität in ihrer Virulenz in einem ähnlichen Ausmaß wie $\Delta actA$ beeinträchtigt ist (siehe Kapitel 5.1.1).

Die Inaktivierung von ActA und die damit zusammenhängende Virulenz-Attenuation in der Maus wurden sowohl von Brundage *et al.*, 1992 und Goossens und Milon, 1993, beschrieben, wobei eine ActA-defizienter Stamm um ca. 3 log Stufen in der Maus attenuiert ist.

Daher wurden zur Einführung von zusätzlichen Virulenz-Attenuationen in diesen Stamm die *L. monocytogenes* Deletionsmutanten Δiap und $\Delta actA$ nochmals in einem Vorversuch getestet, ob man sie – trotz niedriger Bakterienzahlen in Milz und Leber – in ausreichender Zahl in den Peyer'schen Platten wiederfinden kann. Die Vorstellung war, dass DNA-Vakzine tragende Listerien in diesem, dem MALT zugehörigen lymphatischen Gewebe den ersten Kontakt mit professionellen Antigen-präsentierenden Zellen herstellen, indem sie dort von Makrophagen und Dendritischen Zellen phagozytiert werden, sich aus dem Phagosomen befreien und somit Vakzine-DNA im Zytosol dieser Zellen freisetzen können.

BALB/c Mäuse wurden in Gruppen von fünf Tieren mit jeweils 1×10^9 Bakterien aus 36 h-Kulturen der *L. monocytogenes* Stämme EGD Sv1/2a (Wt), Δiap (ohne Plasmid) und $\Delta actA$ orogastrisch infiziert (Abbildung 5.48). Nach 1, 3, 5 und 7 Tagen *p.i.* wurden den Tieren Leber, Milz und 6 Peyer'sche Platten entnommen, um anhand der Bakterienzahlen in Leber und Milz zu

beurteilen, wie stark die Virulenz der einzelnen Stämme ist. Die Bakterienzahlen in den Peyer'schen Platten wurden bestimmt, um zu sehen, ob die einzelnen Stämme die Darmbarriere überwinden können, um zu ihren Zielzellen zu gelangen.

Im Vergleich zu den wildtypischen Bakterien lag die Anzahl der Δiap - und $\Delta actA$ -Bakterien in Leber und Milz durchschnittlich um 2 Log-Stufen niedriger. Besonders stark schien die Attenuation in der Leber ausgeprägt zu sein, hier konnten am Tag 7 nach Infektion sowohl Δiap als auch $\Delta actA$ nicht mehr nachgewiesen werden. In den Peyer'schen Platten ließen sich dagegen zu allen Zeitpunkten und nach Infektion mit allen drei Stämmen ähnlich viele Bakterien nachweisen. Alle Beobachtungen deuteten darauf hin, dass beide Deletionsmutanten nur bezüglich ihrer interzellulären Verbreitung (besonders in der Leber) und nicht in ihrer *in vivo* Invasivität stark eingeschränkt sind. Sowohl Δiap als auch $\Delta actA$ schienen damit als Vektoren von Antigen-exprimierenden Plasmiden für eine Infektion von Mäusen in Frage zu kommen.

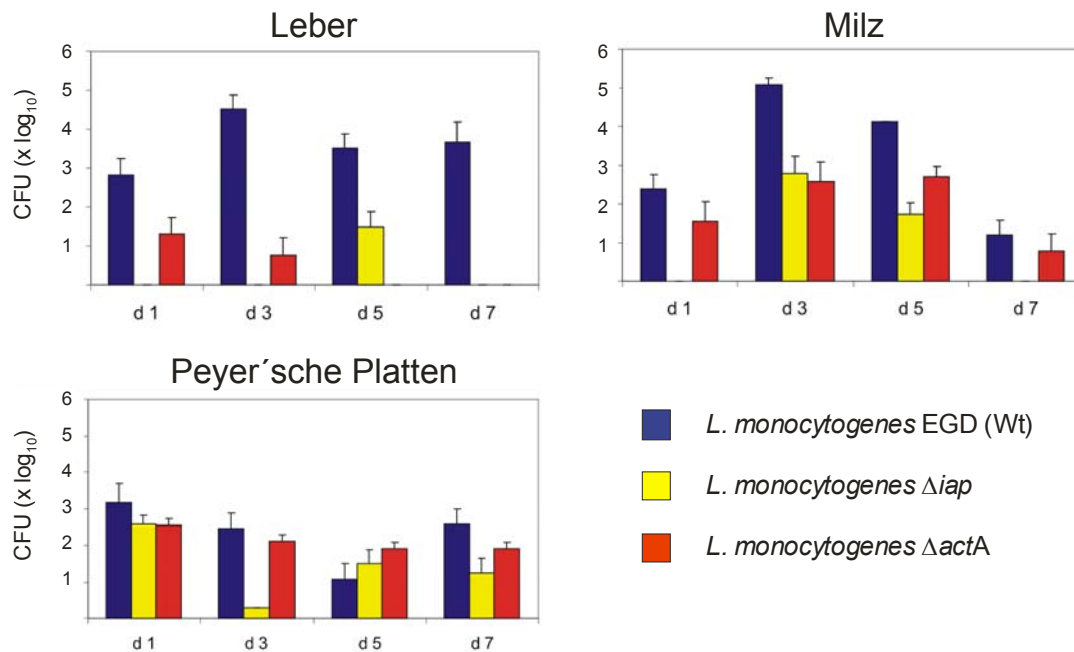


Abbildung 48: Infektion von BALB/c mit *L. monocytogenes* Wt, Δiap und $\Delta actA$. Bestimmung der Bakterienzahlen in Leber, Milz und Peyer'schen Platten, 1-7 Tage *p.i.*

5.2.4.2 Konstruktion der *L. monocytogenes* Deletionsmutanten $\Delta actA \Delta trpS/ pFLO-trpS$ und $\Delta iap \Delta trpS/ pFLO-trpS$

Bei der im vorangegangenen Versuch verwendeten *actA*-Deletionsmutante (Hauf *et al.*, 1997) umfasste die Deletion nur einen Teil des Leserahmens von *actA*. In der neuen $\Delta actA \Delta trpS/ pFLO-trpS$ Deletionsmutante sollte dagegen die komplette kodierende Sequenz von *ActA* deletiert werden. Die Konstruktion des Mutagenese-Plasmides pLSVactAdelAB erfolgte analog der

Konstruktion der Mutageneseplasmide für Δiap (siehe 5.1.1.1) und $\Delta trpS$ (siehe 5.2.1.4). Das stromaufwärts vom Deletions-Locus gelegene Fragment actAdelA (467 bp) wurde mit den Oligonukleotiden actA-delAfor und actA-delArev amplifiziert und das stromabwärts liegende Fragment actAdelB (346 bp) mit den Oligonukleotiden actA-delBfor und actA-delBrev. Beide Fragmente konnten mit *PspAI* geschnitten, miteinander ligiert, und nochmals mit den randständigen Oligonukleotiden (actA-delAfor, actA-delBrev) des ligierten Fragmentes actAdelAB neu amplifiziert werden. Nach Spaltung von actAdelAB und pLSV1 mit *EcoRI* und *BamHI* konnte das Fragment diesmal direkt in das Mutagenese-Basisplasmid pLSV-1 inseriert werden. pLSVactAdelAB und pLSV-C2+D (Δiap -Mutagenese-Plasmid, siehe 5.1.1.1) wurden jeweils in den Stamm $\Delta trpS$ / pFLO-*trpS* transformiert. Mit der Technik der doppelten homologen Rekombination konnten die neuen *L. monocytogenes* Zweifach-Deletionsmutanten $\Delta actA \Delta trpS$ / pFLO-*trpS* und $\Delta iap \Delta trpS$ / pFLO-*trpS* hergestellt werden.

5.2.4.3 Immunfluoreszenz-Analysen von $\Delta actA \Delta trpS$ und $\Delta iap \Delta trpS$

Zur Beurteilung der interzellulären Motilität („spreading“) wurden die neuen Stämme $\Delta trpS$, $\Delta actA \Delta trpS$ und $\Delta iap \Delta trpS$ mit den Plasmiden pSP0-P_{CMV} und pSP1-P_{CMV} ausgestattet (durch Austausch von pFLO-*trpS* gegen die pSP-Plasmide). Caco-2 Zellen wurden für 48 Stunden mit den resultierenden sechs Stämmen (MOI=10) infiziert, anschließend fixiert und mit einem Maus-Antiserum gerichtet gegen komplettes *L. monocytogenes*-Lysat gefärbt (Abbildung 5.49).

In Abbildung 5.49 A ist zu erkennen, dass die Stämme $\Delta trpS$ / pSP0-P_{CMV} und $\Delta trpS$ / pSP1-P_{CMV} nach 48 h den Caco-2-Zellrasen vollständig und gleichmäßig infiziert hatten, ein Phänomen, welches auf die Fähigkeit der interzellulären Motilität von wildtypischen Listerien zurückzuführen ist.

$\Delta actA \Delta trpS$ und $\Delta iap \Delta trpS$ waren jedoch nicht in der Lage, diese Art der Ausbreitung auszuführen. $\Delta actA \Delta trpS$ war nach 48 Stunden immer noch in den primär infizierten Zellen lokalisiert, während man bei dem Stamm $\Delta iap \Delta trpS$ / pSP0-P_{CMV} eine zwar stark eingeschränkte, aber dennoch leicht vorhandene interzelluläre Motilität beobachten konnte.

Einen besonders interessanten Effekt konnte man bei der Infektion mit dem Stamm $\Delta iap \Delta trpS$ / pSP1-P_{CMV} beobachten: Dort war das so genannte „spreading“ viel ausgeprägter als bei $\Delta iap \Delta trpS$ / pSP0-P_{CMV} (Abb. 5.49 B). Die auf Grund der Δiap -Deletion eingeschränkte Fähigkeit zur interzellulären Motilität, welche auf eine nicht-polare Verteilung des ActA-Proteins bei intrazellulären Bakterien zurückzuführen ist (siehe 5.1.1.10), schien hier zumindest teilweise durch die Beteiligung von Phagenlysin 118 (P_{actA}-ply118) aufgehoben zu sein.

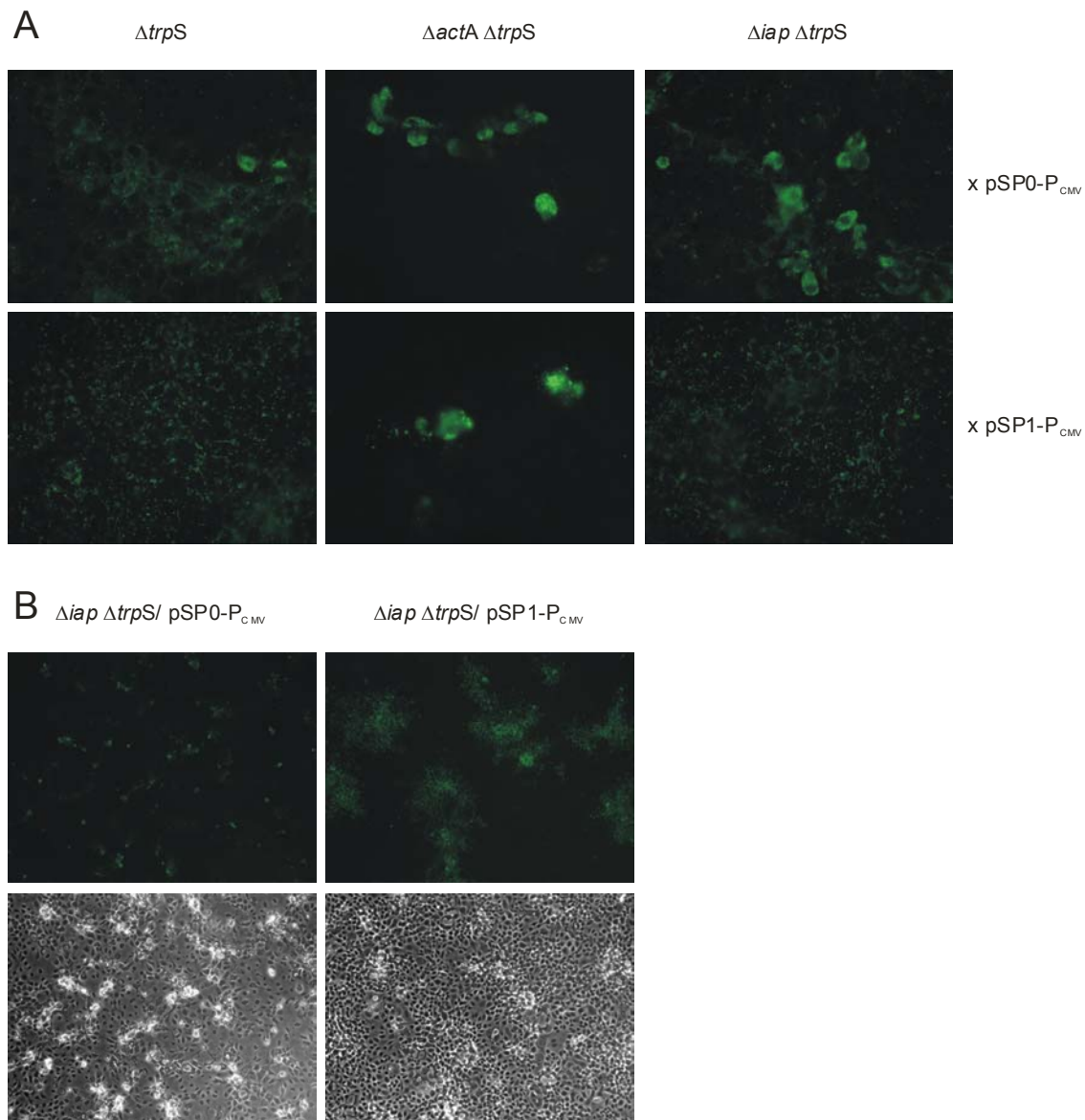


Abbildung 5.49: FITC-Markierung intrazellulärer Bakterien der attenuierten Gentransfer-Stämme $\Delta iap \Delta trpS$ und $\Delta actA \Delta trpS$. (A) Verteilung von $\Delta actA \Delta trpS$ und $\Delta iap \Delta trpS$ mit oder ohne $P_{actA-ply118}$ im Zellrasen von Caco-2 (40x Obj.). (B) Interzelluläre Motilität von $\Delta iap \Delta trpS$ in Abhängigkeit von $P_{actA-ply118}$ (10x Obj.).

5.2.4.4 Untersuchungen zum Gentransfer mit $\Delta actA \Delta trpS$ und $\Delta iap \Delta trpS$

Mit den Stämmen $\Delta trpS$, $\Delta actA \Delta trpS$ und $\Delta iap \Delta trpS$, welche jeweils die Plasmide pSP0-P_{CMV}EGFP und pSP1-P_{CMV}EGFP trugen, wurden HeLa-Zellen (MOI=5), Caco-2 (MOI=10) und P388.D1 Makrophagen (MOI=5) in Doppelansätzen infiziert. 48 Stunden nach Infektion konnten die EGFP-exprimierenden Zellen mit dem Durchflusszytometer gemessen werden. Bei dieser Messung wurden die toten Zellen nicht gegengefärbt, sondern mit Hilfe von „forward-scatter“ (FS) und „side-scatter“ (SS) von den lebenden Zellen aufgrund ihrer Morphologie aus der Messung ausgeschlossen. Außerdem fand die Infektion für 48 Stunden in Anwesenheit von 100 µg/ml

Gentamycin statt, so dass der Gentransfer im Allgemeinen sehr niedrig ausgefallen ist (siehe 5.2.3.5).

In Abbildung 5.50 ist zu sehen, dass die höchste Gentransferrate bei allen Zell-Linien mit den zum „spreading“ fähigen Stämmen $\Delta trpS/$ pSP0-P_{CMV}EGFP und $\Delta trpS/$ pSP1-P_{CMV}EGFP erreicht worden ist. In HeLa und P388.D1 Zellen fiel unter Verwendung von $\Delta iap \Delta trpS$ die Anzahl an EGFP-exprimierenden Zellen auf 1/10 ab, während nach Infektionen mit $\Delta actA \Delta trpS$ der Gentransfer unterhalb der Nachweisgrenze lag. $\Delta iap \Delta trpS$ und $\Delta actA \Delta trpS$ eignen sich daher wahrscheinlich nicht als attenuierte Gentransfer-Stämme.

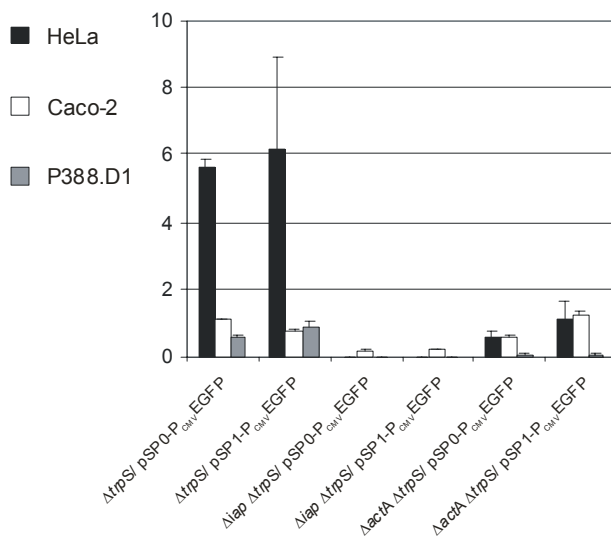


Abbildung 5.50: Gentransfer-Effizienz der attenuierten Stämme $\Delta iap \Delta trpS$ und $\Delta actA \Delta trpS$ in verschiedenen Wirtszell-Linien.

5.2.4.5 Bedeutung der interzellulären Motilität beim Gentransfer

Im vorangegangenen Experiment ist beschrieben worden, dass $\Delta actA \Delta trpS$ und $\Delta iap \Delta trpS$ beide im Vergleich zum Wildtyp ($\Delta trpS$) eine verminderte Gentransfer-Effizienz besitzen. Dieser Nachteil könnte bei der $\Delta actA \Delta trpS$ -Deletionsmutante durch die nicht vorhandene interzelluläre Motilität entstanden sein, da nur die primär infizierten Zellen eine Möglichkeit hatten, EGFP zu exprimieren, während beim wildtypischen Stamm im Verlauf der Infektion fast alle Zellen im Zellrasen Kontakt mit den Bakterien bekamen. Um diesen „Nachteil“ auszugleichen, wurden im nächsten Experiment Caco-2 Zellen sowohl mit einer MOI von 5 als auch mit einer MOI von 100 mit Bakterien des Stammes $\Delta actA \Delta trpS$ infiziert (und als Kontrolle mit $\Delta trpS$, MOI=5). Beide Stämme waren mit den Plasmiden pSP0-P_{CMV}EGFP2 und pSP1-P_{CMV}EGFP transformiert. Zwei Stunden nach Infektion wurde die Anzahl der intrazellulären Bakterien durch Ausplattieren bestimmt, während 48 Stunden nach Infektion die EGFP-exprimierenden Zellen mit dem Durchflusszytometer gemessen wurden (ca. 100.000 Zellen pro Messung). Vor der Messung wurde

zusätzlich eine 7-AAD-Färbung durchgeführt, um die für diesen DNA-Farbstoff permeablen und damit toten Zellen zu erfassen (Abbildung 5.51).

Zwei Stunden nach Infektion wurden bei allen Infektionsansätzen, welche mit einer MOI von 5 durchgeführt worden sind, in ca. 500.000 Caco-2 Zellen zwischen 130.000 und 300.000 Bakterien gefunden. Die Auswertung der Infektionen, welche mit einer MOI von 100 entstanden sind, ergaben beim Stamm $\Delta actA \Delta trpS/ pSP0-P_{CMV}EGFP$ $3,7 \times 10^6$ und beim Stamm $\Delta actA \Delta trpS/ pSP1-P_{CMV}EGFP$ $1,7 \times 10^6$ intrazelluläre Bakterien (Abb. 5.51 A), also ca. 10x so viele Bakterien. Bei diesen beiden Infektionsansätzen schienen damit sehr viel mehr Caco-2 Zellen primär infiziert worden zu sein, als bei den Infektionsansätzen mit der niedrigeren MOI, was auch durch den stark erhöhten Anteil an toten Caco-2 Zellen im Infektionsansatz deutlich wird (Abb. 5.51 C).

Diese hohe Anzahl an infizierten Zellen, welche sich auf Grund der fehlenden interzellulären Motilität der $\Delta actA$ -Deletionsmutanten im Verlauf der Infektion auch nicht mehr erhöhen kann, lag vermutlich annähernd in der gleichen Größenordnung wie die Anzahl der vom Wildtyp ($\Delta trpS$) nach ca. 24 Stunden durch „spreading“ infizierten Zellen. Somit konnten annähernd gleiche Voraussetzungen – zumindest die Anzahl an infizierten Zellen betreffend – bei wildtypischen und $\Delta actA$ -Bakterien für den Gentransfer geschaffen werden. Trotzdem lag die Gentransfer-Effizienz der $\Delta actA$ -Mutanten bei beiden MOIs sehr viel niedriger als beim Wildtyp bei niedriger MOI (Abb. 5.51 B). D.h., auch eine höhere Anzahl an infizierten Zellen kann die Effizienz der $\Delta actA$ -Mutante nicht deutlich erhöhen.

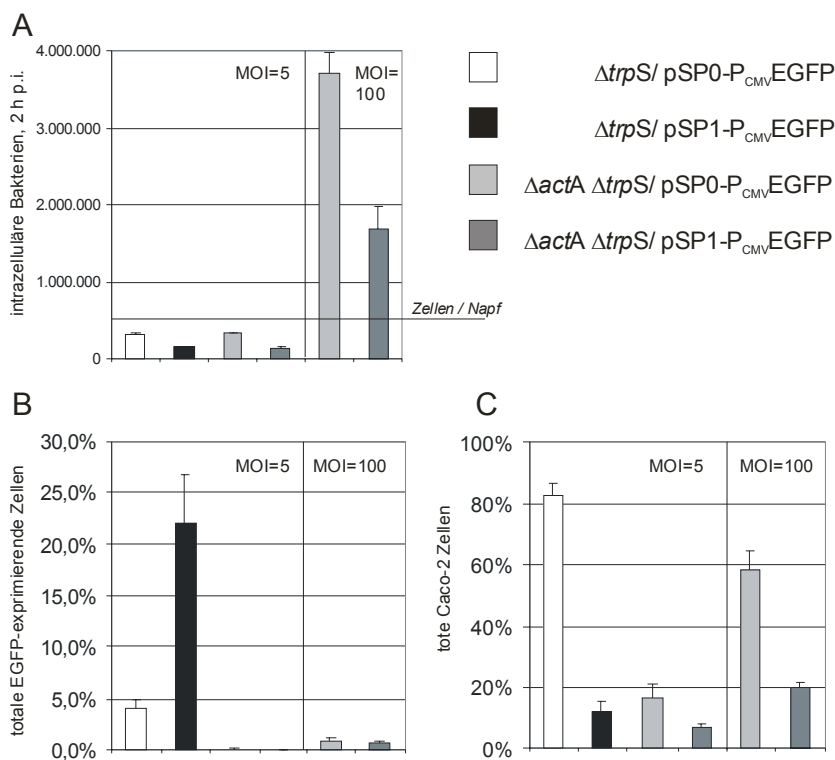


Abbildung 5.51: Gentransfer-Effizienz in Abhängigkeit von intrazellulärer Motilität. Caco-2 Zellen wurden für 48 h mit $\Delta trpS$ sowie $\Delta actA \Delta trpS$ infiziert (+/- P_{actA} -ply118). (A) Bestimmung der intrazellulären Bakterien 2 h p.i. (B) Durchfluss-Zytometrische Bestimmung totaler EGFP-exprimierender Zellen, 48 h p.i. (C) Messung von toten (7-AAD-positiven) Zellen, 48 h p.i.

Wie in vorangegangenen Versuchen (siehe Abb. 5.49 A) schon festgestellt wurde, befinden sich normalerweise nur wenige wildtypische Bakterien in einer einzelnen Caco-2 Zelle, Bakterien mit *actA*- Deletion hingegen werden stark in den primär infizierten Zellen angereichert. Dies lässt zusätzlich den Schluss zu, dass bei annähernd gleicher Anzahl an infizierten Zellen (wie bei den Infektionen mit niedriger MOI des Wildtyps und hoher MOI der $\Delta actA$ -Mutante erreicht) es trotzdem keinen Vorteil bezüglich des Gentransfers bringt, ob sich sehr viele Bakterien (und somit auch viel Plasmid-DNA) in einer einzelnen Zelle befindet.

Letztendlich kann anhand dieses Experimentes die Hypothese aufgestellt werden, dass der Vorgang des so genannten „spreadings“ wichtig oder notwendig für den Gentransfer von Plasmid-DNA von Listerien in Caco-2 Zellen zu sein scheint.

5.2.5 Gentransfer mit alternativen Phagenlysin-Konstrukten

Die in den vorangegangenen Kapiteln näher beschriebenen Phagenlysin-Konstrukte schienen beide noch nicht optimal in den Gentransfer-Experimenten zu funktionieren. Die Kasette P_{actA} -*ply118*, bei der das Gen für das Phagenlysin 118 unter der Kontrolle des ActA-Promotors von *L. monocytogenes* steht, zeigt zwar eine hohe Gentransfer-Effizienz (siehe 5.2.3.1) und *in vivo* Virulenz-Attenuation (siehe 5.2.2.5), jedoch *in vitro* konnte beobachtet werden, dass intrazelluläre Bakterien scheinbar erst sehr spät in Verlauf einer Infektion und dann auch nur teilweise lysiert wurden (siehe 5.2.2.3 und 5.2.3.2).

Die zweite Lysis-Kasette P_{actA} - SP_{actA} -*ply118*, bei der nicht nur der ActA-Promotor sondern auch das ActA-Signalpeptid mit dem Phagenlysin-Gen fusioniert worden ist, bewirkte eine deutlich zum Vergleichsstamm ohne Phagenlysingen reduzierte intrazelluläre Bakterienzahl (siehe 5.2.2.3) und Gentransfer-Effizienz (siehe 5.2.3.1). Diese Effekte wurden wahrscheinlich durch eine unerwünschte, extrazelluläre Aktivität des *actA*-Promotors ausgelöst, was zur Folge hat, dass die Bakterien schon vor Eintritt ins Zytosol lysiert werden.

Zur Optimierung der durch Phagenlysin ausgelösten Lysis der Listerien wurden zum einen bei der Kasette P_{actA} - SP_{actA} -*ply118* der *actA*-Promotor durch den Promotor des Genes *hpt* ausgetauscht. *Hpt* codiert für einen Transporter für phosphorelierte Hexosen und Ribosen, dessen Promotor PrfA-abhängig aktiviert wird und im Zytosol von eukaryotischen Zellen aktiv ist. M. Beck konnte im Rahmen seiner Doktorarbeit nachweisen, dass dieser Promotor im Vergleich zum *actA*-Promotor extrazellulär kaum aktiviert wird.

Im Rahmen einer Kooperationsarbeit mit Herrn Dr. Loessner, TU München, wurde zum anderen auch ein alternatives Phagenlysin des Phagen 511 getestet. Dieses Phagenlysin 511 besitzt als N-Acetylmuramoyl-L-Alanin Amidase eine andere Substratspezifität als das Phagenlysin 118, zusätzlich konnte ebenfalls eine verkürzte Form dieses Lysins (*ply511ΔC*) getestet werden, welche

eine stark erhöhte lytische Aktivität aufweist (Gaenge *et al.*, 2000). Diese beiden Phagenlysine wurden jeweils ohne *actA*-Signalpeptid kloniert.

5.2.5.1. Klonierung von P_{hpt} - SP_{actA} -*ply*118, P_{actA} -*ply*511 und P_{actA} -*ply*511 Δ C

Der Fusion der Promotorsequenzen mit den verschiedenen Phagenlysin-Genen erfolgte mit Hilfe der Technik der rekombinanten PCR.

Da im Plasmid pSP0- P_{CMV} EGFP keine Schnittstellen für eine Insertion neuer Phagenlysin-Kassetten existierten, musste anfangs noch ein zweites EGFP-kodierendes Plasmid konstruiert werden. Dazu wurde das EGFP-Fragment, welches von J. Stritzker kloniert worden ist, um einige Basen (incl. einer *SmaI*/*PspAI*-Schnittstelle) am 5'-Ende verkürzt, als Folge davon wurde auf dem Plasmid eine *SmaI*/*PspAI*-Schnittstelle zur Insertion neuer Kassetten frei. EGFP2 wurde mit den Oligonukleotiden EGFP2-*NotI*-for und EGFP1-*NotI*-rev und dem Plasmid pEGFP-1 als Matrize amplifiziert und über *NotI*-Restriktion in pSP0- P_{CMV} kloniert, resultierend in pSP0- P_{CMV} -EGFP2.

Die Konstruktion von P_{hpt} - SP_{actA} -*ply*118 erfolgte durch Amplifikation des Fragmentes P_{hpt} mit den Oligonukleotiden P4-for und P4-rev und genomischer DNA von *L.m.* EGD-e als Matrize. Das zweite Fragment SP_{actA} -*ply*118 entstand durch Amplifikation mit den Oligonukleotiden L4-for und L1-rev und dem Plasmid pSP2- P_{CMV} als Matrize, wobei P4-rev und L4-for keine Schnittstellen einführen, sondern komplementär in ihrer Sequenz sind. Beide Fragmente wurden ohne Oligonukleotide in einer zweiten PCR eingesetzt, bei der die Polymerase nach Aneinanderlagerung der Fragmente über die homologe Sequenz die restlichen DNA-Stränge synthetisiert. Das dadurch entstandene, kombinierte Fragment P_{hpt} - SP_{actA} -*ply*118 wurde anschließend durch Zugabe von P4-for und L1-rev nochmals amplifiziert, danach mit *SmaI* geschnitten und in den ebenfalls mit *SmaI* linearisierten Vektor pUC18 kloniert. Aus diesem Vektor wurde P_{hpt} - SP_{actA} -*ply*118 nach Vermehrung in *E. coli* wieder mit *PspAI* herausgeschnitten und in das Plasmid pSP0- P_{CMV} EGFP2 inseriert, resultierend in pSP4- P_{CMV} EGFP2 (Abbildung 5.52)

Zur Herstellung der Lysis-Kassetten P_{actA} -*ply*511 und P_{actA} -*ply*511 Δ C wurde der *actA*-Promotor mit Hilfe der Oligonukleotide *PactA-SmaI* und 511B und genomischer DNA von EGD-e als Vorlage in einer PCR-Reaktion hergestellt. Das Fragment *ply*511 entstand mit den Oligonukleotiden 511A und *ply*511-*SmaI* vom Plasmid pHPL511 als Matrize sowie auch das Fragment *ply*511 Δ C mit Hilfe der Oligos 511A und *ply*511 Δ C-*SmaI*. Beide Fragmente wurden mittels rekombinanter PCR-Technik ohne Schnittstelle mit P_{actA} kombiniert und durch *SmaI*-Restriktion in pUC18 inseriert. Sowohl P_{actA} -*ply*511 als auch P_{actA} -*ply*511 Δ C konnten anschließend in das Plasmid pSP0- P_{CMV} EGFP2 subkloniert werden.

Das Plasmid mit P_{actA} -*ply*511 wurde pSP5- P_{CMV} EGFP2 bezeichnet und das Plasmid mit P_{actA} -*ply*511 Δ C als pSP6- P_{CMV} EGFP2 (Abb. 5.52).

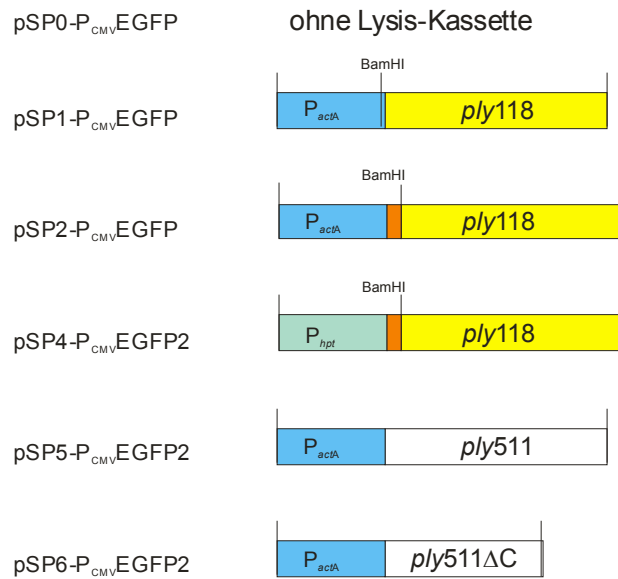


Abbildung 5.52: Schematische Darstellung aller Phagenlysin-Kassetten

5.2.5.2. Gentransfer-Effizienz von P_{hpt} - SP_{actA} - $ply118$, P_{actA} - $ply511$ und P_{actA} - $ply511\Delta C$

Die in Abschnitt 5.2.5.1 beschriebenen Plasmide, welche die drei neuen, alternativen Phagenlysin-Kassetten kodieren, wurden in *L.m.* $\Delta trpS$ / pFLO- $trpS$ transformiert, und nach Plasmid-Austausch wurden die Stämme $\Delta trpS$ / pSP4- P_{CMV} -EGFP2, $\Delta trpS$ / pSP5- P_{CMV} -EGFP2 und $\Delta trpS$ / pSP6- P_{CMV} -EGFP2 isoliert. Diese neuen Stämme wurden neben den drei schon näher charakterisierten Stämmen $\Delta trpS$ / pSP0- P_{CMV} -EGFP und $\Delta trpS$ / pSP1- P_{CMV} -EGFP und $\Delta trpS$ / pSP2- P_{CMV} -EGFP in verschiedenen Infektionsansätzen zur Ermittlung der jeweiligen Gentransfer-Effizienz eingesetzt.

HeLa Zellen und P388.D1 Makrophagen wurden parallel mit diesen sechs Stämmen infiziert. Dabei wurde für die Infektion der HeLa eine MOI von 5 und für P388.D1 eine MOI von 10 gewählt. 24 Stunden nach Infektion wurden EGFP-exprimierende HeLa Zellen zuerst mit dem Fluoreszenzmikroskop und anschließend mit dem Durchflusszytometer ausgewertet, während die Makrophagen erst 48 Stunden nach Infektion gemessen worden sind. Parallel dazu wurden die Infektionsmedien dieser Stämme (in RPMI verdünnte Bakterien) zum einen direkt nach der Infektion und zum anderen 4 Stunden nach Infektion in geeigneten Verdünnungen ausplattiert, um die durch die Phagenlysin-Kassetten ausgelöste extrazelluläre Lysis der Bakterien in RPMI-Medium zu erfassen.

In Abbildung 5.53 A sind EGFP-exprimierende HeLa Zellen zu sehen, wobei die korrespondierenden, mit dem Durchflusszytometer gemessenen Werte der Abbildung 5.53 C zu entnehmen sind. Wie in allen vorangegangenen Versuchen ergab die Expression des Phagenlysins 118 im Stamm $\Delta trpS$ / pSP1- P_{CMV} -EGFP die höchste Gentransfer-Effizienz, der Stamm ohne Phagenlysin erzeugt im Vergleich dazu viel weniger leuchtende Zellen und der Stamm $\Delta trpS$ / pSP2- P_{CMV} -EGFP

(mit der exportierten Variante des Phagenlysin 118) liegt in der Effizienz – bedingt durch extrazelluläre Lysis - noch sehr viel niedriger als der Referenzstamm ($\Delta trpS/ pSP0-P_{CMV}EGFP$). Der *Listeria*-Stamm $\Delta trpS/ pSP4-P_{CMV}EGFP2$ dagegen, welcher ebenfalls die exportierte Version von Phagenlysin 118 aber unter P_{hpt} -Kontrolle trägt, schien dagegen entweder kaum extrazellulär zu lysieren oder aber intrazellulär zu schnell, da dessen Effizienz nur leicht höher war als die des Referenzstammes $\Delta trpS/ pSP0-P_{CMV}EGFP$. Mit diesem Experiment konnte somit die niedrigere extrazelluläre Aktivität des *hpt*-Promotors im Vergleich zum *actA*-Promotor bestätigt werden.

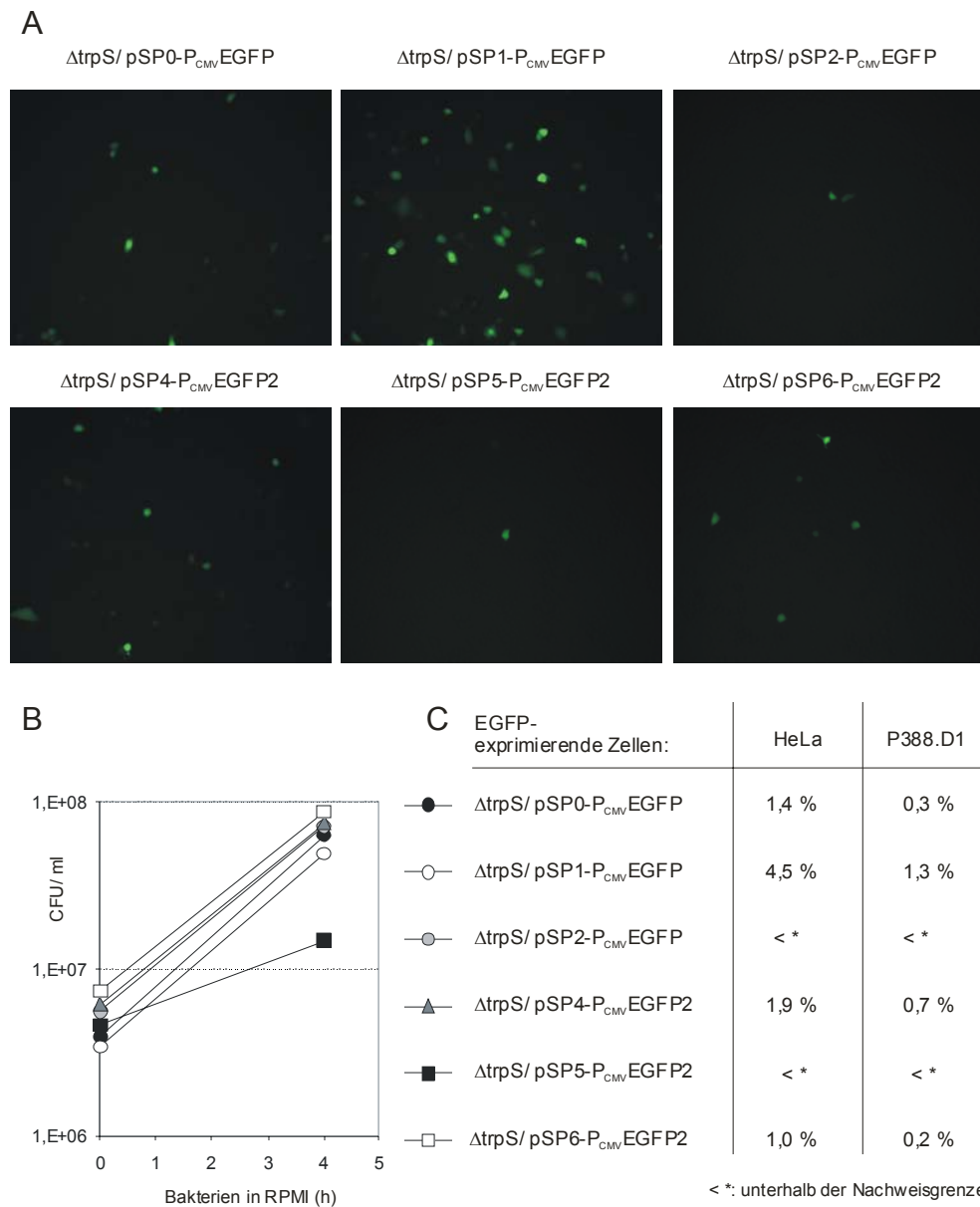


Abbildung 5.53: Gentransfer mit alternativen Phagenlysin-Kassetten. (A) Gentransfer-Effizienz in HeLa Zellen, 48 h *p.i.* (B) Durch verschiedene Phagenlysin-Kassetten bedingte Lysis der Bakterien in RPMI-Medium. (C) Vergleichende Durchfluss-zytometrische Analyse der Gentransfer-Effizienz mit verschiedenen Konstrukten in HeLa und P388.D1 Zellen.

Die unter *actA*-Promotorkontrolle stehenden Konstrukte des Phagenlysins 511 schienen beide ebenfalls entweder eine zu hohe extrazelluläre Aktivität zu besitzen, was bedeuten würde, dass das Phagenlysin 511 viel aktiver als Ply118 ist. Zum anderen kann man auch spekulieren, dass die intrazelluläre Lysis durch Ply511 zu schnell abläuft. In den vorangegangenen Versuchen konnte zumindest für den Stamm $\Delta trpS/$ pSP1- P_{CMV} EGFP ein Zusammenhang zwischen lang anhaltenden, intrazellulären Lebendbakterienzahlen und hoher Gentransfer-Effizienz gezeigt werden (siehe 5.2.2.3).

Bei der extrazellulären Lysis muss man zwischen Zellkontakt-induzierter und Zellkontakt-unabhängiger Lysis unterscheiden. Für $\Delta trpS/$ pSP0- P_{CMV} EGFP und $\Delta trpS/$ pSP2- P_{CMV} EGFP konnte bereits demonstriert (siehe 5.2.2.3) und auch in diesem Experiment bestätigt werden, dass beide Stämme nicht alleine durch den Kontakt mit Zellkultur-Medium (RPMI) lysieren. Wie man aber aus Abbildung 5.53 B entnehmen kann, scheint das für den Stamm $\Delta trpS/$ pSP5- P_{CMV} EGFP2 nicht gültig zu sein, denn dieser lysiert ohne Zellkontakt bereits im Zellkultur-Medium. Insgesamt wurde bei allen Stämmen eine vergleichsweise sehr niedrige Gentransfer-Effizienz gemessen, weil bei diesem Experiment eine zu hohe Gentamycin-Konzentration gewählt worden war (100 μ g/ml für die gesamte Inkubationszeit).

Zusammenfassend induzierte keine der neu konstruierten Lysis-Kassetten mehr EGFP-exprimierende Zellen und somit einen effizienteren Gentransfer als P_{actA} -ply118.

5.2.6 Untersuchungen zum *in vivo* Gentransfer

In den vorangegangenen Kapiteln wurde die erfolgreiche Verwendung der *L. monocytogenes* Stämme $\Delta trpS/$ pSP0- P_{CMV} , $\Delta trpS/$ pSP1- P_{CMV} und bedingt auch $\Delta trpS/$ pSP2- P_{CMV} als Träger von Plasmid-DNA beim Gentransfer in eukaryotische Zellen beschrieben.

Um dieses System *in vivo* zu etablieren, wurde sich auf die orale Infektion von BALB/c Mäusen konzentriert, in denen zumindest die Phagenlysin-enthaltenden *Listeria*-Stämme scheinbar hoch Virulenz-attenuiert sind (siehe 5.2.2.5).

Bislang konnte nicht nachgewiesen werden, ob nach oraler Gabe von mit Phagenlysin-ausgestatteten Listerien eine Übertragung eines Modellproteins oder Antigens in professionelle Antigen-präsentierende Zellen stattfindet. Die einzigen *in vivo* Daten, die bislang zum Gentransfer mit Listerien existierten, war die i.p. Infektion von Baumwollratten mit dem Stamm $\Delta 2/$ p3LGFP118 (Dietrich *et al.*, 1998) mit späterer Isolierung von EGFP-exprimierenden Peritonealmakrophagen (Spreng *et al.*, 2000). Mit diesem „DNA delivery“ System sollen natürlich bevorzugt dendritische Zellen erreicht werden, da diese wichtige Antigen-präsentierende Zellen zur Initiierung einer Immunantwort sind.

In einem ersten Experiment wurden BALB/c Mäuse orogastrisch mit ca. 10^9 Bakterien der Stämme $\Delta trpS/$ pSP1- P_{CMV} DsRed und $\Delta trpS/$ pSP2- P_{CMV} DsRed infiziert. Nach 2, 3 und 4 Tagen wurden den Tieren Peritonealmakrophagen, Milz, Peyer'sche Platten und Mesenteriale Lymphknoten entnommen, diese gewaschen und in RMPI/FKS aufgenommen (Abbildung 5.54). In den mesenterialen Lymphknoten ließen sich keine DsRed-exprimierenden Zellen nachweisen, dafür konnten vereinzelt einige wenige rot leuchtende Zellen in Milz, Peritonealhöhle und Peyer'schen Platten gefunden werden. Insgesamt wurden in allen mit $\Delta trpS/$ pSP1- P_{CMV} DsRed infizierten Tieren 4 leuchtende Zellen und in den mit $\Delta trpS/$ pSP2- P_{CMV} DsRed infizierten 10 DsRed-exprimierende Zellen über alle Tage verteilt gefunden. Diese Unterschiede sind auf Grund der geringen Anzahl wahrscheinlich nicht signifikant. Da aber keine weitere Immunfärbung der Präparationen mit z.B. einem Antikörper wie anti-CD11c, welcher Dendritische Zellen (DZ) detektieren kann, durchgeführt worden ist, konnte über die Klassifikation dieser DsRed-exprimierenden Zellen nur spekuliert werden. In den meisten Fällen ähnelten diese Zellen phänotypisch Makrophagen (Abb. 5.54 B), es waren aber auch 2-3 runde Zellen darunter, welche den doppelten Durchmesser wie die in den Präparationen befindlichen Lymphozyten hatten (Abb. 5.54 A).

Da die Suche von einigen rot leuchtenden Zellen in der Milz sich als zu ineffektiv herausgestellt hatte, wurde in einem zweiten Experiment eine andere Strategie benutzt: Mit jeweils ca. 10^9 Bakterien der Stämme $\Delta trpS/$ pSP0- P_{CMV} EGFP, $\Delta trpS/$ pSP1- P_{CMV} EGFP und $\Delta trpS/$ pSP2- P_{CMV} EGFP wurden je 3 BALB/c Mäuse wiederum orogastrisch infiziert. 3 Tage nach Infektion wurden mesenteriale Lymphknoten und Milz präpariert, gewaschen und in Kulturschalen für eine Nacht inkubiert. Makrophagen adhäreren in dieser Zeit am Boden der Schalen, während die Dendritischen Zellen sich entweder leicht oder gar nicht anheften. Durch Gradienten-Zentrifugation der vom Boden der Schale leicht abgespülten Suspensionszellen mit einem Metrizamid-Gradienten konnten daher Präparationen hergestellt werden, in denen DZ angereichert waren.

Wie im vorhergehenden Experiment konnten auch in diesen Präparationen der mesenterialen Lymphknoten keine EGFP-exprimierenden Zellen nachgewiesen werden. In allen 3 Milzen der mit $\Delta trpS/$ pSP0- P_{CMV} EGFP infizierten Tiere konnte insgesamt eine grün-leuchtende Zelle, in denen der mit $\Delta trpS/$ pSP1- P_{CMV} EGFP infizierten Tiere insgesamt fünf, und nach $\Delta trpS/$ pSP2- P_{CMV} EGFP-Infektion konnte ebenfalls insgesamt nur eine grün-leuchtende Milzzelle beobachtet werden. Wiederum wurden – beurteilt nach ihrer Morphologie – wahrscheinlich nur EGFP-exprimierende Makrophagen gefunden (Abb. 5.54 C).

Das dritte Experiment zum *in vivo* Gentransfer fand u.a. mit neu konstruierten EGFP-Expressions-Kassetten statt. C. Schoen konnte den bereits klonierten CMV-Promotor (siehe 5.2.1.7) mit einer weiteren SV40-Enhancer-Sequenz (ENH) ausstatten, welche eine höhere Expression der unter Promotorkontrolle klonierten Modellproteine durch einen verbesserten Kernimport versprach

(Dean *et al.*, 1999). Zusätzlich wurde ebenfalls von C. Schoen eine neue eukaryotische Expressions-Kassette auf der Basis des β -Aktin-Promotors (abstammend von Plasmid pBacMam, Fa. Novagen) auf das Plasmid pSP1 kloniert, resultierend in pSP1-P $_{\beta}$ AktinEGFP.

Mit 10^{10} Bakterien der Stämme $\Delta trpS/$ pSP1-P $_{CMV}$ EGFP, $\Delta trpS/$ pSP1-P $_{CMV}$ ENH-EGFP und $\Delta trpS/$ pSP1-P $_{\beta}$ AktinEGFP wurde jeweils eine BALB/c Maus orogastrisch infiziert. Nach zwei Tagen wurden die Milzzellen präpariert, von Erythrozyten befreit und mit einem PE-gekoppelten anti-CD11c-Antikörper gefärbt. Pro Präparation wurden 500.000 Zellen mit dem Durchflusszytometer gemessen. Nachdem tote Zellen und Lymphozyten mit Hilfe der Parameter „forwardscatter“ (FS) und „sidescatter“ (SSC) von der Messung ausgeschlossen worden sind, konnten in jeder Milzzell-Präparation 3,2-3,3% CD11c-positive Zellen detektiert werden, aber keine CD11c-positiven, EGFP-exprimierenden Zellen. D.h., auch mit einer Durchfluss-Zytometrischen Analyse konnten keine *ex vivo* EGFP-exprimierenden Dendritischen Zellen gefunden werden.

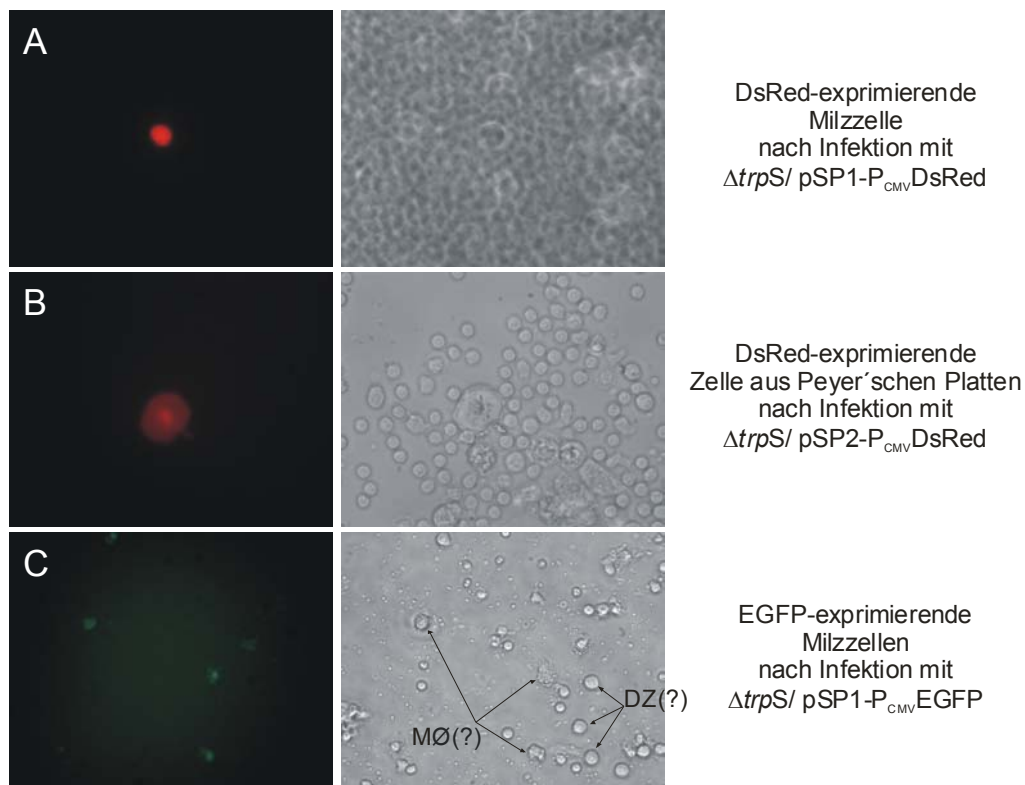


Abbildung 5.54: *In vivo* Gentransfer von DsRed bzw. EGFP. (A) DsRed-exprimierende Milzzelle nach Infektion einer BALB/c Maus mit $\Delta trpS/$ pSP1-P $_{CMV}$ DsRed. (B) DsRed-exprimierende Zelle aus Peyer'schen Platten nach *in vivo* Infektion mit $\Delta trpS/$ pSP2-P $_{CMV}$ DsRed. (C) EGFP-exprimierende Milzzellen in einer Metrizamid-Gradienten Präparation nach *in vivo* Infektion mit $\Delta trpS/$ pSP1-P $_{CMV}$ EGFP. MØ: Makrophagen, DZ: Dendritische Zellen.

5.3 Anwendung des „DNA-Delivery“ Systems als Vakzine

Das hier beschriebene „DNA-Delivery“ System, bestehend aus einem eukaryotischen Expressions-Plasmid und einem *L. monocytogenes* Stamm als Träger des Plasmides war unter anderem als

DNA-Vakzinierungsstrategie zur Übertragung von Antigen-cDNA in professionelle phagozytische Zellen entwickelt worden. In diesen Zellen soll das Antigen letztendlich *in vivo* exprimiert, prozessiert und zusammen mit MHC Klasse I Molekülen an der Oberfläche dieser Zellen zur Induktion einer Immunantwort präsentiert werden. Wie in den vorangegangenen Kapiteln beschrieben, konnte zumindest *in vitro* sowohl in Zellen epithelialen Ursprungs als auch in murinen Makrophagen und humanen Dendritischen Zellen (in Kooperation mit A. Kolb-Mäurer) die höchste Gentransfer-Effizienz mit dem *Listeria* Stamm $\Delta trpS/$ pSP1-P_{CMV} erreicht werden. Zusätzliche Virulenz-Attenuationen wie eine Deletion von *actA* oder *iap* erwiesen sich bezüglich des Gentransfers als kontraproduktiv (siehe 5.2.4).

Die auf dem Plasmid dieses Stammes befindliche Phagenlysin-Kassette P_{actA-*ply*118} konnte im Vergleich zu anderen Lysis-Kassetten mit Abstand am meisten Plasmid-DNA im Zytosol der untersuchten Zell-Linien freisetzen und damit die größte Anzahl an infizierten Zellen zur Expression des Modellproteins EGFP veranlassen. Obwohl diese Ergebnisse teilweise auf Untersuchungen basierten, die mit Zell-Linien humanen Ursprungs (Caco-2, HeLa) durchgeführt worden sind, wurde vermutet, dass diese Ergebnisse für eine *in vivo* Anwendung in der BALB/c Maus richtungweisend sein könnten.

Als Modell-Vakzineantigen wurde für die in diesem Kapitel beschriebenen Immunisierungs-Experimente das *Leishmania*-Antigen Kinetoplastid-Membranprotein-11 (KMP-11) in Kooperation mit Dr. C. Berberich und J. R. Ramirez aus der Arbeitsgruppe von Prof. H. Moll, Institut für molekulare Infektionsbiologie in Würzburg, ausgewählt. KMP-11 ist ein Lipophosphoglykan- und Membran-assoziiertes, amphipatisches Protein und präsent in zahlreichen *Leishmania* und *Trypanosoma* Spezies (Tolson *et al.*, 1994). Dieses Protein kann sowohl humorale als auch zelluläre Immunantworten induzieren und scheint eine Rolle bei der Protektion gegen Leishmaniose zu spielen (Tolson *et al.*, 1994, Jensen *et al.*, 1998, Planelles *et al.*, 2001, Ramirez, J.R. *et al.*, 2001).

5.3.1 Konstruktion verschiedener KMP-11 Expressionskassetten

Zur Induktion einer Immunantwort gegen das *Leishmania*-Antigen KMP-11 wurde überlegt, sowohl eine Präsentation des Proteins über MHC Klasse I als auch über MHC Klasse II Moleküle von Antigen-Präsentierenden Zellen zu erreichen. Die Präsentation über MHC Klasse I Moleküle ist Voraussetzung für die Induktion einer CTL-Antwort, während von MHC Klasse II Molekülen präsentierte Epitope die Proliferation von spezifischen T_H1-Zellen induzieren könnten. Diese Art von Immunantwort wird z.B. bei BALB/c Mäusen zur Protektion gegen *Leishmania major* benötigt (Moll und Berberich, 2001). Aus diesem Grund wurde neben der originalen KMP-11 cDNA auch ein Fusionskonstrukt, bestehend aus einer ER-Signalsequenz und der cDNA für KMP-11 in die

Expressions-Kassette des Plasmides pSP1-P_{CMV} kloniert. Diese Signalsequenz („ER targeting leader sequence“), welche von der cDNA des humanen „tissue plasminogen activators“ (htPA) abgeleitet worden ist, konnte bei verschiedenen DNA-Immunisierungsansätzen durch höhere Expressionsraten der Antigene sowohl humorale (Weiss *et al.*, 1999) als auch zytotoxische Immunantworten (Shiver *et al.*, 1996) drastisch verbessern. Es wurde vermutet, dass die erhöhte Verfügbarkeit der Antigene evtl. durch den TAP-unabhängigen Transport der Proteine vom Zytosol in das Endoplasmatische Retikulum (ER) stattfindet.

Es wurden insgesamt zwei KMP-11 Konstrukte, bezeichnet als KMP und tPA-KMP, in die Not I - Schnittstelle des Expressions-Plasmides pSP1-P_{CMV} (siehe 5.2.1.7) kloniert (Abbildung 5.55). Das Konstrukt KMP besitzt neben der kodierenden Sequenz von KMP-11 (279 bp) eine vorangestellte, 47 bp umfassende Sequenz, welche die Translations-Initiationsregion (TLI) des β -Galaktosidase-Gens enthält. Das Konstrukt tPA-KMP enthält zusätzlich die 69 bp umfassende „ER targeting leader sequence“ des Gens tPA (tPA-leader). Beide Konstrukte wurden durch rekombinante PCR-Technik mit Hilfe der Oligonukleotide KMP-A bis KMP-H hergestellt. Als Matrize für die kodierende Sequenz von KMP-11 diente das freundlicherweise von C. Berberich zur Verfügung gestellte Plasmid pBSK-KMP3 und für TLI das Plasmid pCMV β . Die tPA-Signalsequenz ist im humanen Genom auf zwei Exons verteilt, daher konnte sie nicht direkt amplifiziert werden. Da die Herstellung von tPA-cDNA aus Caco-2 Zellen nicht erfolgreich war, wurde die Sequenz mit Hilfe von zwei zueinander komplementären, 87 bp langen Oligonukleotiden (tpa5' und tpa3') nachgebaut, welche nach Hybridisierung als PCR-Vorlage benutzt worden sind.

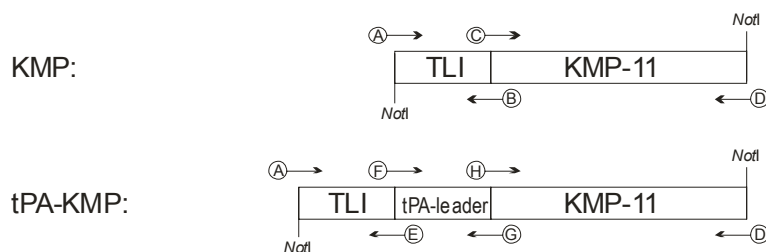


Abbildung 5.55: Genetische Anordnung der einzelnen Segmente der KMP-11 Konstrukte KMP und tPA-KMP. A-G bezeichnen die Lage der bei der rekombinanten PCR-Technik verwendeten Oligonukleotide.

5.3.2 Immunfluoreszenz-Analyse nach Transfektion von KMP-11 exprimierenden Plasmiden

3T6-Fibroblasten wurden mittels Lipofektion mit den Plasmiden pSP1-P_{CMV}, pSP1-P_{CMV}KMP und pSP1-P_{CMV}tPA-KMP transfiziert. 48 h nach Transfektion wurden die Zellen fixiert und mit einem

monoklonalen Antikörper gerichtet gegen KMP-11, gefolgt von einem FITC-gekoppelten Ziege-Anti-Maus-IgG-Antikörper gefärbt (Abbildung 5.56).

Sowohl pSP1-P_{CMV}KMP als auch pSP1-P_{CMV}tPA-KMP konnten 3T6 Fibroblasten zur Expression von KMP-11 bringen, jedoch war die anti-KMP-11-Färbung nach Transfektion mit pSP1-P_{CMV}KMP sehr viel schwächer als nach Transfektion mit pSP1-P_{CMV}tPA-KMP. Dieser Effekt scheint mit der durch die tPA-Signalsequenz bereits beschriebenen Stabilisierung des Proteins zusammen zu hängen (Chapman *et al.*, 1991). Da diese Stabilisierung auch – wie in 5.3.1 beschrieben – eine Erhöhung der MHC Klasse I und II Präsentation zur Folge haben kann, wurde in dem folgenden Experiment nur das Plasmid pSP1-P_{CMV}tPA-KMP eingesetzt.

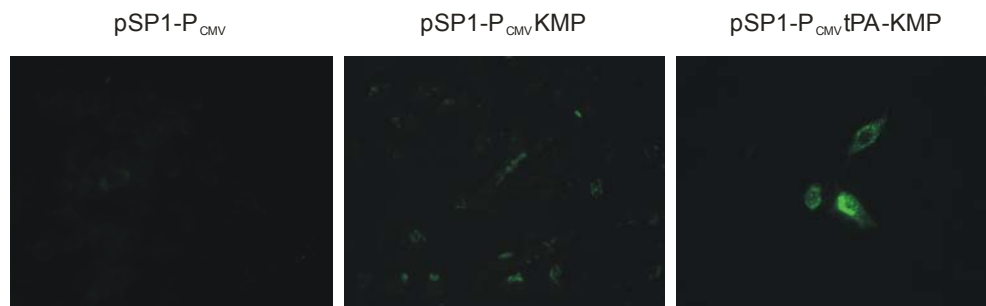


Abbildung 5.56: KMP-11-Immunfluoreszenz-Analyse von 3T6-Fibroblasten, welche mit KMP-11 Expressions-Plasmiden transfiziert worden sind.

5.3.3 Expression und Aufreinigung von rKMP-11

Für das KMP-11-Immunisierungs-Experiment wurde lösliches, Endotoxin-freies KMP-11 als *in vitro* Restimulans zur Detektion von KMP-11-spezifischen T-Zellen als auch zur Beschichtung eines anti-KMP-ELISAs benötigt. Aus diesem Grund wurde zunächst rekombinantes KMP-11 (rKMP-11) in *E. coli* produziert und weiter aufgereinigt (Abbildung 5.57).

Dazu wurde das Expressions-Plasmid pQE30-KMP (erhalten von C. Berberich) in *E. coli* M15[pREP4] transformiert. Aus einer 5 l-Kultur dieses Stammes konnten insgesamt 275 mg rKMP-11 aufgereinigt werden. Nach Dialyse des Proteins gegen PBS wurde es zur Endotoxinreinigung zweimal über eine 10 ml-Detoxi-Gel-Säule gegeben.

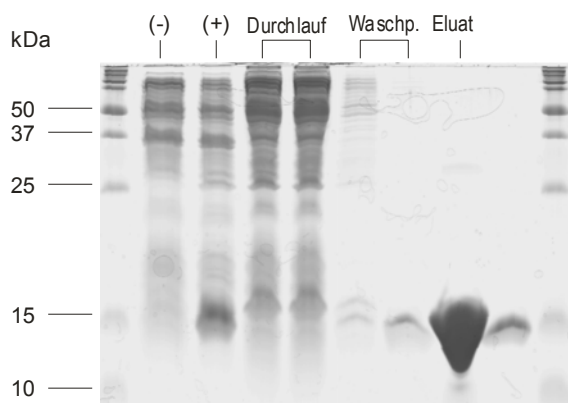


Abbildung 5.57: Präparation von rKMP-11 aus *E. coli* M15[pREP4]. Auf dem Coomassie-Gel sind aufgetragen: (-) nicht induzierte Kultur, (+) induzierte Kultur, Durchlauf des Lysates, Waschpuffer nach Lauf über die Säule, Eluat mit rKMP-11.

5.3.4 Infektion von BALB/c Mäusen mit KMP-11 transferierenden Listerien

In diesem Immunisierungsexperiment wurden zum einen verschiedene KMP-11 exprimierende Plasmide und zum anderen zwei verschiedene Arten der Auffrischungs-Immunisierung („boosting“) getestet: Je 10 Tiere wurden mit 10^{10} Bakterien der Stämme $\Delta trpS/ pSP1-P_{CMV}$, $\Delta trpS/ pSP1-P_{CMV}tPA-KMP$, $\Delta trpS/ pSP1-P_{CMV}ENH-tPA-KMP$ und $\Delta trpS/ pSP1-P_{\beta Aktin}tPA-KMP$ orogastrisch infiziert. Die letzten beiden Plasmid-Konstrukte, welche alternative eukaryotische Promotoren kodieren, wurden bereits in Kapitel 5.2.6 eingeführt. Anschließend wurden diese Gruppen in zweimal fünf Tiere aufgeteilt, wobei drei Wochen später je eine Fünfer-Gruppe abermals mit 10^{10} Bakterien der identischen Stämme infiziert wurde. Die andere Fünfer-Gruppe bekam eine Auffrischungs-Immunisierung durch i.p. Applikation von 50 μg rKMP-11 in dem Öl-in-Wasser-Adjuvans Montanide ISA 206 (Übersicht in Tabelle 5.4).

Eine Woche später wurden die Milzzellen dieser Tiere präpariert, und es wurden verschiedene Tests zur Detektion einer spezifischen Immunantwort gegen das *Leishmania* Antigen KMP-11 durchgeführt.

Gruppe (n=5):	1ste Immunisierung (d 0):	2te Immunisierung (d 21):
A (n=3)	ohne	
B	50 μg rKMP-11	50 μg rKMP-11
C	$\Delta trpS/ pSP1-P_{CMV}$	$\Delta trpS/ pSP1-P_{CMV}$
D	$\Delta trpS/ pSP1-P_{CMV}$	50 μg rKMP-11
E	$\Delta trpS/ pSP1-P_{CMV}tPA-KMP$	$\Delta trpS/ pSP1-P_{CMV}tPA-KMP$
F	$\Delta trpS/ pSP1-P_{CMV}tPA-KMP$	50 μg rKMP-11
G	$\Delta trpS/ pSP1-P_{CMV}ENH-tPA-KMP$	$\Delta trpS/ pSP1-P_{CMV}ENH-tPA-KMP$
H	$\Delta trpS/ pSP1-P_{CMV}ENH-tPA-KMP$	50 μg rKMP-11
I	$\Delta trpS/ pSP1-P_{\beta Aktin}tPA-KMP$	$\Delta trpS/ pSP1-P_{\beta Aktin}tPA-KMP$
J	$\Delta trpS/ pSP1-P_{\beta Aktin}tPA-KMP$	50 μg rKMP-11

Tabelle 5.4 : KMP-11 Immunisierungsschema. *Listeria*-Stämme wurden p.o. appliziert (jeweils 10^{10} Bakterien), während rekombinantes KMP-11 (rKMP-11) i.p. verabreicht worden ist.

5.3.4 Messung der proliferativen Antwort

Die Proliferation von spezifischen T-Zellen aus der Milz wurde nach *in vitro* Restimulation mit einem spezifischen Antigen durch Einbau von ^3H -Thymidin in die DNA der Zellen gemessen. Als Antigene wurde zum einen 50 $\mu\text{g/ml}$ rKMP-11 verwendet und zum anderen ein Äquivalent von 10^8 Hitze-getöteten Listerien (HKL) pro Napf (Hess *et al.*, 1997). Für diese Präparation wurde *L. monocytogenes* EGD-e zweimal mit PBS gewaschen, in 1/10 des Volumens in PBS ankonzentriert und 20 min bei 100°C inkubiert. Durch Ausplattieren dieser Präparation wurde die vollständige Abtötung der Bakterien bestätigt.

Nach Präparation der Milzzellen der in Kapitel 5.3.3 beschriebenen infizierten bzw. immunisierten BALB/c Mäuse wurden pro Tier 4×10^5 Zellen/ Napf mit a) Medium, b) 50 $\mu\text{g/ml}$ rKMP-11 und c) 10^8 Hitze-getöteten Listerien in Dreifachansätzen für insgesamt 5 Tage stimuliert.

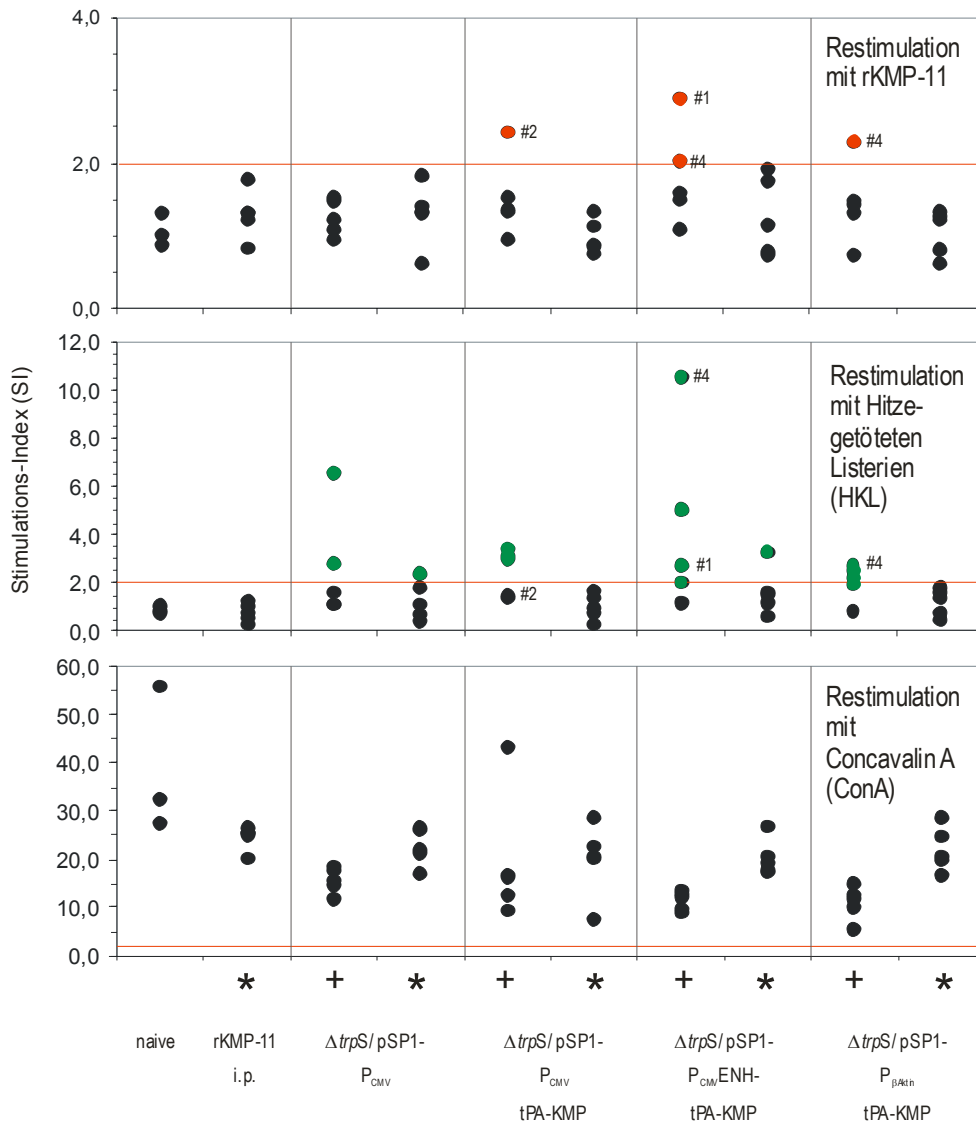
Um die Proliferationsfähigkeit der Zellpräparationen zu testen, wurden zusätzlich je 3 Nöpfe mit d) Medium und e) 5 $\mu\text{g/ml}$ Concanavalin A (ConA) für insgesamt 3 Tage stimuliert. 18 Stunden vor Ende der Inkubationszeit wurden 0,5 $\mu\text{Ci/ Napf}$ ^3H -Thymidin zu den Zellen pipettiert. Nach Ernte der Zell-DNA und Messung der eingebauten Radioaktivität wurde der Stimulationsindex (SI > 2: positive Proliferation) aller Restimulationen errechnet (Abbildung 5.58).

Nach Restimulation mit rKMP-11 konnten insgesamt nur vier Tiere mit KMP-spezifischen, proliferierenden T-Zellen detektiert werden. Diese befanden sich ausschließlich in den Gruppen, welche zum einen mit KMP-11 exprimierender Plasmid-DNA transferiert worden und zum anderen zweimal mit Listerien infiziert worden sind. Weder bei den naiven noch bei den i.p. immunisierten Tieren ließen sich solche T-Zellen nachweisen.

Dagegen befanden sich in fast allen mit *Listeria* infizierten Gruppen Tiere, welche positiv nach Restimulation mit Hitze-getöteten Listerien (HKL) reagierten. Dabei lag der Anteil der positiver Tiere in den Gruppen mit einmaliger Listeriengabe bei 10 % und bei zweimaliger Listeriengabe bei 65 %.

Bei diesen Ergebnissen ist zu beachten, dass nicht mit einem *Listeria*-Wildtyp-Stamm infiziert worden ist, sondern mit dem Stamm $\Delta\text{trpS/ pSP1-P}_{\text{CMV}}$, welcher auf Grund des Phagenlysin stark Virulenz-attenuiert ist (siehe 5.2.2.5).

Drei von den vier Tieren, welche auf die Stimulation mit rKMP-11 positiv reagiert hatten, waren ebenfalls positiv im Proliferationstest, bei dem mit Hitze-getöteten Listerien als Restimulans benutzt worden waren (siehe Abb. 5.58). Dieser Befund könnte darauf hinweisen, dass die Prozessierung und Präsentation von KMP-11 exprimierender Plasmid-DNA und die *in vivo* Aufnahme und Präsentation der Listerien eng gekoppelt sind.



†: Auffrischungs-Immunisierung mit identischen Listerien-Stämmen (d 21)

*: Auffrischungs-Immunisierung mit 50 μ g rKMP-11 i.p. (d 21)

Abbildung 5.58: Messung der proliferativen Antwort von Milzzellen nach *in vivo* Infektion mit Listerien, welche KMP-11 exprimierende Plasmid-DNA tragen, und *in vitro* Restimulation mit verschiedenen Agentien (rKMP-11, HKL). Als positiv wurde ein Index >2 betrachtet (rote Linie); positive Tiere wurden farbig markiert (rote und grüne Punkte).

5.3.5 Messung von Zytokinen

Mit der Messung der Zytokine IL-2 und IFN- γ können ebenfalls Antigen-spezifische T-Zellen detektiert werden, wobei die proliferative Antwort und die Zytokinsekretion nicht korrelieren müssen. Analog dem im vorherigen Kapitel beschriebenen Proliferationstest wurden pro Tier 4 x 10⁵ Zellen/ Napf mit a) Medium, b) 50 μ g/ml rKMP-11, c) 10⁸ Hitze-getöteten Listerien und d) 5 μ g/ml Concanavalin A für insgesamt 24 Stunden stimuliert. Anschließend wurde die IL-2 und IFN-

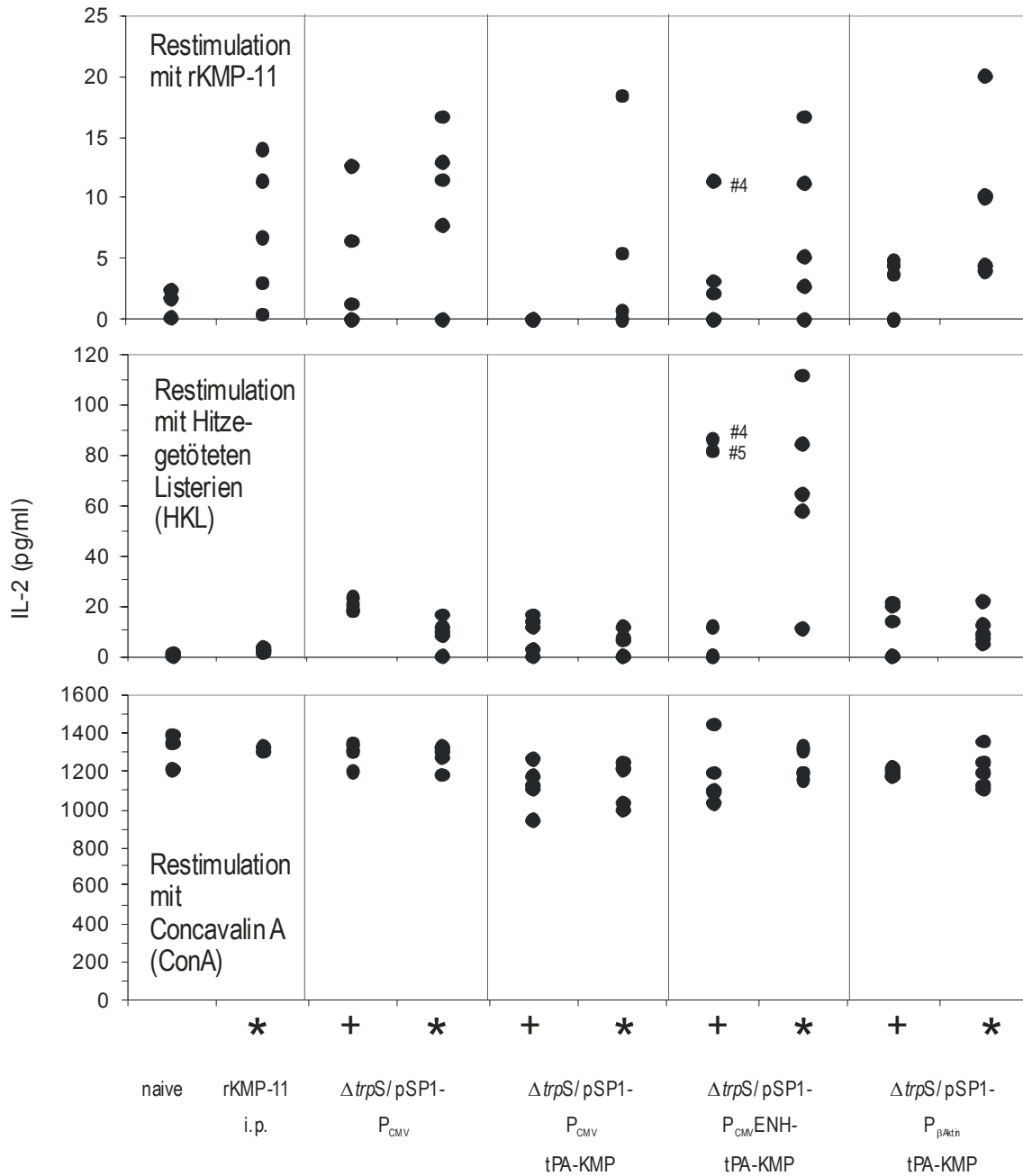
γ Konzentration für jedes Stimulans bestimmt. Bei dieser Messung konnte nur eine Einzelbestimmung durchgeführt werden. Zur Auswertung wurde die jeweilige Zytokin-Konzentration der Näpfe ohne Stimulation (Mediumkontrolle) von denen der Näpfe mit Stimulanzien subtrahiert (Abbildung 5.59 und 5.60).

Nach Restimulation der Milzzellen mit rKMP-11 konnte nur bei zwei aus der Gruppe der mit $\Delta trpS/ pSP1-P_{CMV}ENH-tPA-KMP$ infizierten Tiere eine erhöhte IFN- γ -Konzentration gemessen werden (ca. 1500 bzw. 1100 ng/ml) (Abbildung 5.59). Diese Tiere entsprachen dabei nicht denen, die anhand des Proliferationstestes als positiv bewertet worden waren. Einzelne Tiere aus der mit $\Delta trpS/ pSP1-P_{CMV}$ infizierten Kontrollgruppe reagierten aber ebenfalls auf eine Stimulation mit rKMP-11 (ca. 600 ng/ml). Daher muss das Resultat dieser Messung sehr kritisch bewertet werden.

Tendenziell reagierten alle Gruppen, welche zweimal mit Listerien infiziert worden waren, nach Restimulation mit Hitze-getöteten Listerien (HKL) mit einer höheren IFN- γ -Ausschüttung als die Gruppen, welche nur einmal infiziert worden sind. Allerdings zeigten auch die Mäuse, die während des Versuches gar nicht mit Listerien in Berührung gekommen sind, eine positive Reaktion auf die HKL-Stimulation. Daraus lässt sich schließen, dass entweder diese HKL-Präparation unspezifisch Milzzellen zur IFN- γ -Ausschüttung anregen kann oder dass die Tiere vorher schon mit *L. monocytogenes*, *L. innocua* oder einem anderen kreuzreagierenden Pathogen in Kontakt gekommen sind. Die Gruppe, welcher KMP-11 zweimal in Verbindung mit einem Adjuvans appliziert worden ist, zeigte im Allgemeinen die niedrigste IFN- γ -Produktion. Dies hängt wahrscheinlich mit der Erzeugung einer T_H2 -Immunantwort durch das Adjuvans und einer dadurch inhibierten IFN- γ -Synthese zusammen.

Auch bei der Analyse der IL-2-Produktion der mit rKMP-11 stimulierten Milzzellen konnte keine signifikant erhöhte Zytokinproduktion der mit KMP-11 cDNA immunisierten Tiere gemessen werden (Abbildung 5.60), das gleiche gilt auch für die Messung der mit HKL stimulierten Milzzellen. Alle Milzzellen reagierten im Übrigen sehr stark auf die Stimulation mit Concanavalin A, wodurch gezeigt werden konnte, dass alle Zellen prinzipiell vital genug für eine Zytokin-Produktion präpariert worden waren.

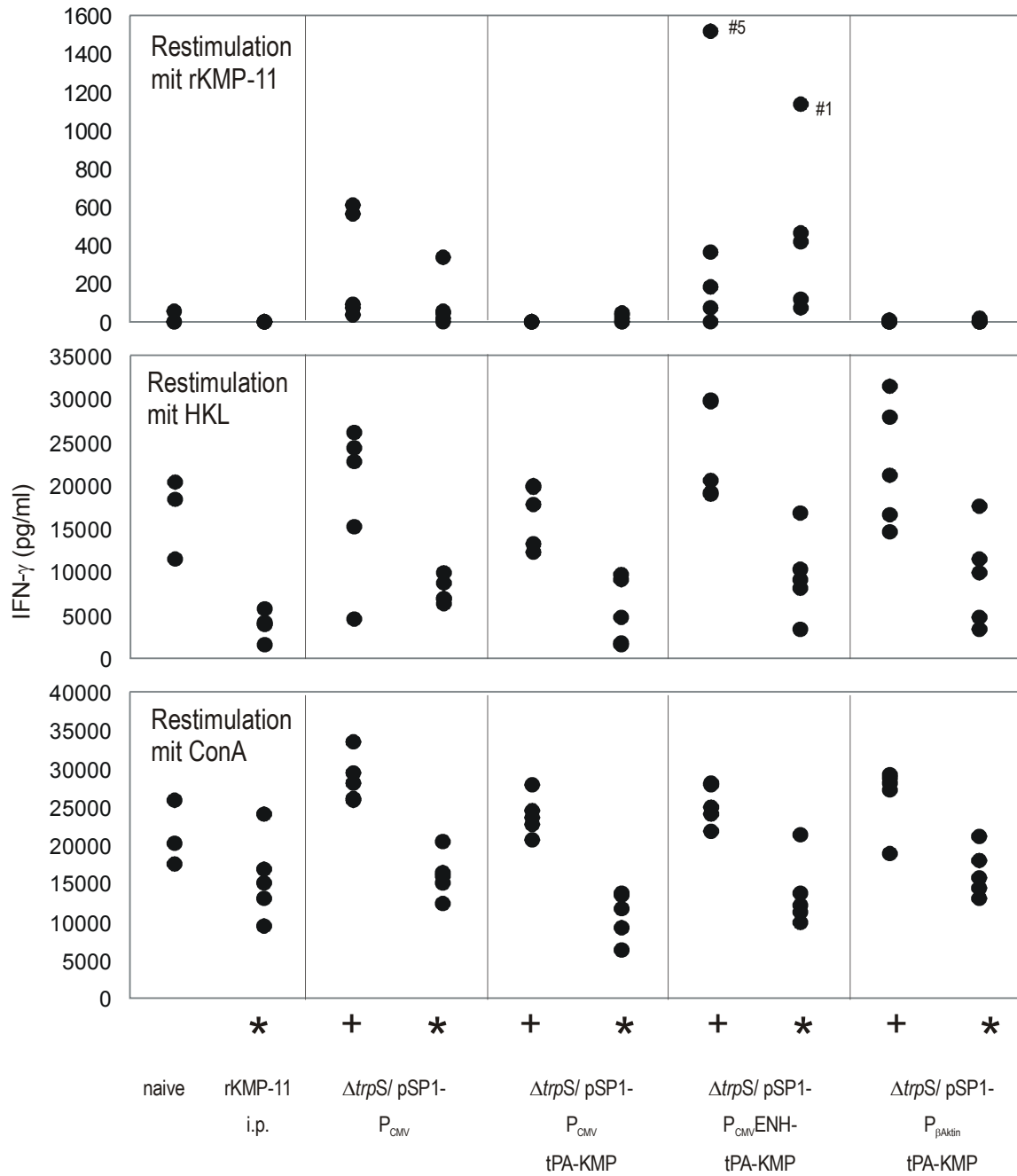
Zusammenfassend konnten nach Messung der Zytokine evtl. zwei spezifisch auf KMP-11 reagierende Tiere gefunden werden, diese waren ein- bzw. zweimal mit $\Delta trpS/ pSP1-P_{CMV}ENH-tPA-KMP$ infiziert worden. Dies könnte als ein Hinweis darauf gedeutet werden, dass die Enhancer-Sequenz (ENH) des CMV-Promotors *in vivo* eine höhere KMP-11 cDNA Produktion erzeugt hat, wobei dies evtl. zu einer schwachen Immunantwort gegen dieses Antigen in zwei Tieren geführt hat.



+: Auffrischungs-Immunsierung mit identischen Listerien-Stämmen (d 21)

*: Auffrischungs-Immunsierung mit 50 µg rKMP-11 i.p. (d 21)

Abbildung 5.59: IFN- γ Produktion von Milzzellen nach *in vivo* Infektion mit KMP-11 cDNA- transferierenden Listerien. Restimulation mit rKMP-11 oder Hitze-getöteten Listerien (HKL).



†: Auffrischungs-Immunsierung mit identischen Listerien-Stämmen (d 21)

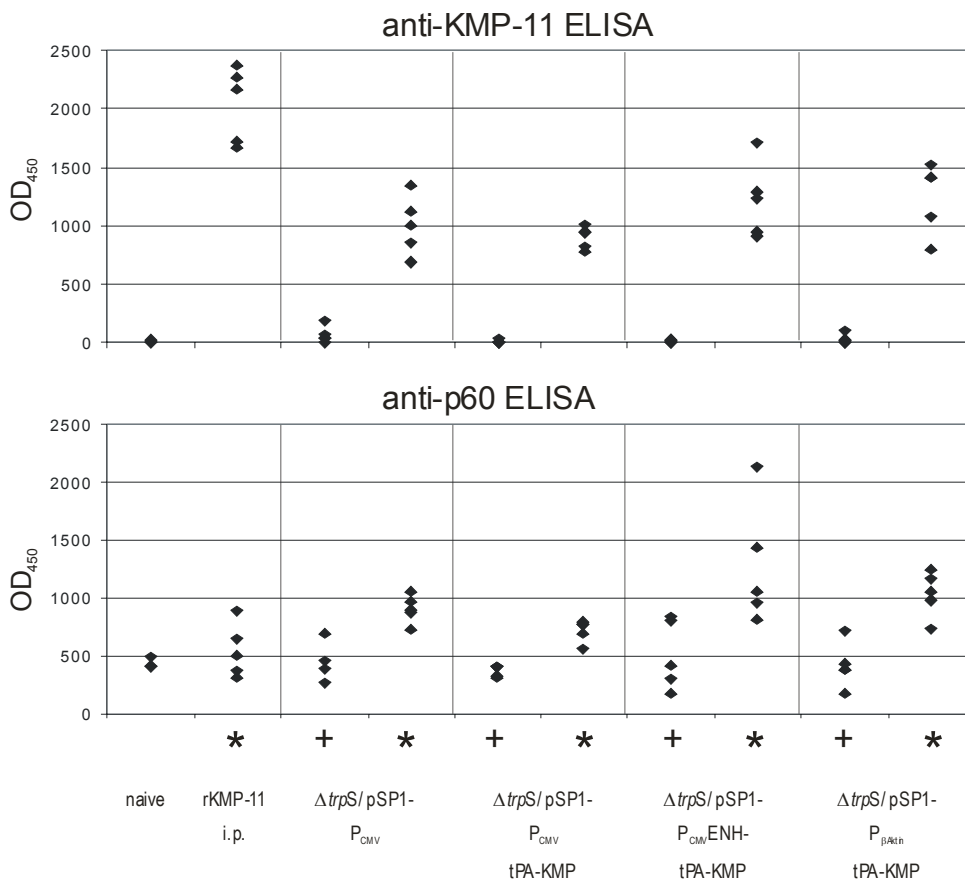
*: Auffrischungs-Immunsierung mit 50 μ g rKMP-11 i.p. (d 21)

Abbildung 5.60: IL-2 Produktion von Milzzellen nach *in vivo* Infektion mit KMP-11 cDNA- transferierenden Listerien. Restimulation mit rKMP-11 oder Hitze-getöteten Listerien (HKL).

5.3.6 Analyse der murinen Seren

Die Seren aller Tiere, welche im Rahmen des KMP-11-Immunisierungs-Experimentes eingesetzt worden sind, wurden in einem ELISA auf die Anwesenheit von Antikörpern untersucht, welche gegen KMP-11 von *Leishmania major* bzw. p60 von *L. monocytogenes* gerichtet sind. Dabei sollten alle Tiere, welche mit *Listeria* infiziert worden sind, anti-p60-Antikörper aufweisen, während nur bei den mit rKMP-11 (+ Adjuvans) immunisierten Mäusen Antikörper gegen diesen Antigen erwartet werden. Als Antigen-Beschichtung im ELISA wurden rKMP-11 (siehe 5.3.3) bzw. p60His (siehe 5.1.1.5) verwendet.

Tatsächlich hatten alle mit rKMP-11 immunisierten bzw. „geboosteten“ Tiere hohe anti-KMP-11-Titer, während bei den naiven als auch bei den mit KMP-11 cDNA infizierten Mäusen keine Antikörper nachgewiesen werden konnten (Abbildung 5.61). D.h., die Infektion mit KMP-11 cDNA-transferierenden *Listerien* erzeugte keinerlei humorale Immunantwort gegen dieses Antigen.



†: Auffrischungs-Immunisierung mit identischen *Listerien*-Stämmen (d 21)

*: Auffrischungs-Immunisierung mit 50 µg rKMP-11 i.p. (d 21)

Abbildung 5.61: anti-KMP-11 bzw. anti-p60 ELISA aller Seren des KMP-Immunisierungs-Experimentes.

Überraschenderweise konnte bei ausnahmslos allen Tieren anti-p60- Antikörper gefunden werden, egal, ob diese mit *Listeria* infiziert worden waren oder nicht. Dies kann zwei Ursachen haben: Zum einen könnten die Mäuse vor dem Versuch mit *L. monocytogenes* oder *L. innocua* in Kontakt gekommen sein und zum anderen können auch nur mit p60 kreuzreagierende Antikörper detektiert worden sein, die im Rahmen einer Immunantwort auf ein anderes Pathogen entstanden sind.

6. Diskussion

In dieser Arbeit wurde ein bakterielles „DNA delivery“ System (Gentransfer-System) untersucht und optimiert, welches u.a. als alternative Methode zur herkömmlichen DNA-Vakzinierung Anwendung finden soll. Dieses System setzte sich aus einem Virulenz-attenuierten *L. monocytogenes* Stamm als Vektor und einem eukaryotischen Expressions-Plasmid zusammen, auf dem zusätzlich eine Lysis-Kassette kodiert ist, die die intrazelluläre Lysis des Bakteriums und die damit einhergehende Freisetzung der Expressions-Plasmide im Zytosol der Wirtszelle gewährleistet.

Um einen neuen Virulenz-attenuierten Trägerstamm für dieses System zu erhalten, wurde in dieser Arbeit das Gen für das als „invasion associated protein“ beschriebene Protein p60 (Kuhn und Goebel, 1989) durch eine Deletions-Mutagenese vollständig aus dem Genom von *L. monocytogenes* deletiert, wodurch der neue attenuierte Stamm *Δiap* entstanden ist.

Außerdem wurde ein neues eukaryotisches Expressions-Plasmid konstruiert, welches neben einer eukaryotischen Transkriptionseinheit und einer Lysis-Kassette einen besonders für *Listeria* geeigneten Replikationsursprung besitzt.

Damit *L. monocytogenes* dieses Plasmid (und damit auch die Lysis-Kassette) *in vitro* und *in vivo* nicht verlieren kann, wurde dem Bakterium im Genom das essentielle Gen *trpS* deletiert, während zusätzlich eine *trpS*-Expressions-Kassette auf dem Plasmid inseriert wurde. Das auf diese Weise erschaffene so genannte „Balanced-lethal“ System garantiert, dass bei Anwendung des „DNA delivery“ Systems als Vakzine keine Plasmid-freien und somit unlysierten Listerien im Wirtsorganismus vorliegen.

6.1 Die Deletionsmutante *Δiap* unterscheidet sich von den Raumutanten

Das Protein p60 wurde 1989 zum ersten Mal von Kuhn und Goebel an Hand so genannter Raumutanten von *L. monocytogenes* beschrieben, welche sich durch eine stark veränderte Kolonieform und Zell-Morphologie von wildtypischen Listerien unterscheiden. Während Listerien normalerweise kurze Stäbchen-förmige Zellen von ca. 2 µm Länge bilden, erscheinen die einzelnen Bakterien vieler Raumutanten als filamentöse, an den Septen zusammenhängenden Einzelzellen, welche oft eine Gesamtlänge von 80-100 µm erreichen können. Solche Raumutanten sezernieren stark reduzierte, aber noch nachweisbare Mengen des Proteins p60 in den Kulturüberstand.

Kuhn und Goebel vermuteten, dass dieser spezielle Phänotyp mit der verringerten Expression von p60 zusammenhängt, da die Zugabe von gereinigtem p60 oder auch Plasmid-kodiertem p60 einen

teilweisen Zerfall dieser langen Zellketten bewirkt, wobei aber niemals die Länge der wildtypischen Bakterien erreicht worden ist (Kuhn und Goebel, 1989, Wünscher *et al.*, 1993). Daher wurde postuliert, dass p60 als Mureinhydrolase bei einem späten Schritt der Zellteilung, nämlich an der Septentrennung beteiligt ist.

Die *L. monocytogenes* Deletionsmutante Δiap entstand durch die Deletion des Genes *iap* einschließlich der Promotor- und Terminatorregion im Genom des Bakteriums und erwies sich als vollkommen p60-defizient. In der exponentiellen Wachstumsphase bildet die Mutante kurze Ketten aus 4 bis 8 Einzelzellen, wobei diese ebenfalls an den Septen zusammenhängen. Dieser Phänotyp war insofern überraschend, da es nicht einleuchtend erschien, dass ein Stamm, welcher noch geringe Mengen an p60 exprimiert, lange Zellketten ausformt, während ein komplett defizienter Stamm in viel kürzeren Ketten wächst.

Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass eine ausschließliche *iap*-Mutation zu kurzen Zellketten führt, während eine *iap*-Mutation zusammen mit einer oder mehreren anderen Mutationen lange Zellketten erzeugt. Ein ähnliche Beobachtung konnte auch bei *B. subtilis* gemacht werden: Mutanten, in denen das Autolysin CwlF inaktiviert ist, formen 4-mal längere Filamente als wildtypische Bakterien (Ohnishi *et al.*, 1999). Wird bei dieser Mutante zusätzlich die Peptidoglykan-Hydrolase LytF oder der Sigmafaktor SigD inaktiviert, so wachsen diese Bakterien zu extrem langen Zellketten aus. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass der Phänotyp der Raumutante nicht ausschließlich, sondern nur zu einem Teil durch die verringerte Expression von p60 zustande kommt. Interessanterweise kann man die kurzen Ketten der Δiap -Mutante nur minimal durch die Zugabe von p60 oder von wildtypischen Überstandsproteinen reduzieren.

Besonders auffällig an der Morphologie der Δiap Mutante ist ebenfalls, dass diese keine abgerundeten Zellpole formen kann, sondern dass die Pole abgeflacht erscheinen. Normalerweise wird bei Bakterien vor der Zellteilung ein Ring aus FtsZ Protein an der Innenseite der Membran ausgebildet, welcher vor der Septumtrennung kontrahiert, die sich teilenden Bakterien trennt, wobei diese ihre charakteristischen, abgerundeten Pole formen (Margolin, 2000). Dieser Vorgang scheint aber bei der Δiap Mutante nicht stattzufinden, da man in den Zellketten dieses Stammes keinerlei Einschnürungen erkennen kann. Dies lässt den Schluss zu, dass die Septumeinschnürung durch die Kontraktion des FtsZ-Ringes ohne die gleichzeitig stattfindende Septentrennung durch eine Mureinhydrolase wie p60 nur schwer möglich ist.

6.2 Δiap lässt sich nicht in trans komplementieren

Transformiert man den Stamm Δiap mit einem Plasmid, das eine vollständige p60-Expressionseinheit kodiert, kann man trotz des Multikopieneffektes nur eine zum Wildtyp vergleichsweise schwache Expression von p60 beobachten. Diese Besonderheit wurde auch 1991

von Köhler *et al.* beschrieben, welche die Raumutante RIII mit verschiedenen p60-exprimierenden Plasmiden ausstatteten. Obwohl die damals verwendeten Plasmide neben dem Gen *iap* auch die Genbereiche um das *iap*-Gen herum kodierten (1,9 kb stromaufwärts bzw. 4,1 kb stromabwärts), konnte nur eine moderat verstärkte p60-Expression bei diesen Stämmen beobachtet werden, welche niemals die Expressionsmenge von wildtypischen Bakterien erreichte.

Die Raumutante RIII transkribierte jedoch gleiche Mengen an *iap*-mRNA wie der *Listeria*-Wildtyp und daher wurde angenommen, dass die Expression von p60 auf einem posttranskriptionellen Level kontrolliert wird (Köhler *et al.*, 1991). Damals wurden zwei mögliche Erklärungen dafür gegeben: (I) Die Synthese von p60 wird auf dem translationalen Level von einem spezifischen Faktor reguliert, welcher in der Raumutante defekt ist. (II) Die Sekretion von p60 benötigt einen Faktor, der in der Raumutante defekt ist.

Die unter Punkt (I) getroffene Erklärung kann insofern entkräftet werden, da die Plasmid-abhängige Expression von p60 auch in der Δiap Mutante gestört ist. Diese sollte aber auf Grund ihrer gezielten Mutation nicht dereguliert sein. Ebenso ist es unwahrscheinlich, dass durch den deletierten Bereich selbst (*iap*-Promotor und *iap*-Leserahmen) eine Deregulation entstehen kann.

Erst kürzlich wurde veröffentlicht, dass einige Raumutanten-Isolate einen Defekt in dem in die Sekretion von Proteinen involvierten Gen *secA2* haben, welches stromaufwärts neben *iap* kodiert ist (Lenz und Portnoy, 2002). $\Delta secA2$ -Deletionsmutanten scheinen das Protein p60 vermindert zu sezernieren, wodurch es in dem Bakterium angesammelt wird. In eigenen sowie in Untersuchungen von Köhler *et al.* konnte dagegen nicht beobachtet werden, dass p60 intrazellulär in der Raumutante RIII akkumuliert wird (Köhler *et al.*, 1991).

6.3 Die Expression anderer Proteine in Δiap

Da der Einfluss von p60 auf die Invasion und das intrazelluläre Verhalten von *L. monocytogenes* in Wirtszellen untersucht werden sollte, wurde vorher überprüft, ob der Stamm Δiap andere wichtige Virulenzgene, welche ebenfalls in diese Vorgänge involviert sind, in vergleichbaren Mengen wie wildtypische Bakterien exprimiert. Man kann sich vorstellen, dass ein Mangel an p60 als ein in der Zellteilung und der Mureindegradation involviertes Protein eine Veränderung in den Eigenschaften der bakteriellen Zellwand hervorrufen könnte. Solche die Oberfläche der Bakterien betreffenden Veränderungen sind besonders kritisch bezüglich einer möglichen Beteiligung von p60 an der Invasion in Wirtszellen zu sehen.

Abhängig von dem jeweiligen Zelltyp vermitteln verschiedene Oberflächen-assoziierte Internaline wie InlA und InlB die Aufnahme der Bakterien in diese Zellen (Cossart und Lecuit, 1998). Während InlA maßgeblich an der Invasion in epitheliale Zellen wie Caco-2 beteiligt ist, vermittelt

InlB die Aufnahme von *L. monocytogenes* in verschiedene andere Zell-Linien wie Hepatozyten-ähnlichen Zellen, HeLa, Vero, CHO und Fibroblasten. Beide Internaline sind über verschiedene Mechanismen mit der Zellwand assoziiert: InlA besitzt ein LPXTG-Motiv, das das Protein kovalent mit dem Peptidoglykan verknüpft (Lebrun *et al.*, 1996), InlB interagiert dagegen nicht-kovalent mit Lipoteichonsäuren der bakteriellen Oberfläche (Jonquières *et al.*, 1999).

Western Blot Untersuchungen haben gezeigt, dass der Stamm Δiap , wenn er für ca. 4 Stunden bis zu einer späten exponentiellen Phase (180 Klett-Einheiten) kultiviert wird, beide Internaline in ähnlichen Mengen wie der Wildtyp und dem *in cis* mit *iap* komplementierten *iap*⁺ Stamm exprimiert. Wenn man jedoch alle Stämme ca. 36 Stunden wachsen lässt, exprimiert Δiap deutlich geringere Mengen an InlA. Dies kann entweder dadurch zustande kommen, dass InlA Wachstumsphasen-abhängig exprimiert wird, so dass dieser Unterschied erst in einer späteren Wachstumsphase auftritt. Es wäre aber auch vorstellbar, dass das nach 36 Stunden gemessene InlA die kumulative Menge an Gesamt-InlA darstellt, welche über die gesamte Kultivierungszeit exprimiert worden ist, wobei der Unterschied nach vier Stunden Kultivierungszeit noch nicht deutlich sichtbar war. Dies würde bedeuten, dass nicht nur Invasionsversuche mit für 36 Stunden kultivierten Δiap Bakterien auf Grund eines eventuellen InlA-Mangels vorsichtig interpretiert werden müssten, sondern auch die Versuche, welche mit für vier Stunden kultivierten (180 KE) Bakterien gemacht worden sind.

Da bei der Δiap Mutante zwar die InlA- aber nicht die InlB-Expression verändert war, kann man vermuten, dass besonders Proteine, welche mit einem LPXTG-Anker an die Zellwand gebunden sind, empfindlich auf eine p60-Defizienz reagieren. Solche Proteine werden mit Hilfe einer spezifischen Sortase (*srtA* in *L. monocytogenes*) in der Zellwand zurückgehalten, indem dieses Membranprotein das C-terminale Sortierungssignal LPXTG erkennt, zwischen den Aminosäuren T und G schneidet und die Polypeptidkette kovalent an den Zellwandbestandteil meso-Diaminopimelinsäure verknüpft (Dhar *et al.*, 2000). Bierne *et al.* berichteten, dass in einer *srtA*-Deletionsmutante neben InlA auch andere noch nicht näher charakterisierte LPXTG-Proteine nicht in der Zellwand verankert werden (Bierne *et al.*, 2002) und dass einige dieser Proteine zur Virulenz von *Listeria* in Mäusen beitragen. Daher liegt die Vermutung nahe, dass neben InlA auch andere Virulenz-assoziierte Proteine mit LPXTG-Motiv bei der Δiap Mutante fehlerhaft exprimiert werden; und diese könnten ebenso wie InlA in die Internalisierung von *L. monocytogenes* in eukaryotische Zellen beteiligt sein.

Neben einer verringerten Expression könnte InlA aber auch fehlerhaft auf der Oberfläche der Δiap Mutante lokalisiert sein, denn Färbungen von in Medium kultivierten Bakterien mit einem monoklonalen Antikörper gegen InlA ergaben, dass dieses überwiegend an einem Pol des Bakteriums angereichert wird (Jonquières *et al.*, 1998). Man kann sich leicht vorstellen, dass diese polare Oberflächenverteilung auch funktionell wichtig für dieses Protein ist. Da ein solcher

Antikörper in dieser Arbeit nicht verfügbar war, konnten hinsichtlich der Lokalisation von InlA keine Untersuchungen durchgeführt werden.

Mit zwei unterschiedlichen Methoden (Western Blot Analyse, Lecithinase-Test) konnte für den Stamm *Δiap* zum einen eine erhöhte Expression von reifem PlcB und zum anderen eine im Vergleich zum Wildtyp erhöhte Lecithinase Aktivität gemessen werden. PlcB ist eine von zwei in die Virulenz von *L. monocytogenes* involvierten Phospholipasen, wobei nur PlcB eine Phosphatidylcholin- (Lecithin) hydrolysierende Enzymaktivität besitzt. PlcB wird in einer unreifen Form (pro-PlcB) in das extrazelluläre Medium sezerniert. Dort werden N-terminal ca. 2,9 kDa des Proteins durch die Zink-abhängige Metalloprotease Mpl abgeschnitten, wodurch pro-PlcB in seine reife, aktive Form überführt wird.

PlcB wird vorwiegend in den sekundären Vakuolen während des Infektionszyklus von *L. monocytogenes* aktiv, wobei der pH in diesen Vakuolen die Aktivierung von PlcB durch Mpl beeinflusst (Marquis und Hager, 2000). So führt eine pH-Erniedrigung zu einer verstärkten Freisetzung von pro-PlcB aus den Bakterien, wobei die Mpl-abhängige Aktivierung des Enzyms der limitierende Schritt für eine effiziente Freisetzung ist.

P60 hat einen sehr hohen isoelektrischen Punkt von 9,3 und kann auf Grund seiner hohen Konzentration den pH im Mediumüberstand beeinflussen. Tatsächlich ist der Überstand des p60-defizienten Stammes leicht saurer als der des Wildtyps. Daher könnte die erhöhte PlcB-Aktivität mit dem niedrigeren pH des Mediums zusammenhängen.

6.4 Die Beteiligung von *iap* an der Invasion in Wirtszellen

Die erste mögliche Funktion, die dem Protein p60 zugeschrieben wurde, war eine Beteiligung an der Internalisierung von *L. monocytogenes* in 3T6 Fibroblasten (Kuhn und Goebel, 1989). In dieser Arbeit konnte demonstriert werden, dass einige Raumutanten-Isolate (RI bis RIV) einen Defekt in der Aufnahme durch diese Zell-Linien besaßen. Diese verminderte Aufnahme konnte nach Zerfall der Raumutante RIII in kürzere Zellketten durch Zugabe von gereinigtem p60 angehoben werden, jedoch nicht durch eine Reduktion der Zellkettenlänge mittels Ultraschallbehandlung. Die gleichen Untersuchungen wurden 1992 mit der humanen Epithel-Zell-Linie Caco-2 wiederholt; bei diesen Versuchen konnte jedoch eine verstärkte Invasion der Raumutante RIII sowohl durch gereinigtes p60 als auch nach Ultraschallbehandlung festgestellt werden (Bubert *et al.*, 1992).

Parallel zu diesen Invasions-Tests wurden keine Adhärenz-Untersuchungen durchgeführt, was eine klare Interpretation dieser kontroversen Ergebnisse zum heutigen Zeitpunkt erschwert. Einer der deutlichsten Hinweise zur Beteiligung von p60 in Wirtszellen wurde von Hess *et al.* erarbeitet (Hess *et al.*, 1995). Die Autoren demonstrierten anhand einer Hepatozyten-Zell-Linie und primären Knochenmarks-Makrophagen, dass Bakterien eines *S. typhimurium* Stammes, die das Protein p60

(als p60-HlyA Fusionsprotein) mit Hilfe des *E. coli* Hämolyisin-Sekretionssystems sezernierten, eine sehr stark erhöhte Invasionsrate in diese zwei Zelltypen im Vergleich zu wildtypischen Salmonellen aufwiesen, was p60 sehr deutlich als einen Invasions-assoziierten Virulenzfaktor ausweist.

Mit diesen vorangegangenen Untersuchungen im Hintergrund sind auch die im Rahmen dieser Arbeit gemachten Ergebnisse hinsichtlich der Beteiligung von p60 an Invasionsvorgängen schwer zu erklären. Zum einen erwiesen sich alle drei unabhängig voneinander konstruierten Δiap -Mutanten als viel adhärenter an Caco-2 Zellen und 3T6-Fibroblasten als die korrespondierenden Wildtypen-Stämme, während von anderen Autoren berichtet worden ist, dass rekombinant hergestelltes p60 an die Oberfläche von Caco-2 Zellen bindet (Park *et al.*, 2000). Die erhöhte Adhärenz der p60-defizienten Stämme kann durchaus mit der kurzkettingen Zellmorphologie zusammenhängen, da durch den längeren Zellkörper eine höhere Anzahl von Adhärenz-vermittelnden Proteinen wie Ami (Milohanic *et al.*, 2000) oder auch mehr Moleküle mit Ladungen pro Bakterium vorhanden sind, welche mit der Oberfläche der Wirtszelle interagieren und dadurch das Bakterium stärker adhären lassen.

Zum anderen konnte in dieser Arbeit festgestellt werden, dass die Δiap -Mutante nicht in gleichem Maß wie die Raumutante RIII eine Defizienz in der Internalisierung durch 3T6 Fibroblasten hat. Während die von *L. m.* EGD abstammende Δiap -Mutante nur eine um ca. 30 % reduzierte Invasionsrate aufweist, ist die Invasionsrate der zwei von EGD-e abstammenden Δiap -Mutanten um das 4fache erhöht. Dieser Unterschied lässt sich zum einen mit dem unterschiedlichen Invasionsverhalten beider Ausgangsstämme erklären, wobei der Stamm EGD-e eine etwas schwächere Invasionsrate aufweist als der Stamm EGD (EGD-e: ca. 20 % reduziert). Zweitens kann man anhand von Gelen mit zweidimensional aufgetrennten Überstandsproteinen erkennen, dass der Stamm EGD-e einige Proteine in geringerer Menge bzw. gar nicht und einige Proteine in höherer Menge wie der im Institut vorher vorhandene Stamm EGD sezerniert (Abb. 6.1).

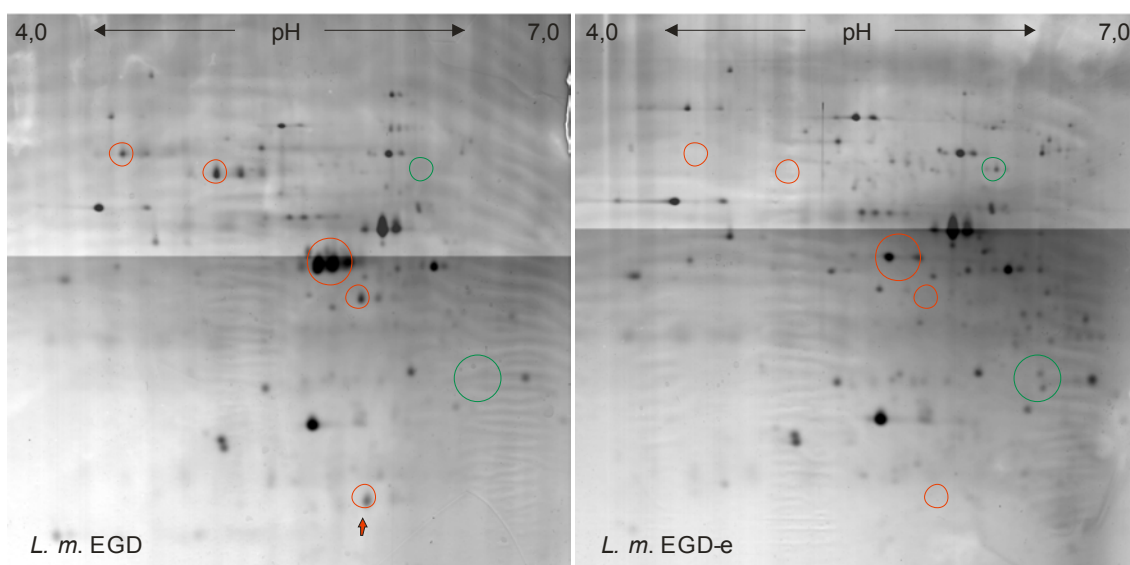


Abbildung 6.1: Zweidimensional aufgetrennte Überstandsproteine der *L. monocytogenes* Stämme EGD und EGD-e (Erste Dimension: pH = 4,0-7,0; zweite Dimension: 10 % SDS-PAA-Gel). Die roten Kreise kennzeichnen verstärkt exprimierte Proteine der Stammes EGD, grüne Kreise solche von EGD-e.

Daher hängen die abweichenden Invasionsraten sehr wahrscheinlich mit diesen unterschiedlich sezernierten Proteinen zusammen. Während der Unterschied der Invasionsraten in Caco-2 Zellen zwischen Wildtyp EGD und Wildtyp EGD-e bei ca. 20 % liegt, unterscheidet sich die der Δiap -Mutanten um das ca. 2,5fache.

Auf Grund dieser Invasions-Experimente muss postuliert werden, dass p60 keinen oder nur einen sehr geringen indirekten und Stamm-abhängigen Einfluss auf die Invasion von *L. monocytogenes* in die Zell-Linien Caco-2 und 3T6 hat.

6.6 Ist *iap* ein essentielles Gen?

In dieser Arbeit wurde das Gen *iap* mit Hilfe einer Deletions-Mutagenese-Technik aus dem Chromosom von *L. monocytogenes* entfernt. Diese Technik beinhaltet eine gezielte doppelte homologe Rekombination eines Mutagenese-Plasmides mit dem Chromosom, wobei das Plasmid zuerst in das Genom integriert und anschließend wieder aus diesem entfernt wird.

Diese Deletions-Mutagenese konnte in den verschiedensten *L. monocytogenes* Stämmen sowohl mit, als auch ohne ein *iap*-komplementierendes Plasmid erfolgreich wiederholt werden, und für alle diese Stämme konnte nachgewiesen werden, dass sie kein p60 mehr exprimieren.

Wuenscher *et al.* haben 1993 eine ähnliche Integrations-Mutagenese versucht, welche ebenfalls das Gen *iap* inaktivieren sollte. Da die Zerstörung des Gens nur unter Verwendung eines *iap*-Komplementations-Plasmides funktionierte, wurde postuliert, dass p60 ein essentielles Protein des Bakteriums ist. Meine eigenen und die Mutagenesen von Wuenscher *et al.* wurden alle mit demselben Mutagenese-Basisplasmid pLSV1 (Wuenscher *et al.*, 1991) und mit einer ähnlichen Technik durchgeführt. Der wohl entscheidende Unterschied könnte aber in der Wahl des zu deletierenden Bereiches gelegen haben. Wuenscher *et al.* versuchten, ein Mutagenese-Plasmid, welches einen internen 250 bp-Bereich von *iap* kodierte, in den Leserahmen von *iap* zu inserieren. In meinen eigenen Deletions-Mutagenesen integrierte sich in einem ersten Schritt das Mutagenese-Plasmid stromaufwärts vom *iap*-Promotor in das Chromosom und desintegrierte anschließend zusammen mit dem *iap*-Promotor und dem *iap*-Leserahmen. D.h., das Gen wurde im ersten Schritt intakt gelassen und im zweiten Schritt mitsamt dem Promotor entfernt, während Wuenscher *et al.* den *iap*-Promotor niemals inaktiviert hatten, wodurch ein lethales Ereignis entstanden sein könnte.

J. Bielecki konnte 1994 eine *L. monocytogenes iap*-Intergrationsmutante (JB1115) konstruieren. Diese hatte die Eigenschaft, stark reduzierte Mengen p60 zu produzieren. Ähnlich wie eine Raumutante besaß dieser Stamm aber eine lang-kettige Zellmorphologie, so dass ich davon ausgehe, dass er noch geringe Mengen des Proteins p60 exprimierte, denn alle in dieser Arbeit

hergestellten absolut p60-defizienten Mutanten wachsen in viel kürzeren Ketten als eine Raumutante.

Nachdem in dieser Arbeit nachgewiesen werden konnte, dass *iap* kein essentielles Gen ist, kann man weiter der Frage nachgehen, ob es eine essentielle Funktion des Proteins p60 gibt. Es wäre möglich, dass nach Deletion des Gens und damit nach Inaktivierung des Proteins ein anderes oder mehrere andere Proteine dessen Funktion übernehmen müssen, damit die Bakterienzelle lebensfähig bleibt. Allerdings konnte mit Hilfe von 2D-Gel-Analysen, eines Zymogramm-Testes und nach Untersuchung der Transkripte anderer putativer Hydrolasen bzw. p60-homologer Proteine kein Protein gefunden werden, welches die Funktion von p60 ersetzen könnte und eventuell in der Δiap -Mutante verstärkt exprimiert bzw. transkribiert wird.

Die 2D-Gel-Analysen detektierten aber andere Proteine, welche von den Δiap -Mutanten I-III nicht mehr exprimiert wurden. So produziert der Stamm Δiap I und der korrespondierende komplementierte Stamm *iap*⁺ I eine putative Oxidoreduktase (Lmo0613) nicht mehr, und im Zell-Lysat der Stämme Δiap II und III sowie ihrer korrespondierenden Revertanten *iap*⁺ II und III konnte eine putative Lactat-Dehydrogenase (Lmo0210) nicht mehr nachgewiesen werden.

Es scheint also, dass eine Deletion des Genes *iap* von anderen Mutationen begleitet wird, welche überraschenderweise bei den von EGD-e abstammenden Mutanten Δiap II und III identisch waren. Allerdings konnte bislang kein Zusammenhang zwischen p60 und einer Lactat-Dehydrogenase bzw. einer Oxidoreduktase hergestellt werden.

Wie schon in Kapitel 6.1 erwähnt, konnten zahlreiche Peptidoglykan-Hydrolasen von *B. subtilis* (Ohnishi *et al.*, 1999) sowie auch das Protein PscB von Gruppe B Streptokokken (Reinscheid *et al.*, 2001), welches eine signifikante Ähnlichkeit mit p45 hat und wie p60 mit der Trennung der Zellteilungssepten assoziiert ist, deletiert werden. Das Verhalten dieser Mutanten spricht dafür, dass auch p60 zwar eine wichtige, aber keine prinzipiell essentielle Funktion ausübt.

6.5 Ist *iap* ein Virulenzfaktor von *L. monocytogenes* ?

Zur Beurteilung ihrer Virulenz wurde die Deletionsmutante Δiap in verschiedenen *in vitro* Experimenten daraufhin untersucht, ob sie noch zur Invasion in Wirtszellen, Freisetzung aus dem Phagosom, intrazellulären Replikation, Aktinschweifbildung und interzellulären Motilität fähig ist, d. h. zu allen bekannten spezifischen Eigenschaften, die *L. monocytogenes* als intrazelluläres Pathogen charakterisieren.

Wie schon in Kapitel 6.1 diskutiert, kann Δiap verschiedene Wirtszell-Linien nur mit einer um ca. 30 % reduzierten Effizienz im Vergleich zu wildtypischen Bakterien invadieren. Dabei scheint das

Defizit an p60 nicht direkt verantwortlich für diese leicht reduzierte Invasionsrate zu sein, eher werden Expression, Sekretion oder Lokalisation anderer Invasions-assoziiierter Proteine beeinflusst. P60-defiziente Bakterien können sich mit einer ähnlichen Verdopplungsrate wie wildtypische Bakterien im Zytosol von Wirtszellen vermehren, nachdem sie das Phagosom verlassen haben.

Im Zytosol der Zelle werden diese Bakterien von einem Saum aus fibrillärem Aktin umgeben. Dieses polymerisiert aber in der Regel nicht zu einem Aktinschweif aus, was zur Folge hat, dass die Bakterien sich nicht durch das Zytosol bewegen, sondern Mikrokolonien formen. Zusätzlich findet erst zu einem viel späteren Zeitpunkt als bei wildtypischen Bakterien eine Ausbreitung der p60-defizienten Bakterien in benachbarte Zellen statt, wobei die Infektionsherde in der Regel sehr klein bleiben. Diese Einschränkung in der interzellulären Motilität ist nicht so strikt wie bei einer $\Delta actA$ -Mutante, bei der man gar keine interzelluläre Motilität sehen kann (Kocks *et al.*, 1992). Vereinzelt können einige wenige p60-defiziente Bakterien beobachtet werden, welche von einem kurzen Aktinschweif umgeben sind und sich durch das Zytosol bewegen.

Die *in vivo* Virulenz dieses Stammes wurde durch orogastrische und intravenöse Infektionen von Mäusen bestimmt und lag bei beiden Applikationsarten ca. 3 Log-Stufen unter der des Wildtyps. Diese reduzierte Virulenz hängt dabei mit größter Wahrscheinlichkeit mit der eingeschränkten Motilität der Bakterien zusammen, die sich daher nur sehr schlecht in der Leber etablieren können. Eine $\Delta actA$ -Mutante erreicht eine ähnlich hohe Virulenz-Attenuation wie der p60-defiziente Stamm (Domann *et al.*, 1992, Kocks *et al.*, 1992).

Somit ist der Stamm Δiap zwar deutlich in seiner Virulenz attenuiert, aber p60 scheint kein eigentlicher Virulenzfaktor im engeren Sinn zu sein. Der einzige kontroverse Bericht, der dazu vorliegt, zeigt, dass p60-sezernierende Salmonellen mit viel höherer Effizienz in zwei Wirtszelltypen aufgenommen werden als wildtypische Salmonellen (Hess *et al.*, 1995), so dass diese Salmonellen virulenter geworden sind. Die Beteiligung von p60 an diesem Prozess muss aber noch weiter untersucht werden.

6.6 Die Lokalisation von ActA auf der Oberfläche von Δiap

Der Grund für die eingeschränkte Motilität der p60-defizienten Listerien ist darin zu suchen, dass diese intrazellulär keine polare Verteilung des Proteins ActA aufweisen. Kocks *et al.* konnten 1993 zeigen, dass ActA nicht symmetrisch auf der bakteriellen Oberfläche lokalisiert ist, das heißt, dass das Protein am alten Zellpol stark ankonzentriert wird und am neuen Pol nur schwach bis gar nicht nachweisbar ist. Die Autoren postulierten daraufhin, dass die polare Verteilung von ActA für die Bewegung der Bakterien in Richtung des neuen, ActA-freien Bakterienpols notwendig ist.

Die ActA Lokalisation der intrazellulären, p60-defizienten Bakterien scheint nicht gleichförmig zu sein, sondern eher unregelmäßig verteilt, so dass einige wenige Bakterien eine mehr oder weniger zufällige polare ActA-Verteilung aufweisen. Werden aber extrazelluläre *Δiap* Bakterien auf ihre ActA Lokalisation hin untersucht, so erkennt man bei diesen als kurze Zellketten wachsenden Bakterien dennoch eine Kumulation von ActA an den ältesten Bakterienpolen dieser Ketten (Abb. 6.2).

Die abgebildete Kette aus acht Einzelzellen entsteht theoretisch durch drei aufeinander folgende Zellteilungen (Abb. 6.2 B). Bei jeder Zellteilung wird ActA auf die alten Pole verteilt, während die neu gebildeten Pole frei bleiben. Bei *Δiap* dagegen trennen sich die alten Pole nicht voneinander, was zur Folge hat, dass sich in der zweiten Replikationsrunde (Abb. 6.2 B, II) das ActA zweier alter Pole in der Mitte der Kette anhäuft. Bei der dritten Replikationsrunde wiederholt sich der Vorgang: ActA wird in der Mitte der Kette weiter ankonzentriert (Abb. 6.1 B, geschlossene Pfeilspitze), während zusätzlich zwei neue aneinanderhängende alte Pole (Abb. 6.2 B, offene Pfeilspitzen) entstehen, an denen sich neue ActA-Ansammlungen bilden. Auf diese Weise entsteht das punktförmig erscheinende ActA-Verteilungsmuster des *Δiap* Stammes (Abb. 6.1 A).

Wie es von dieser gerichteten ActA-Verteilung zur einer eher unregelmäßigen Verteilung auf der Oberfläche der intrazellulären Bakterien kommt, ist nicht ganz klar. Theoretisch könnte durch das ungerichtete Brechen der kurzen Ketten von *Δiap* Bruchstücke aus kürzeren Ketten entstehen, welche ActA dann nicht mehr an ihren Polen tragen, sondern auch teilweise in der Mitte oder an anderen Stellen, so dass keine gerichtete, ActA-basierte intrazelluläre Fortbewegung zustande kommen kann (Abb. 6.1 C). So kann auch erklärt werden, dass einige wenige Bakterien dieses

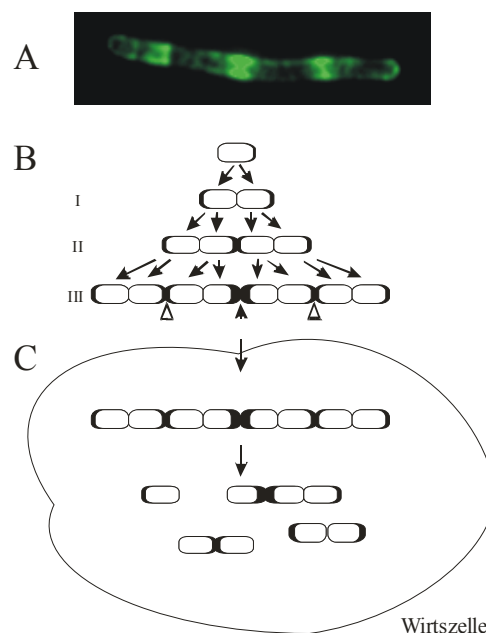


Abbildung 6.2: ActA-Lokalisation auf der Oberfläche von extrazellulären und intrazellulären Bakterien des Stammes *Δiap*.

Stammes eher zufällig eine korrekte ActA-Verteilung „erhalten“ und sich dadurch fortbewegen können.

6.7 Das *ΔtrpS* „Balanced-lethal“ Plasmid System

In dieser Arbeit konnte ein neuartiges „Balanced-lethal“ Plasmid-System geschaffen werden, das zum Ziel hat, ein Plasmid stabil an sein Trägerbakterium zu binden. Häufig werden solche Systeme dazu genutzt, bakterielle Vakzine-Stämme mit einem Antigen-Expressions-Plasmid auszustatten, welches *in vivo* zu 100 % stabil sein soll. Im Allgemeinen funktionieren „Balanced-lethal“ Systeme derart, dass das Chromosom des bakteriellen Vakzine-Stamms eine Deletion enthält, welche den Stamm in eine obligate Abhängigkeit von einem Stoffwechselprodukt drängt. Durch die genetische Komplementation des essentiellen Produktes auf einem Plasmid wird der Vakzine-Stamm von diesem Plasmid abhängig, so dass er im Wirtsorganismus entweder ein Plasmid-kodiertes Antigen exprimiert oder aber durch den Verlust des Plasmides abstirbt. Die Anwendbarkeit eines solchen Systems konnte für verschiedene *S. typhimurium* Stämme gezeigt werden, bei denen die Gene *dap* bzw. *asd* deletiert worden sind, so dass sie abhängig von dem Zellwandbestandteil Diaminopimelinsäure waren (Curtiss 3rd *et al.*, 1990, Galan *et al.*, 1990), sowie für einen *V. cholerae ΔglnA* Stamm mit einer obligaten Abhängigkeit von Glutamin (Ryan *et al.*, 2000) bzw. für einen *thyA L. acidophilus* Stamm, welcher Thymidin benötigt (Fu und Xu, 2000).

Das in dieser Arbeit konstruierte „Balanced-lethal“ System basiert auf der chromosomalen Deletion des essentiellen Biosynthese-Gens *trpS*, welches die Tryptophanyl-tRNA-Synthetase (TrpRS) von *L. monocytogenes* kodiert. Im Gegensatz zu den oben beschriebenen anderen „Balanced-lethal“ Systemen konnte in diesem System die Deletion nicht durch die Zugabe eines Stoffwechselendproduktes wie Diaminopimelinsäure oder Glutamin stabilisiert werden, da TrpRS ein zytosolisches Protein des Bakteriums darstellt, welches wahrscheinlich nicht von außen zugegeben werden kann. Aus diesem Grund musste die Deletion in Gegenwart eines TrpRS-exprimierenden Plasmides durchgeführt werden.

Das über *trpS* stabilisierte Plasmid erwies sich als zu 100 % stabil *in vitro* und auch *in vivo*. Während in anderen „Balanced-lethal“ Systemen ein Antigen-Expressions-Plasmid vorwiegend für eine effizientere Antigen-Expression in einem Vakzine-Stamm stabilisiert wurde, hat die Plasmid-Stabilisierung in dem hier beschriebenen „DNA delivery“ System zwei verschiedene Auswirkungen, da auf dem Plasmid neben einer eukaryotischen Expressionskassette auch eine Lysis-Kassette inseriert ist: zum einen wird eine eukaryotische Antigen-cDNA –ebenfalls zur Effizienzsteigerung – an den Trägerstamm gebunden und zum anderen wird gewährleistet, dass sich in jedem Bakterium eine Lysis-Kassette in hoher Kopiezahl (>100 Kopien, J. Stritzker, nicht veröffentlicht) befindet, welche es letztendlich abtötet. Erst mit der Kombination der 100 %igen

Plasmid-Stabilität und der lethalen Lysis-Kassette in hoher Kopienzahl konnte eine besonders hohe Attenuation eines *L. monocytogenes* Stammes erreicht werden (5-6 Log-Stufen im murinen Listeriose-Modell). Dadurch ist eine weitere Virulenz-Attenuation im murinen Modell zunächst unnötig.

6.8 Die Rolle des Phagenlysin 118 bei der intrazellulären Freisetzung von DNA

Ein wichtiger Schwerpunkt dieser Arbeit ist der Vorgang der intrazelluläre Lysis von *L. monocytogenes*, wodurch Plasmid-DNA aus den Bakterien freigesetzt werden sollte. Dietrich *et al.* veröffentlichten 1998 die erste Arbeit, in der ein eukaryotisches Expressions-Plasmid durch eine Phagenlysin-vermittelte Lysis in dem Zytosol von Makrophagen freigesetzt und exprimiert wurde. Als Lysis-Kassette wurde das Gen des Phagenlysin 118 verwendet, das unter die Kontrolle des Promotors von ActA ($P_{actA-PLY118}$) gestellt worden ist. Nach Infektion der Makrophagen-Zell-Linien P388.D1 und J774.A1 konnte eine durch diese Phagenlysin-Kassette bedingte Lysis mit einhergehender erhöhter Freisetzung von Plasmid-DNA (nur bei P388.D1) beobachtet werden, wobei die Zahl der lebenden intrazellulären Listerien sechs Stunden nach Infektion um ca. 50 % reduziert war (Dietrich *et al.*, 1998).

Auch unter Verwendung des neuen „Balanced-lethal“ Plasmid Systems konnte bestätigt werden, dass sich durch das Phagenlysin die Anzahl der intrazellulären Bakterien nach einigen Stunden um die Hälfte reduziert. Nach Infektion verschiedener Zell-Linien (HeLa, Caco-2, P388.D1) und der intrazellulären Detektion der mit dieser Lysis-Kassette ausgestatteten Listerien durch einen gegen ActA gerichteten Antikörper konnte zudem demonstriert werden, dass sich diese Bakterien trotz Phagenlysin in den Zellen zu vermehren schienen. Zwölf bzw. 24 Stunden nach Infektion konnten Infektionsherde beobachtet werden, die eine ähnliche Größe aufwiesen wie die von Bakterien, welche nicht mit einer Lysis-Kassette ausgestattet waren. Allerdings zeigten diese Phagenlysin-exprimierenden Bakterien ein abweichendes ActA-Färbemuster. Während die wildtypischen Bakterien von einem ActA-Saum mit ActA-Kumulation am alten Bakterienpol umgeben waren, erschien das ActA der Phagenlysin-exprimierenden Bakterien insgesamt schwächer exprimiert und unregelmäßiger auf der Oberfläche lokalisiert zu sein. Vermutlich ist zum einen die ActA-Expression in diesen Bakterien reduziert, da sehr viel PrfA von dem in über 100 Kopien vorliegendem ActA-Promotor der Lysis-Kassette weggefangen wird. Zum anderen scheint das Phagenlysin 118 die Zellwand der Bakterien derart zu desintegrieren, dass ActA, welches normalerweise über eine hydrophobe Domäne in der Zellmembran verankert ist, nur noch unregelmäßig auf der Bakterienoberfläche zu detektieren war.

Im Laufe von drei Tagen konnte zudem eine Zunahme der lebenden intrazellulären Phagenlysin-exprimierenden Listerien in verschiedenen Zell-Linien beobachtet werden (J. Stritzker, Diplomarbeit). Dieses Lysin scheint also die intrazellulären Bakterien entweder nur teilweise oder nur stark verzögert abzutöten.

Neben dieser veröffentlichten Phagenlysin-Kassette wurde in dieser Arbeit noch eine weitere getestet, welche neben dem ActA-Promotor auch das Signalpeptid von ActA enthält (P_{actA} -SP $_{actA}$ -ply118). Mit Hilfe des Signalpeptides sollte das Phagenlysin über die Zellwand des Bakteriums transportiert und dadurch seinem Substrat, dem Peptidoglykan, näher gebracht werden. Die allgemeine Vorstellung über die Wirkungsweise von Phagenlysinen beruht auf der Annahme, dass dieses Protein zusammen mit einem Holin von dem Phagen exprimiert wird, wobei das Holin Poren in der bakteriellen Membran bildet, durch die das Lysin an die Zellwand gelangt (Young, 1992).

Listerien, welche mit einem derart konstruiertem Export-fähigen Lysin ausgestattet waren, erreichten nur zu einem geringen Prozentsatz das Zytosol der Wirtszellen und setzten weniger Plasmid-DNA frei als Bakterien ohne Phagenlysin-Konstrukt. Diese Bakterien schienen daher schon extrazellulär lysiert worden zu sein, so dass erst gar keine Plasmid-DNA in die Wirtszelle gelangen konnte. Durch die Bestimmung der Lebendzellzahlen von in Zellkultur-Medium aufgenommenen Bakterien konnte aber ausgeschlossen werden, dass diese Bakterien allein durch Induktion der Lysis-Kassette in diesem Medium lysieren. Vermutlich ist der Kontakt mit den Wirtszellen dafür verantwortlich, dass der ActA-Promotor und somit auch das Export-fähige Phagenlysin aktiviert werden, wodurch die Bakterien extrazellulär lysieren.

Denkbar wäre auch, dass diese Bakterien genauso wie wildtypische das Zytosol erreichen und dort sehr schnell und effizient abgetötet werden. Die dabei freigesetzte Plasmid-DNA Menge wäre dann aber nicht ausreichend für eine sichtbare Expression des in diesen Untersuchungen verwendeten Reporterproteins EGFP.

Die wenigen Bakterien, die nach Infektion im Zytosol mit Hilfe einer anti-ActA-Färbung sichtbar gemacht werden konnten, breiten sich aber ähnlich schnell im Zellrasen aus und zeigten dasselbe ActA-Färbemuster wie wildtypische Bakterien. Es bleibt daher noch zu untersuchen, ob diese einzelnen Bakterien eine inaktivierende Mutation im Phagenlysin oder vielleicht auch das Phagenlysin-kodierende Plasmid verloren hatten, wobei letzteres auf Grund der Verwendung eines „Balanced-lethal“ Plasmides unwahrscheinlicher erscheint.

Wie geschildert, muss das Phagenlysin 118 zumindest über die bakterielle Membran gelangen, um sein Substrat, das Peptidoglykan der Zellwand, zu erreichen. Daher ist nicht klar, wie das mit Hilfe des ActA-Promotors exprimierte Phagenlysin, welches kein Signalpeptid besitzt, ohne die Hilfe eines Holin wirken kann. Es ist vorstellbar, dass die Wirkung erst nach einer lokalen Kumulation

des Proteins zustande kommt oder dass das Protein erst dann wirkt, wenn es in höherer Konzentration vorliegt.

In vivo werden die Listerien durch beide Phagenlysin-Konstrukte in einem extrem hohen Maß attenuiert, so dass man drei Tage nach Infektion von BALB/c Mäusen keine Phagenlysin-exprimierenden Bakterien aus der Leber und der Milz isolieren kann, während bei einer Infektion mit wildtypischen Bakterien ca. 10^5 - 10^6 Bakterien in diesen Organen nachgewiesen werden können. Dieser Befund steht daher in Widerspruch zu den *in vitro* durchgeführten Untersuchungen, in denen sich in diesem Zeitraum zumindest die Listerien, welche das Konstrukt P_{actA}-ply118 tragen, innerhalb von P388.D1 Makrophagen vermehren konnten.

Man kann daher spekulieren, dass die Phagenlysin-vermittelte Lysis der Bakterien in primären (phagozytischen) Zellen, welche zu den ersten Zellen gehören, die Listerien nach oraler Applikation aufnehmen, nach einem anderen Modus funktioniert als in Zell-Linien.

6.9 Die Bedeutung der interzellulären Motilität von *L. monocytogenes* beim *in vitro* „DNA delivery“

Bakterien mit einer ActA- oder p60-Defizienz konnten im Vergleich zu wildtypischen Stämmen nur wenig EGFP-exprimierende Plasmid-DNA in Zytosol von Zell-Linien freisetzen, so dass insgesamt nur sehr wenige Zellen mit EGFP-Expression beobachtet werden konnten. Diese Beobachtung konnte sowohl für Bakterien gemacht werden, welche die Kasette P_{actA}-ply118 exprimierten als auch für Bakterien ohne Lysis-Kasette. Dieses Resultat erscheint zunächst logisch, da wildtypische Bakterien, welche zu einer normalen interzellulären Motilität fähig sind und sich durch den Zellrasen bewegen können, quantitativ mehr Zellen infizieren als ActA-defiziente Bakterien, welche in ihrer Motilität eingeschränkt sind und in den primär infizierten Zellen verbleiben.

In einem weiteren Experiment wurde daher die Anzahl der primär infizierten Zellen durch eine Anhebung der MOI der ActA-defizienten, Phagenlysin-exprimierenden Bakterien erhöht. Bei dieser Infektion konnte davon ausgegangen werden, dass annähernd alle Zellen im Zellrasen mit diesen Bakterien infiziert waren, da man zwei Stunden nach Infektion aus ca. 5×10^5 Zellen $1,7 \times 10^6$ Bakterien isolieren konnte. Trotzdem konnte in diesem Ansatz nur 0,8 % EGFP-exprimierende Zellen beobachtet werden, im Gegensatz zur Infektion mit wildtypischen Bakterien, welche in ca. 22 % der Zellen eine EGFP-Expression herbeiführten.

Auf diesem Weg konnte gezeigt werden, dass die Fähigkeit der Zell-zu-Zell-Fortbewegung besonders wichtig für eine effiziente Freisetzung von Plasmid-DNA zu sein scheint. Freisetzung von Plasmid-DNA aus Bakterien erfordert vermutlich eine teilweise Desintegration der

Bakterienzellen bis hin zu einer kompletten Zerstörung des Bakteriums. Daher stellt sich die Frage, ob Bakterien, welche sich mit Aktin-basierter Motilität in benachbarte Zellen hineinbewegen, dort von einer sekundären Vakuole eingeschlossen werden und sich anschließend aus dieser heraus in das Zytosol befreien können, einer erhöhten Desintegration ausgesetzt sind. Es ist bekannt, dass zur Freisetzung von *L. monocytogenes* die sekundäre, von einer Doppelmembran umgebene Vakuole angesäuert werden muss, damit die für diesen Vorgang nötigen Virulenzfaktoren (PlcB) aktiviert werden (Marquis und Hager, 2000). Folglich ist vorstellbar, dass eine Ansäuerung des umgebenden Milieus die Bakterien derart angreifen könnte, dass eine Freisetzung der Plasmid-DNA erfolgt. Konsequenterweise müsste man dies dann auch für die Aufnahme der Bakterien in das Phagosom der primär infizierten Zelle annehmen.

6.10 Attenuierte *Listerien* als Vektoren in „DNA delivery“ Systemen

Potentielle bakterielle Vakzine-Stämme müssen eine ausreichende Virulenz-Attenuation aufweisen, um für eine Anwendung am Menschen zugelassen zu werden. Diese Attenuation muss zum einen verhindern, dass klinische Symptome durch den Trägerstamm auftreten, zum anderen muss sie aber zulassen, dass der bakterielle Vektor ein Antigen oder eine Antigen-cDNA in seine Zielzellen transportiert. Der einzige gezielt attenuierte *Listeria* Stamm, welcher bislang in einer klinischen Studie an Erwachsenen erprobt worden ist, war eine *L. monocytogenes* $\Delta actA$ $\Delta plcB$ Doppelmutante (Angelakopoulos *et al.*, 2002). Nach einer oralen Gabe von 10^9 Bakterien konnten in erwachsenen Patienten eine Immunantwort gegen das Bakterium nachgewiesen werden, aber es wurden keine klinischen Symptome festgestellt.

Wie bereits diskutiert, scheint – zumindest *in vitro* – eine *actA*-Deletion kontraproduktiv für eine Übertragung von Plasmid-DNA durch *Listeria* zu sein. Verschiedene Zell-Linien exprimierten nach Infektion mit einem ActA-defizienten Stamm nur vergleichsweise selten ein durch die Bakterien übertragenes EGFP-Expressions-Plasmid. Das gleiche gilt für einen p60-defizienten Stamm, da dieser in einem ähnlichen Ausmaß wie eine *actA*-Mutante in seiner intra- und interzellulären Fortbewegung beeinträchtigt ist. Hense *et al.* konnten durch die Verwendung einer Δhly und einer $\Delta inlAB$ -Mutante demonstrieren, dass sowohl die Invasionsfähigkeit als auch die Eigenschaft, aus dem Phagosom zu entkommen, für einen effizienten Transfer von Plasmid-DNA nötig sind (Hense *et al.*, 2001). Ebenso wurde mit Hilfe einer $\Delta plcB$ -Mutante festgestellt, dass eine vorhandene interzelluläre Motilität produktiv für einen effektiven Gentransfer *in vitro* ist (Grillot-Courvalin *et al.*, 2002). Zusammengefasst kann man also keine für den intrazellulären Zellzyklus von *L. monocytogenes* essentiellen Virulenzfaktoren zu einer Attenuierung des Pathogens inaktivieren, ohne dadurch seine DNA-transferierende Fähigkeit einzuschränken.

Eine andere Möglichkeit besteht darin, Stoffwechselmutanten *in vivo* zu verwenden. So konnten *S. typhimurium* SL7207, ein Stamm mit einer *aroA* Mutation, oder *Shigella* Stämme mit einer Deletion des Gens *asd* erfolgreich *in vivo* als Vektoren für DNA-Vakzine eingesetzt werden. J. Stritzker konnte kürzlich einen *L. monocytogenes* Δ *aroA* Stamm konstruieren, welcher in Mäusen in einem sehr hohen Maß attenuiert ist. Dieser Stamm scheint zwar nicht-phagozytische Zell-Linien effektiver mit Plasmid-DNA zu baktifizieren als ein vergleichbarer wildtypischer Stamm, jedoch funktioniert der Gentransfer in P388.D1 Makrophagen mit diesem Stamm nicht ganz so effizient wie mit wildtypischen Bakterien (Stritzker, nicht veröffentlicht). Daher bleibt abzuwarten, ob ein derart attenuierter *Listeria* Stamm *in vivo* als Vakzine-Vektor verwendet werden kann.

6.11 KMP-11 als Antigen bei der *in vivo* Freisetzung von Vakzine DNA

Um zu untersuchen, ob *L. monocytogenes* als Vektor für eine Vakzine-DNA *in vivo* einsetzbar ist, wurde als Infektionsmodell die murine Leishmaniose herangezogen. Eine effektive Immunität gegen *L. major*, dem Erreger der kutanen Leishmaniose, benötigt eine IL-12 abhängige Produktion von IFN- γ durch CD4⁺ T-Zellen (Heizel *et al.*, 1993, Sypek *et al.*, 1993, Scharon-Kersten *et al.*, 1995).

DNA-Vakzine, welche ein Proteinantigen (LACK) von *L. major* kodierten, konnten Antigen-spezifische CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen induzieren, welche eine lang anhaltende Immunität gegen eine *Leishmania* Infektion vermitteln und protektiv waren (Gurunathan *et al.*, 1997, Gurunathan *et al.*, 2000b). Dabei ging ein Teil dieses Schutzes nach Depletierung der CD8⁺ T-Zellen verloren. Das für diese Arbeit verwendete *Leishmania* Antigen war das Kinetoplastid-Membranprotein-11 (KMP-11). Dieses ist ein Lipophosphoglykan- und Membran-assoziiertes, amphipatisches Protein, welches in zahlreichen *Leishmania* und *Trypanosoma* Spezies exprimiert wird (Tolson *et al.*, 1994). Es kann sowohl humorale als auch zelluläre Immunantworten induzieren und scheint BALB/c Mäuse teilweise vor einer Infektion mit *Leishmania major* zu schützen (Tolson *et al.*, 1994, Jensen *et al.*, 1998, Planelles *et al.*, 2001, Ramirez, J.R. *et al.*, 2001).

Die cDNA für dieses Antigen wurde in dieser Arbeit zusätzlich mit der „ER targeting leader sequence“ des humanen „tissue plasminogen activators“ (htPA) versehen. Diese ER-Signalsequenz kann die Expression einer nachgestellten cDNA erhöhen (Chapman *et al.*, 1991). In DNA-Vakzinierungsstudien wurde zudem demonstriert, dass diese Signalsequenz sowohl humorale als auch zytotoxische Immunantworten erhöhen kann (Shiver *et al.*, 1996). Es wurde vermutet, dass durch ER-Signalsequenzen ein TAP-unabhängiger Transport der Peptide zu den MHC Klasse I Molekülen im Endoplasmatischen Retikulum (ER) stattfindet (Restifo *et al.*, 1995). Auch die mit der tPA-Signalsequenz versehene KMP-11 cDNA schien in einem höheren Maße als die originale

KMP-11 cDNA in Fibroblasten exprimiert zu werden und wurde daher bevorzugt in den Vakzinierungs-Untersuchungen verwendet.

BALB/c Mäusen wurden 10^{10} Listerien ein- oder zweimal oral appliziert. Diese Listerien waren zum einen mit der Lysis-Kassette P_{actA} -*ply118* und zum anderen mit der cDNA für das Antigen tpA-KMP ausgestattet. Vier von 15 Mäusen (27 %) mit zweimaliger Listerieninfektion zeigten eine spezifische proliferative Antwort auf das Antigen, während 10 % der Tieren nach einmaliger und 65 % der Tiere nach zweimaliger Listerien-Applikation eine spezifische Antwort auf ein *Listeria*-Lysat entwickelten. Dies war insofern positiv, da Listerien, welche diese Lysis-Kassette exprimieren, in einem sehr hohen Maß attenuiert sind (6 Log Stufen im Modell der experimentellen murinen Listeriose), so dass fraglich war, ob überhaupt eine Immunantwort gegen den Träger entwickelt werden würde.

Es bleibt aber noch zu untersuchen, wie eine so gemessene proliferative Antwort nach Infektion mit wildtypischen Listerien ausfällt. Man muss aber annehmen, dass nur eine Immunantwort gegen eine DNA-Vakzine erwarten werden kann, wenn auch gleichzeitig eine Immunantwort gegen den Plasmid-Träger etabliert wird, da beide, der Träger *Listeria* und das Vakzine-Plasmid, nur gemeinsam die für die Induktion der Immunität entscheidende Antigen-präsentierende Zelle erreichen.

7. LITERATUR

Al-Mariri, A., Tibor, A., Lestrade, P., Mertens, P., De Bolle, X., und Letesson, J. J. (2002) *Yersinia enterocolitica* as a vehicle for a naked DNA vaccine encoding *Brucella abortus* bacterioferritin or P39 antigen. *Infect. Immun.* 70:1915–1923.

Angelakopoulos, H., Loock, K., Sisul, D. M., Jensen, E. R., Miller, J. F., und Hohmann, E. L. (2002) Safety and shedding of an attenuated strain of *Listeria monocytogenes* with a deletion of *actA/plcB* in adult volunteers: a dose escalation study of oral inoculation. *Infect. Immun.* 70:3592–3601.

Bancroft, G. J., Schreiber, R. D., und Unanue, E. R. (1991) Natural immunity: a T-cell-independent pathway of macrophage activation, defined in the scid mouse. *Immunol. Rev.* 124:5–24.

Beck, M. (2002) Doktorarbeit.

Beckerman, K. P., Rogers, H. W., Corbett, J. A., Schreiber, R. D., McDaniel, M. L., und Unanue, E. R. (1993) Release of nitric oxide during the T cell-independent pathway of macrophage activation. Its role in resistance to *Listeria monocytogenes*. *J. Immunol.* 150:888–895.

Bendigs, S., Salzer, U., Lipford, G. B., Wagner, H., und Heeg, K. (1999) CpG-oligodeoxynucleotides co-stimulate primary T cells in the absence of antigen-presenting cells. *Eur. J. Immunol.* 29:1209–1218.

Bennett, J., und Scott, K. J. (1971). Quantitative staining of fraction I protein in polyacrylamide gels using Coomassie brilliant blue. *Anal Biochem.* 43:173–182.

Bielecki J. (1994) Insertions within *iap* gene of *Listeria monocytogenes* generated by plasmid pLIV are not lethal. *Acta Microbiol. Pol.* 43:133–143.

Bierne, H., Mazmanian, S. K., Trost, M., Pucciarelli, M. G., Liu, G., Dehoux, P., Jansch, L., Garcia-del Portillo, F., Schneewind, O., und Cossart, P. (2002) Inactivation of the *srtA* gene in *Listeria monocytogenes* inhibits anchoring of surface proteins and affects virulence. *Mol. Microbiol.* 43:869–881.

Birnboim, H. C., und Doly, J. (1979). A rapid alkaline lysis procedure for screening recombinant plasmid DNA from Agarose. *Nucleic Acids Research.* 7:1513–1523.

Brehm, K. (1995) Doktorarbeit.

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

Bubert, A., Kuhn, M., Goebel, W., und Köhler, S. (1992). Structural and functional properties of the p60 proteins from different *Listeria* species. *J. Bacteriol.* 174:8166–8171.

Bubert, A., Schubert, S., Köhler, S., Frank, R., und Goebel, W. (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.* 60:3120–3127.

Burnette, W. N. (1981). "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal. Biochem.* 112:195–203.

Busch, D. H., Pilip, I. M., Vijh, S., Pamer, E. G. (1998) Coordinate regulation of complex T cell populations responding to bacterial infection. *Immunity* 8:353–362.

Busch, D. H., Kerksiek, K., und Pamer, E. G. (1999) Processing of *Listeria monocytogenes* antigens and the *in vivo* T-cell response to bacterial infection. *Immunol. Rev.* 172:163–169.

Camilli, A., Goldfine, H. und Portnoy, D. A. (1991) *Listeria monocytogenes* mutants lacking phosphatidyl-specific phospholipase C are avirulent. *J. Exp. Med.* 173:751–754.

- Cardon, L. R.**, Burge, C., Clayton, D.A., und Karlin, S. (1994) Pervasive CpG suppression in animal mitochondrial genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 91:3799–3803.
- Chakraborty, T.**, Leimeister-Wächter, M., Domann, E., Hartl, M., Goebel, W., Nichterlein, T. und Notermans, S. (1992) Coordinate regulation of virulence genes in *Listeria monocytogenes* requires the product of the *prfA* gene. *J. Bacteriol.* 174:568–574.
- Chapman, B. S.**, Thayer, R. M., Vincent, K. A., und Haigwood, N. L. (1991) Effect of intron A from human cytomegalovirus (Towne) immediate-early gene on heterologous expression in mammalian cells. *Nucleic Acids Res.* 19:3979–3986.
- Chico-Calero, I.**, Suarez, M., Gonzalez-Zorn, B., Scotti, M., Slaghuis, J., Goebel, W., und Vazquez-Boland, J. A. (2002) Hpt, a bacterial homolog of the microsomal glucose-6-phosphate translocase, mediates rapid intracellular proliferation in *Listeria*. *Proc Natl Acad* 99:431–436.
- Chomczynski, P.**, Mackey, K., Drews, R., und Wilfinger, W. (1997). DNazol: A reagent for the rapid isolation of genomic DNA. *BioTechniques* 22:550–553.
- Condon, C.**, Watkins, S. C., Celluzzi, C. M., Thompson, K., und Falo, L. D. Jr. (1996) DNA-based immunization by *in vivo* transfection of dendritic cells. *Nat. Med.* 2:1122–1128.
- Conlan, J. W.**, und North, R. J. (1991) Neutrophil-mediated dissolution of infected host cells as a defense strategy against a facultative intracellular bacterium. *J. Exp. Med.* 174:741–744.
- Cormack, B. P.**, Valdivia, R. H., und Falkow, S. (1996) FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene* 173:33–38.
- Cossart, P.** und Lecuit, M. (1998) Interactions of *Listeria monocytogenes* with mammalian cells during entry and actin-based movement: bacterial factors, cellular ligands and signaling. *EMBO J.* 17:3797–3806.
- Cousens, L. P.**, und Wing, E. J. (2000) Innate defenses in the liver during *Listeria* infection. *Immunol. Rev.* 174:150–159.
- Curtiss, R. 3rd**, Galan, J. E., Nakayama, K., und Kelly, S. M. (1990) Stabilization of recombinant avirulent vaccine strains *in vivo*. *Res. Microbiol.* 141:797–805.
- Dabiri, G. A.**, Sanger, J. M., Portnoy, D. A. und Southwick, F. S. (1990) *Listeria monocytogenes* moves rapidly through the host-cell cytoplasm by inducing directional actin assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:6068–6072.
- Daniels, J. J.**, Autenrieth, I. B., und Goebel, W. (2000) Interaction of *Listeria monocytogenes* with the intestinal epithelium. *FEMS Microbiol. Lett.* 190:323-328.
- Darji, A.**, Guzman, C. A., Gerstel, B., Wachholz, P., Timmis, K. N., Wehland, J., Chakraborty, T., und Weiss, S. (1997) Oral somatic transgene vaccination using attenuated *S. typhimurium*. *Cell* 91:765–775.
- Dean, D. A.**, Dean, B. S., Muller, S., und Smith, L. C. (1999) Sequence requirements for plasmid nuclear import. *Exp. Cell Res.* 253:713–722.
- De Rossi, E.**, Brigidi, P., Welker, N. E., Riccardi, G., und Matteuzzi, D. (1994). New shuttle vector for cloning in *Bacillus stearothermophilus*. *Res. Microbiol.* 145:579–583.
- Dhar, G.**, Faull, K. F., und Schneewind, O. (2000) Anchor structure of cell wall surface proteins in *Listeria monocytogenes*. *Biochemistry* 39:3725–3733.
- Dietrich, G.**, Bubert, A., Gentschev, I., Sokolovic, Z., Simm, A., Catic, A., Kaufmann, S. H., Hess, J., Szalay, A. A., und Goebel, W. (1998). Delivery of antigen-encoding plasmid DNA into the cytosol of macrophages by attenuated suicide *Listeria monocytogenes*. *Nat. Biotechnol.* 16:181–185.
- Dietrich, G.** (1998) Doktorarbeit.

- Dietrich, G.**, Gentshev, I., Hess, J., Ulmer, J. B., Kaufmann, S. H., und Goebel, W. (1999) Delivery of DNA vaccines by attenuated intracellular bacteria. *Immunol. Today* 20:251–253.
- Domann, E.**, Wehland, J., Rohde, M., Pistor, S., Hartl, M., Goebel, W., Leimeister-Wächter, M., Wuenscher, M. und Chakraborty, T. (1992) A novel bacterial gene in *Listeria monocytogenes* required for host cell microfilament interaction with homology to the proline-rich region of vinculin. *EMBO J.* 11:1981–1990.
- Donnelly, C. W.** (1994) *Listeria monocytogenes*, p. 215–252. In Hui, Y. H., Gorham, J. R., Murrell, K. D. and Cliver, D. O. (ed.), Foodborne disease handbook: diseases caused by bacteria, vol. 1 Marcel Dekker, New York, N. Y.
- Donnelly, J. J.**, Ulmer, J. B., Shiver, J. W., und Liu, M. A. (1997) DNA vaccines. *Annu. Rev. Immunol.* 15:617–648.
- Dramsi, S.**, Levi, S., Triller, A., und Cossart, P. (1998) Entry of *Listeria monocytogenes* into neurons occurs by cell-to-cell spread: an *in vitro* study. *Infect. Immun.* 66:4461–4468.
- Drevets, D. A.**, Canono, B. P., Leenen, P. J., und Campbell, P. A. (1994) Gentamicin kills intracellular *Listeria monocytogenes*. *Infect. Immun.* 62:2222–2228.
- Drevets, D. A.**, Sawyer, R. T., Potter, T.A., und Campbell, P. A. (1995) *Listeria monocytogenes* infects human endothelial cells by two distinct mechanisms. *Infect. Immun.* 63:4268–4276.
- Drevets, D. A.** (1998) *Listeria monocytogenes* virulence factors that stimulate endothelial cells. *Infect. Immun.* 66:232–238.
- Domann, E.**, Wehland, J., Rohde, M., Pistor, S., Hartl, M., Goebel, W., Leimeister-Wächter, M., Wuenscher, M., und Chakraborty, T. (1992). A novel bacterial virulence gene in *Listeria monocytogenes* required for host cell microfilament interaction with homology to the proline-rich region of vinculin. *EMBO J.* 11:1981–1990.
- Ebe, Y.**, Hasegawa, G., Takatsuka, H., Umezu, H., Mitsuyama, M., Arakawa, M., Mukaida, N., und Naito, M. (1999) The role of Kupffer cells and regulation of neutrophil migration into the liver by macrophage inflammatory protein-2 in primary listeriosis in mice. *Pathol. Int.* 49:519–532.
- Edelson, B. T.**, Cossart, P., und Unanue, E. R. (1999) Cutting edge: paradigm revisited: antibody provides resistance to *Listeria* infection. *J. Immunol.* 163:4087–4090.
- Engelbrecht, F.**, Chun, S.-K., Ochs, C., Hess, J., Lottspeich, F., Goebel, W., und Sokolovic, Z. (1996). A new PrfA-regulated gene of *Listeria monocytogenes* encoding a small, secreted protein which belongs to the family of internalins. *Mol. Microbiol.* 21:823–837.
- Finlay, B. B.**, und Falkow, S. (1997) Common themes in microbial pathogenicity revisited. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61:136–169.
- Flamm, R. K.**, Hinrichs, D. J., und Thomashow, M. F. (1984) Introduction of pAM beta 1 into *Listeria monocytogenes* by conjugation and homology between native *L. monocytogenes* plasmids. *Infect. Immun.* 44:157–161.
- Fu, X.**, und Xu, J. G. (2000) Development of a chromosome-plasmid balanced lethal system for *Lactobacillus acidophilus* with *thyA* gene as selective marker. *Microbiol. Immunol.* 44:551–556.
- Gaeng, S.**, Scherer, S., Neve, H., und Loessner, M. (2000) Gene cloning and Expression and Secretion of *Listeria monocytogenes* Bacteriophage-Lytic Enzymes in *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:2951–2958.
- Gaillard, J. L.**, Berche, P., Mounier, J., Richard, S., und Sansonetti, P. (1987) In vitro model of penetration and intracellular growth of *Listeria monocytogenes* in the human enterocyte-like cell line Caco-2. *Infect. Immun.* 55:2822–2829.
- Gaillard, J. L.**, Berche, P., Frehel, C., Gouin, E. und Cossart, P. (1991) Entry of *L. monocytogenes* into cells is mediated by internalin, a repeat protein reminiscent of surface antigens from gram-positive cocci. *Cell* 65:1127–1141.

- Galan, J. E.**, Nakayama, K., und Curtiss, R. 3rd. (1990) Cloning and characterization of the *asd* gene of *Salmonella typhimurium*: use in stable maintenance of recombinant plasmids in *Salmonella* vaccine strains. *Gene*. 94:29–35.
- Galen, J. E.**, Nair, J., Wang, J. Y., Wasserman, S. S., Tanner, M. K., Sztejn, M. B., und Levine, M. M. (1999). Optimization of plasmid maintenance in the attenuated live vector vaccine strain *Salmonella typhi* CVD 908-htrA. *Infect. Immun.* 67:6424–6433.
- Gentschev, I.**, Sokolovic, Z., Köhler, S., Krohne, G. F., Hof, H., Wagner, J., und Goebel, W. (1992) Identification of p60 antibodies in human sera and presentation of this listerial antigen on the surface of attenuated *salmonellae* by the HlyB-HlyD secretion system. *Infect. Immun.* 60:5091–5098.
- Glaser, P.**, Frangeul, L., Buchrieser, C., Rusniok, C., Amend, A., Baquero, F., Berche, P., Bloecker, H., Brandt, P., Chakraborty, T., Charbit, A., Chetouani, F., Couve, E., de Daruvar, A., Dehoux, P., Domann, E., Dominguez-Bernal, G., Duchaud, E., Durant, L., Dussurget, O., Entian, K. D., Fsihi, H., Portillo, F. G., Garrido, P., Gautier, L., Goebel, W., Gomez-Lopez, N., Hain, T., Hauf, J., Jackson, D., Jones, L. M., Kaerst, U., Kreft, J., Kuhn, M., Kunst, F., Kurapkat, G., Madueno, E., Maitournam, A., Vicente, J. M., Ng, E., Nedjari, H., Nordsiek, G., Novella, S., de Pablos, B., Perez-Diaz, J. C., Purcell, R., Rimmel, B., Rose, M., Schlueter, T., Simoes, N., Tierrez, A., Vazquez-Boland, J. A., Voss, H., Wehland, J., und Cossart, P. (2001) Comparative genomics of *Listeria* species. *Science* 294:849–852.
- Gouin, E.**, Mengaud, J. und Cossart, P. (1994) The virulence gene cluster of *Listeria monocytogenes* is also present in *Listeria ivanovii*, an animal pathogen, and *Listeria seeligeri*, a nonpathogenic species. *Infect. Immun.* 62:3550–3553.
- Gray, M. L.** und Killinger, A. H. (1966) *Listeria monocytogenes* and listeric infections. *Bacteriol. Rev.* 30:309–382.
- Gregory, S. H.**, und Wing, E. J. (2002) Neutrophil-Kupffer cell interaction: a critical component of host defenses to systemic bacterial infections. *J. Leukoc. Biol.* 72:239–248.
- Greiffenberg, L.**, Goebel, W., Kim, K.S., Weiglein, I., Bubert, A., Engelbrecht, F., Stins, M., und Kuhn, M. (1998) Interaction of *Listeria monocytogenes* with human brain microvascular endothelial cells: InlB-dependent invasion, long-term intracellular growth, and spread from macrophages to endothelial cells. *Infect. Immun.* 66:5260–5267.
- Grillot-Courvalin, C.**, Goussard, S., Huetz, F., Ojcius, D. M., und Courvalin, P. (1998) Functional gene transfer from intracellular bacteria to mammalian cells. *Nat. Biotechnol.* 16:862–866.
- Grillot-Courvalin, C.**, Goussard, S., und Courvalin, P. (2002) Wild-type intracellular bacteria deliver DNA into mammalian cells. *Cell. Microbiol.* 4:177–186.
- Gulden, P. H.**, Fischer, P. 3rd, Sherman, N. E., Wang, W., Engelhard, V. H., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., und Pamer, E. G. (1996) A *Listeria monocytogenes* pentapeptide is presented to cytolytic T lymphocytes by the H2-M3 MHC class Ib molecule. *Immunity* 5:73–79.
- Gurunathan, S.**, Sachs, D.L., Brown, D.R., Reiner, S.L., Charest, H., Glaichenhaus, N., und Seder, R. A. (1997) Vaccination with DNA encoding the immunodominant LACK parasite antigen confers protective immunity to mice infected with *Leishmania major*. *J. Exp. Med.* 186:1137–1147.
- Gurunathan, S.**, Klinman, D. M., und Seder, R. A. (2000) DNA vaccines: immunology, application, and optimization*. *Annu. Rev. Immunol.* 18:927–974.
- Gurunathan, S.**, Stobie, L., Prussin, C., Sacks, D. L., Glaichenhaus, N., Iwasaki, A., Fowell, D. J., Locksley, R. M., Chang, J. T., Wu, C. Y., und Seder, R. A. (2000b) Requirements for the maintenance of Th1 immunity in vivo following DNA vaccination: a potential immunoregulatory role for CD8+ T cells. *J. Immunol.* 165:915–924.
- Guzman, C. A.**, Rohde, M., Chakraborty, T., Domann, E., Hudel, M., Wehland, J., und Timmis, K. N. (1995) Interaction of *Listeria monocytogenes* with mouse dendritic cells. *Infect. Immun.* 63:3665–3673.

- Guzman, C. A.**, Domann, E., Rohde, M., Bruder, D., Darji, A., Weiss, S., Wehland, J., Chakraborty, T. und Timmis, K. N. (1996) Apoptosis of mouse dendritic cells is triggered by listeriolysin, the major virulence determinant. *Mol. Microbiol.* 20:119–126.
- Haima, P.**, Van Sinderen, D., Schotting, H., Bron, S., und Venema, G. (1990). Development of a beta-galactosidase alpha-complementation system for molecular cloning in *Bacillus subtilis*. *Gene* 86:63–69.
- Halpern, M. D.**, Kurlander, R. J., und Pisetsky, D. S. (1996) Bacterial DNA induces murine interferon-gamma production by stimulation of interleukin-12 and tumor necrosis factor-alpha. *Cell. Immunol.* 167:72–78.
- Harry, E. J.** (2001) Bacterial cell division: regulating Z-ring formation. *Mol. Microbiol.* 40:795–803.
- Hartl, M.** (1990) Diplomarbeit.
- Harty, J. T.**, und Bevan, M. J. (1995) Specific immunity to *Listeria monocytogenes* in the absence of IFN gamma. *Immunity* 3:109–117.
- Harty, J. T.**, und Pamer, E. G. (1995) CD8 T lymphocytes specific for the secreted p60 antigen protect against *Listeria monocytogenes* infection. *J. Immunol.* 154:4642–4650.
- Hauf, N.**, Goebel, W., Fiedler, F., Sokolovic, Z., und Kuhn, M. (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* 94:9394–9399.
- Heinzel, F.P.**, Schoenhaut, D. S., Rerko, R. M., Rosser, L. E. und Gately, M. K. (1993) Recombinant interleukin 12 cures mice infected with *Leishmania major*. *J. Exp. Med.* 177:1505–1509.
- Hense, M.**, Domann, E., Krusch, S., Wachholz, P., Dittmar, K. E., Rohde, M., Wehland, J., Chakraborty, T., und Weiss, S. (2001) Eukaryotic expression plasmid transfer from the intracellular bacterium *Listeria monocytogenes* to host cells. *Cell. Microbiol.* 3:599–609.
- Hess, J.**, Gentschev, I., Szalay, G., Ladel, C., Bubert, A., Goebel, W., und Kaufmann, S. H. E. (1995) *Listeria monocytogenes* p60 supports host cell invasion by and in vivo survival of attenuated *Salmonella typhimurium*. *Infect. Immun.* 63:2047–2053.
- Hess, J.**, Dietrich, G., Gentschev, I., Miko, D., Goebel, W., und Kaufmann, S. H. (1997) Protection against murine listeriosis by an attenuated recombinant *Salmonella typhimurium* vaccine strain that secretes the naturally somatic antigen superoxide dismutase. *Infect. Immun.* 65:1286–1292.
- Higuchi, R.** (1990) Recombinant PCR, p.177–183. In Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J., and White, T. J. (ed.), PCR Protocols: A guide to methods and applications. Academic press inc., San Diego, California.
- Hochuli, E.**, Döbeli, H., und Schacher, A. (1987). New metal chelate adsorbent selective for proteins and peptides containing neighbouring histidine residues. *J. Chromatogr.* 411:177–184.
- Ireton, K.** und Cossart, P. (1998) Interaction of invasive bacteria with host signaling pathways. *Curr. Opin. Cell Biol.* 10:276–283.
- Isberg, R. R.** und Tran Van Nhieu, G. (1994) Binding and internalization of microorganisms by integrin receptors. *Trends Microbiol.* 2:10–14.
- Jakob, T.**, Walker, P. S., Krieg, A. M., Udey, M. C., und Vogel, J. C. (1998) Activation of cutaneous dendritic cells by CpG-containing oligodeoxynucleotides: a role for dendritic cells in the augmentation of Th1 responses by immunostimulatory DNA. *J. Immunol.* 161:3042–3049.
- Jensen, A. T.**, Gasim, S., Ismail, A., Gaafar, A., Kurtzhals, J. A., Kemp, M., El Hassan, A. M., Kharazmi, A., und Theander, T. G. (1998) Humoral and cellular immune responses to synthetic peptides of the *Leishmania donovani* kinetoplastid membrane protein-11. *Scand. J. Immunol.* 48:103–109.

- Jonquieres, R.**, Bierne, H., Mengaud, J., und Cossart P. (1998) The *inlA* gene of *Listeria monocytogenes* LO28 harbors a nonsense mutation resulting in release of internalin. *Infect. Immun.* 66:3420–3422.
- Jonquieres, R.**, Bierne, H., Fiedler, F., Gounon, P., und Cossart, P. (1999) Interaction between the protein InlB of *Listeria monocytogenes* and lipoteichoic acid: a novel mechanism of protein association at the surface of gram-positive bacteria. *Mol. Microbiol.* 34:902–914.
- Junttila, J. R.**, Niemala, S. I., und Hirn, J. (1988) Minimum growth temperature of *Listeria monocytogenes* and non-haemolytic *Listeria*. *J. Appl. Bacteriol.* 65:321–327.
- Kagi, D.**, Ledermann, B., Burki, K., Hengartner, H., und Zinkernagel, R.M. (1994) CD8+ T cell-mediated protection against an intracellular bacterium by perforin-dependent cytotoxicity. *Eur. J. Immunol.* 24:3068–3072.
- Kaufmann, S. H.**, Emoto, M., Szalay, G., Barsig, J., und Flesch, I. E. (1997) Interleukin-4 and listeriosis. *Immunol. Rev.* 158:95–105.
- Kayal, S.**, Lilienbaum, A., Poyart, C., Memet, S., Israel, A., und Berche, P. (1999) Listeriolysin O-dependent activation of endothelial cells during infection with *Listeria monocytogenes*: activation of NF-kappa B and upregulation of adhesion molecules and chemokines. *Mol. Microbiol.* 31:1709–1722.
- Klarsfeld, A. D.**, Goossens, P. L., und Cossart, P. (1994) Five *Listeria monocytogenes* genes preferentially expressed in infected mammalian cells: *plcA*, *purH*, *purD*, *pyrE* and an arginine ABC transporter gene, *arpJ*. *Mol. Microbiol.* 13:585–597.
- Klinman, D. M.**, Yi, A. K., Beaucage, S. L., Conover, J., und Krieg, A. M. (1996) CpG motifs present in bacteria DNA rapidly induce lymphocytes to secrete interleukin 6, interleukin 12, and interferon gamma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 93:2879–2883.
- Kocks, C.**, Gouin, E., Tabouret, M., Berche, P., Ohayon, H., und Cossart, P. (1992) *L. monocytogenes*-induced actin assembly requires the *actA* gene product, a surface protein. *Cell* 68:521–531.
- Kocks, C.**, Hellio, R., Gounon, P., Ohayon, H., und Cossart, P. (1993) Polarized distribution of *Listeria monocytogenes* surface protein ActA at the site of directional actin assembly. *J. Cell Sci.* 105:699–710.
- Köhler, S.**, Leimeister-Wächter, M., Chakraborty, T., Lottspeich, F., und Goebel, W. (1990) The gene coding for protein p60 of *Listeria monocytogenes* and its use as a specific probe for *Listeria monocytogenes*. *Infect. Immun.* 58:1943–1950.
- Köhler, S.**, Bubert, A., Vogel, M., und Goebel, W. (1991) Expression of the *iap* gene coding for protein p60 of *Listeria monocytogenes* is controlled on the posttranscriptional level. *J. Bacteriol.* 173:4668–4674.
- Kolb-Mäurer, A.**, Pilgrim, S., Kämpgen, E., McLellan, A. D., Brocker, E. B., Goebel, W., und Gentschev, I. (2001) Antibodies against listerial protein 60 act as an opsonin for phagocytosis of *Listeria monocytogenes* by human dendritic cells. *Infect. Immun.* 69:3100–3109.
- Kovacovics-Bankowski, M.**, und Rock, K. L. (1995) A phagosome-to-cytosol pathway for exogenous antigens presented on MHC class I molecules. *Science* 267:243–246.
- Kreft, J.** (1992) *Listeria monocytogenes* – ein Modell für fakultativ intrazelluläre Bakterien. *BioEng.* 1:65–70.
- Krieg, A. M.**, Yi, A. K., Matson, S., Waldschmidt, T. J., Bishop, G. A., Teasdale, R., Koretzky, G. A., und Klinman, D. M. (1995) CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature* 374:546.
- Kuhn, M.**, Kathariou, S., und Goebel, W. (1988) Hemolysin supports survival but not entry of the intracellular bacterium *Listeria monocytogenes*. *Infect. Immun.* 56:79–82.
- Kuhn, M.**, und Goebel, W. (1989) Identification of an extracellular protein of *Listeria monocytogenes* possibly involved in intracellular uptake by mammalian cells. *Infect. Immun.* 69:3100–3109.

- Kuhn, M.**, Prévost, M.-C., Mounier, J., und Sansonetti, P. J. (1990) A nonvirulent mutant of *Listeria monocytogenes* does not move intracellularly but still induces polymerization of actin. *Infect. Immun.* 58:3477–3486.
- Ladel, C. H.**, Flesch, I.E., Arnoldi, J., und Kaufmann, S.H. (1994) Studies with MHC-deficient knock-out mice reveal impact of both MHC I- and MHC II-dependent T cell responses on *Listeria monocytogenes* infection. *J. Immunol.* 153:3116–3122.
- Laemmli, U. K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680–685.
- Lammerding, A. M.** und Doyle, M. P. (1990) Stability of *Listeria monocytogenes* to non-thermal processing conditions, p. 195–202. In Miller, A. J., Smith, J. L. and Somkuti, G. A. (ed.), Foodborne listeriosis. Elsevier, New York, N. Y.
- Lawyer, F. C.**, Stoffel, S., Saiki, R. K., Myambo, K. B., Drummond, R., und Gelfand, D. H. (1989) Isolation, Characterization, and expression in *E. coli* of the DNA Polymerase gene from the extreme thermophile, *Thermus aquaticus*. *J. Biol. Chem.* 264:6427–6437.
- Lebrun, M.**, Mengaud, J., Ohayon, H., Nato, F., und Cossart P. (1996) Internalin must be on the bacterial surface to mediate entry of *Listeria monocytogenes* into epithelial cells. *Mol. Microbiol.* 21:579–592.
- Lecuit, M.**, Dramsi, S., Gottardi, C., Fedor-Chaiken, M., Gumbiner, B., und Cossart, P. (1999) A single amino acid in E-cadherin responsible for host specificity towards the human pathogen *Listeria monocytogenes*. *EMBO J.* 18:3956–3963.
- Lecuit, M.**, Vandormael-Pourin, S., Lefort, J., Huerre, M., Gounon, P., Dupuy, C., Babinet, C., und Cossart P. (2001) A transgenic model for listeriosis: role of internalin in crossing the intestinal barrier. *Science* 292:1722–1725.
- Leimeister-Wächter, M.**, Domann, E., und Chakraborty, T. (1992) The expression of virulence genes in *Listeria monocytogenes* is thermoregulated. *J. Bacteriol.* 174:947–952.
- Lenz, L. L.**, Dere, B., und Bevan, M. J. (1996) Identification of an H2-M3-restricted *Listeria* epitope: implications for antigen presentation by M3. *Immunity* 5:63–72.
- Lenz, L. L.** und Portnoy, D. A. (2002) Identification of a second *Listeria* secA gene associated with protein secretion and the rough phenotype. *Mol. Microbiol.* 45:1043–1056.
- Listeria monocytogenes* genome sequencing project.** (1998) European Commission contract: BIO4-CT98-0036.
- Lo, R. Y. C.** und Cameron, L. A. (1986). A simple immunological detection method for the direct screening of genes from clone banks. *Biochem. Cell Biol.* 64:73–76.
- Loessner, M. J.**, und Busse, M. (1990) Bacteriophage typing of *Listeria* species. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:1912–1918.
- Loessner, M. J.**, Wendlinger, G., und Scherer, S. (1995). Heterogeneous endolysins in *Listeria monocytogenes* bacteriophages: a new class of enzymes and evidence for conserved holin genes within the siphoviral lysis cassettes. *Mol. Microbiol.* 16:1231–1241.
- Loessner, M. J.**, Kramer, K., Ebel, F., und Scherer, S. (2002) C-terminal domains of *Listeria monocytogenes* bacteriophage murein hydrolases determine specific recognition and high-affinity binding to bacterial cell wall carbohydrates. *Mol. Microbiol.* 44:335–349.
- Lorber, B.** (1997) Listeriosis. *Clin. Infect. Dis.* 24:1–11.
- Lou, Y.**, und Yousef, A. (1997) Adaption to sublethal environmental stresses protects *Listeria monocytogenes* against lethal preservation factors. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:1252–1255.

- Lundberg, K. S.**, Shoemaker, D. D., Adams, M. W., Short, J. M., Sorge, J. A., und Mathur, E. J. (1991) High-fidelity amplification using a thermostable DNA polymerase isolated from *Pyrococcus furiosus*. *Gene* 108:1–6.
- Macatonia, S. E.**, Knight, S. C., Edwards, A. J., Griffiths, S., und Fryer, P. (1987) Localization of antigen on lymph node dendritic cells after exposure to the contact sensitizer fluorescein isothiocyanate. *J Exp Med* 166:1654–1667.
- MacDonald, T. T.**, und Carter, P. B. (1980) Cell-mediated immunity to intestinal infection. *Infect. Immun.* 28:516–523.
- Mackanness, G. B.** (1962) Cellular resistance to infection. *J. Exp. Med.* 116:381–406.
- Marco, A. J.**, Prats, N., Ramos, J. A., Briones, V., Blanco, M., Dominguez, L., und Domingo, M. (1992) A microbiological, histopathological and immunohistological study of the intragastric inoculation of *Listeria monocytogenes* in mice. *J. Comp. Pathol.* 107:1–9.
- Marco, A. J.**, Altamira, J., Prats, N., Lopez, S., Dominguez, L., Domingo, M., und Briones, V. (1997) Penetration of *Listeria monocytogenes* in mice infected by the oral route. *Microb. Pathog.* 23:255–263.
- Margolin, W.** (2000) Themes and variations in prokaryotic cell division. *FEMS Microbiol. reviews* 24:531–548.
- Marquis, H.**, Doshi, V., und Portnoy, D. A. (1995) The broad-range phospholipase C and a metalloprotease mediate listeriolysin O-independent escape of *Listeria monocytogenes* from a primary vacuole in human epithelial cells. *Infect. Immun.* 63:4531–4534.
- Marquis, H.**, Goldfine, H., und Portnoy, D. A. (1997) Proteolytic pathways of activation and degradation of a bacterial phospholipase C during intracellular infection by *Listeria monocytogenes*. *J. Cell Biol.* 137:1381–1392.
- Marquis, H.**, und Hager, E. J. (2000) pH-regulated activation and release of a bacteria-associated phospholipase C during intracellular infection by *Listeria monocytogenes*. *Mol. Microbiol.* 35:289–298.
- Marzo, A. L.**, Vezys, V., Williams, K., Tough, D. F., und Lefrancois, L. (2002) Tissue-Level Regulation of Th1 and Th2 Primary and Memory CD4 T Cells in Response to *Listeria* Infection. *J. Immunol.* 168:4504–4510.
- McLaughlan, A. M.** und Foster, S. J. (1997) Characterization of the peptidoglycan hydrolases of *Listeria monocytogenes* EGD. *FEMS Microbiol. Letters* 152:149–154.
- Mengaud, J.**, Dramsi, S., Gouin, E., Vazquez-Boland, J. A., Milon, G. und Cossart, P. (1991) Pleiotropic control of *Listeria monocytogenes* virulence factors by a gene which is autoregulated. *Mol. Microbiol.* 5:2273–2283.
- Mengaud, J.**, Ohayon, H., Gounon, P., Mège, R. M. und Cossart, P. (1996) E-cadherin is the receptor for internalin, a surface protein required for entry of *Listeria monocytogenes* into epithelial cells. *Cell* 84:923–932.
- Milohanic, E.**, Pron, B., Berche, P., und Gaillard, J. L. (2000) Identification of new loci involved in adhesion of *Listeria monocytogenes* to eukaryotic cells. European *Listeria* Genome Consortium. *Microbiology* 146:731–739.
- Moll, H.**, und Berberich, C. (2001) Dendritic cell-based vaccination strategies: induction of protective immunity against leishmaniasis. *Immunobiology* 204:659–666.
- Mounier, J.**, Ryter, A., Coquis-Rondon, M., und Sansonetti, P. J. (1990) Intracellular and cell-to-cell spread of *Listeria monocytogenes* involves interaction with F-actin in the enterocytelike cell line Caco-2. *Infect. Immun.* 58:1048–1058.

- Murray, E. G. D.**, Webb, R. A. und Swann, M. B. R. (1926) A disease of rabbits characterized by a large mononuclear leukocytosis, caused by a hitherto undescribed bacillus *Bacterium monocytogenes* (n. sp.). *J. Pathol. Bacteriol.* 29:407–439.
- Niebuhr, K.**, Chakraborty, T., Rohde, M., Gazlig, T., Jansen, B., Kollner, P. und Wehland, J. (1993) Localization of the ActA polypeptide of *Listeria monocytogenes* in infected tissue culture cell lines: ActA is not associated with actin comets. *Infect. Immun.* 61:2793–2802.
- Nieman, R. E.**, und Lorber, B. (1980) Listeriosis in adults: a changing pattern. Report of eight cases and review of the literature, 1968-1978. *Rev. Infect. Dis.* 2:207–227.
- Niwa, H.**, Yamamura, K., Miyazaki, J. (1991) Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector. *Gene* 108:193–199.
- Nyfelt, A.** (1929) Etiologie de la mononucléose infectieuse. *C. R. Soc. Biol.* 101:590–591.
- Ochsenbein, A. F.**, Fehr, T., Lutz, C., Suter, M., Brombacher, F., Hengartner, H., und Zinkernagel, R.M. (1999) Control of early viral and bacterial distribution and disease by natural antibodies. *Science* 286:2156–2159.
- Ohteki, T.**, Fukao, T., Suzue, K., Maki, C., Ito, M., Nakamura, M., und Koyasu, S. (1999) Interleukin 12-dependent interferon gamma production by CD8alpha+ lymphoid dendritic cells. *J. Exp. Med.* 189:1981–1986.
- Ohnishi, R.**, Ishikawa, S., Sekiguchi, J. (1999) Peptidoglycan hydrolase LytF plays a role in cell separation with CwIF during vegetative growth of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 181:3178–3184.
- Pamer, E. G.**, Harty, J.T., und Bevan, M.J. (1991) Precise prediction of a dominant class I MHC-restricted epitope of *Listeria monocytogenes*. *Nature* 353:852–855.
- Pamer, E. G.** (1994) Direct sequence identification and kinetic analysis of an MHC class I-restricted *Listeria monocytogenes* epitope. *J. Immunol.* 152:686–694.
- Park, J. H.**, Lee, Y. S., Lim, Y. K., Kwon, S. H., Lee, C. U., und Yoon, B. S. (2000) Specific binding of recombinant *Listeria monocytogenes* p60 protein to Caco-2 cells. *FEMS Microbiol. Lett.* 186:35–40.
- Park, S. F.**, und Kroll, R. G. (1993). Expression of listeriolysin and phosphatidylinositol-specific phospholipase C is repressed by the plant-derived molecule cellobiose in *Listeria monocytogenes*. *Mol. Microbiol.* 8:653–861.
- Parks, D. R.**, Herzenberg, L. A., und Herzenberg, L. A (1989) Flow cytometry and fluorescence-activated cell sorting. *Fundamental Immunology, 2nd Edition*, Raven Press Ltd., New York.
- Perez-Diaz, J. C.**, Vicente, M. F., und Baquero, F. (1984) Plasmids in *Listeria*. *Plasmid* 8 :112–118.
- Pertmer, T. M.**, Roberts, T. R., Haynes, J. R. (1996) Influenza virus nucleoprotein-specific immunoglobulin G subclass and cytokine responses elicited by DNA vaccination are dependent on the route of vector DNA delivery. *J. Virol.* 70:6119–6125.
- Pfeuffer, T.**, Goebel, W., Laubinger, J., Bachmann, M., und Kuhn, M. (2000). LaXp180, a mammalian ActA-binding protein, identified with the yeast two-hybrid system, co-localizes with intracellular *Listeria monocytogenes*. *Cell. Microbiol.* 2:101–114.
- Pilgrim, S.**, Kolb-Mäurer, A., Kuhn, M., Gentschev, I., und Goebel, W. (2002) Deletion of the *iap* gene in *Listeria monocytogenes* leads to abnormal cell division and to loss of actin-based motility. submitted.
- Planelles, L.**, Thomas, M. C., Alonso, C., und Lopez, M. C. (2001) DNA Immunization with *Trypanosoma cruzi* HSP70 fused to the KMP11 Protein elicits a cytotoxic and humoral immune response against the antigen and leads to protection. *Infect. Immun.* 69:6558–6563.
- Portnoy, D.**, Jacks, P.S. und Hinrichs, D. (1988) Role of hemolysin for the intracellular growth of *Listeria monocytogenes*. *J. Exp. Med.* 167:1459–1471.

- Portnoy, D. A.,** Chakraborty, T., Goebel, W., and Cossart, P. (1995). Molecular determinants of *Listeria monocytogenes* pathogenesis. *Infect. Immun.* 60:1263–1267.
- Powell, R. J.,** Lewis, G. K., and Hone, D. M. (1999) Method for introducing and expressing genes in animal cells and live invasive bacterial vectors for use in the same. US Patent No. 5877159.
- Premaratne, R. J.,** Lin, W.J., and Johnson, E. A. (1991) Development of an improved chemically defined minimal medium for *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:3046–3048.
- Pron, B.,** Boumaila, C., Jaubert, F., Sarnacki, S., Monnet, J. P., Berche, P., and Gaillard, J.L. (1998) Comprehensive study of the intestinal stage of listeriosis in a rat ligated ileal loop system. *Infect. Immun.* 66:747–755.
- Pron, B.,** Boumaila, C., Jaubert, F., Berche, P., Milon, G., Geissmann, F., and Gaillard, J.L. (2001) Dendritic cells are early cellular targets of *Listeria monocytogenes* after intestinal delivery and are involved in bacterial spread in the host. *Cell. Microbiol.* 3:331–340.
- Rakhmilevich, A.L.** (1994) Evidence for a significant role of CD4+ T cells in adoptive immunity to *Listeria monocytogenes* in the liver. *Immunology* 82:249–254.
- Rácz, P.,** Tenner, K., and Mérő, E. (1972) Experimental *Listeria* enteritis. I. An electron microscopic study of the epithelial phase in experimental *Listeria* infection. *Lab. Investig.* 26:694–700.
- Ramirez, J. R.,** Gilchrist, K., Robledo, S., Sepulveda, J. C., Moll, H., Soldati, D., and Berberich, C. (2001) Attenuated *Toxoplasma gondii* ts-4 mutants engineered to express the *Leishmania* antigen KMP-11 elicit a specific immune response in BALB/c mice. *Vaccine.* 20:455–461.
- Raveneau, J.,** Geoffroy, C., Beretti, J.-L., Gaillard, J.-L., Alouf, J. E., and Berche P. (1992) Reduced virulence of a *Listeria monocytogenes* phospholipase-deficient mutant obtained by transposon insertion into the zinc metalloprotease gene. *Infect. Immun.* 60:916–921.
- Raz, E.,** Carson, D. A., Parker, S. E., Parr, T. B., Abai, A. M., Aichinger, G., Gromkowski, S. H., Singh, M., Lew, D., Yankauckas, M. A., Baird, S. M., and Rhodes, G. H. (1994) Intradermal gene immunization: the possible role of DNA uptake in the induction of cellular immunity to viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 91:9519–9523.
- Reinscheid, D. J.,** Gottschalk, B., Schubert, A., Eikmanns, B. J., and Chhatwal, G. S. (2001) Identification and molecular analysis of PcsB, a protein required for cell wall separation of group B streptococcus. *J. Bacteriol.* 183:1175–1183.
- Reis e Sousa, C.,** and Germain, R. N. (1995) Major histocompatibility complex class I presentation of peptides derived from soluble exogenous antigen by a subset of cells engaged in phagocytosis. *J. Exp. Med.* 182:841–851.
- Renzoni, A.,** Klarsfeld, A., Dramsi, S., and Cossart, P. (1997). Evidence that PrfA, the pleiotropic activator of virulence genes in *Listeria monocytogenes*, can be present but inactive. *Infect Immun* 65:1515–1518.
- Rescigno, M.,** Urbano, M., Valzasina, B., Francolini, M., Rotta, G., Bonasio, R., Granucci, F., Kraehenbuhl, J. P., and Ricciardi-Castagnoli, P. (2001) Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nat. Immunol.* 2:361–367.
- Restifo, N. P.,** Bacik, I., Irvine, K. R., Yewdell, J. W., McCabe, B. J., Anderson, R. W., Eisenlohr, L. C., Rosenberg, S. A., and Bennink, J. R. Antigen processing in vivo and the elicitation of primary CTL responses. *J. Immunol.* 154:4414–4422.
- Robbins, J. R.,** Barth, A. I., Marquis, H., de Hostos, E. L., Nelson, W. J., and Theriot, J. A. (1999) *Listeria monocytogenes* exploits normal host cell processes to spread from cell to cell. *J. Cell. Biol.* 146:1333–1350.
- Robinson, H. L.,** Hunt, L. A., and Webster, R. G. (1993) Protection against a lethal influenza virus challenge by immunization with a haemagglutinin-expressing plasmid DNA. *Vaccine* 11:957–960.

- Rocourt, J.** (1999) The genus *Listeria* and *Listeria monocytogenes*: phylogenetic position, taxonomy and identification, p.1–20. In E.T. Ryser and E.H. Marth (ed.), *Listeria, listeriosis and food safety*, 2nd ed. Marcel Dekker Inc., New York, N.Y.
- Rogers, H. W.**, and Unanue, E. R. (1993) Neutrophils are involved in acute, nonspecific resistance to *Listeria monocytogenes* in mice. *Infect. Immun.* 61:5090–5096.
- Rogers, H. W.**, Callery, M. P., Deck, B., and Unanue, E. R. (1996) *Listeria monocytogenes* induces apoptosis of infected hepatocytes. *J. Immunol.* 156:679–684.
- Rowan, N. J.**, Candlish, A. A., Bubert, A., Anderson, J. G., Kramer, K., and McLauchlin, J. (2000) Virulent rough filaments of *Listeria monocytogenes* from clinical and food samples secreting wild-type levels of cell-free p60 protein. *J. Clin. Microbiol.* 38:2643–2648.
- Ryan, E. T.**, Crean, T. I., Kochi, S. K., John, M., Luciano, A. A., Killeen, K. P., Klose, K. E., and Calderwood, S. B. (2000) Development of a DeltaglnA balanced lethal plasmid system for expression of heterologous antigens by attenuated vaccine vector strains of *Vibrio cholerae*. *Infect. Immun.* 68:221–226.
- Safley, S. A.**, Cluff, C. W., Marshall, N. E., and Ziegler, H. K. (1991). Role of listeriolysin-O (LLO) in the T lymphocyte response to infection with *Listeria monocytogenes*. Identification of T cell epitopes of LLO. *J. Immunol.* 146:3604–3616.
- Saiki, R. K.**, Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A., and Arnheim, N. (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science.* 230:1350–1354.
- Sanderson, S.**, Campbell, D. J., and Shastri, N. (1995) Identification of a CD4+ T cell-stimulating antigen of pathogenic bacteria by expression cloning. *J. Exp. Med.* 182:1751–1757.
- Sato, Y.**, Roman, M., Tighe, H., Lee, D., Corr, M., Nguyen, M. D., Silverman, G. J., Lotz, M., Carson, D. A., and Raz, E. (1996) Immunostimulatory DNA sequences necessary for effective intradermal gene immunization. *Science* 273:352–354.
- Scharton-Kersten, T.**, Afonso, L. C., Wysocka, M., Trinchieri, G., and Scott, P. (1995) IL-12 is required for natural killer cell activation and subsequent T helper 1 cell development in experimental leishmaniasis. *J. Immunol.* 154:5320–5330.
- Schubert, K.**, Bichlmaier, A. M., Mager, E., Wolff, K., Ruhland, G., and Fiedler, F. (2000) P45, an extracellular 45 kDa protein of *Listeria monocytogenes* with similarity to protein p60 and exhibiting peptidoglycan lytic activity. *Arch. Microbiol.* 173:21–28.
- Schuchat, A.**, Swaminathan, B., and Broome, C. V. (1991) Epidemiology of human listeriosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 4:169–183.
- Schumann, W.** (1990). Biologie Bakterieller Plasmide. Friedr. Vieweg & Sohn Verlagsgesellschaft mbH, Braunschweig.
- Seeliger, H. P. R.** (1961) Listeriosis. Hafner Press, New York.
- Sheehan, B.**, Klarsfeld, A., Ebright, R. und Cossart, P. (1996) A single substitution in the putative helix-turn-helix motif of the pleiotropic activator PrfA attenuates *Listeria monocytogenes* virulence. *Mol. Microbiol.* 20:785–797.
- Shiver, J. W.**, Davies, M. E., Perry, H. C., Freed, D. C., and Liu, M. A. (1996) Humoral and cellular immunities elicited by HIV-1 DNA vaccination. *J. Pharm. Sci.* 85:1317–1324.
- Sibeliuss, U.**, Schulz, E. C., Rose, F., Hattar, K., Jacobs, T., Weiss, S., Chakraborty, T., Seeger, W., and Grimminger, F. (1999) Role of *Listeria monocytogenes* exotoxins listeriolysin and phosphatidylinositol-specific phospholipase C in activation of human neutrophils. *Infect. Immun.* 67:1125–1130.

- Sijts, A. J.**, Neisig, A., Neeffes, J., und Pamer, E. G. (1996) Two *Listeria monocytogenes* CTL epitopes are processed from the same antigen with different efficiencies. *J. Immunol.* 156:683–692.
- Sizemore, D. R.**, Branstrom, A. A., und Sadoff, J. C. (1995) Attenuated *Shigella* as a DNA delivery vehicle for DNA-mediated immunization. *Science* 270:299–302.
- Sizemore, D. R.**, Branstrom, A. A., und Sadoff, J. C. (1997) Attenuated bacteria as a DNA delivery vehicle for DNA-mediated immunization. *Vaccine* 15:804–807.
- Simon, D.**, und Chopin, A. (1988). Construction of a vector plasmid family and its use for molecular cloning in *Streptococcus lactis*. *Biochimie* 70:559–566.
- Spreng, S.**, Dietrich, G., Niewiesk, S., ter Meulen, V., Gentschev, I., und Goebel, W. (2000) Novel bacterial systems for the delivery of recombinant protein or DNA. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 27:299–304.
- Southern, E. M.** (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98:503–517.
- Stacey, K.J.**, Sweet, M. J., und Hume, D. A. (1996) Macrophages ingest and are activated by bacterial DNA. *J. Immunol.* 157:2116–2122.
- Steigerwald, M.** (1998) Diplomarbeit.
- Stritzker, J.** (2001) Diplomarbeit.
- Sullivan, M. A.**, Yasbin, R. E., und Young, F. E. (1984) New shuttle vectors for *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* which allow rapid detection of inserted fragments. *Gene* 29:21–26.
- Sypek, J.P.**, Chung, C. L., Mayor, S. E., Subramanyam, J. M., Goldman, S. J., Sieburth, D. S., Wolf, S. F. und Schaub, R. G. (1993) Resolution of cutaneous leishmaniasis: interleukin 12 initiates a protective T helper type 1 immune response. *J. Exp. Med.* 177:1797–1802.
- Tang, D. C.**, DeVit, M., und Johnston, S. A. (1992) Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response. *Nature* 356:152–154.
- Theriot, J. A.**, Mitchison, T. J., Tilney, L. G. und Portnoy, D. A. (1992) The rate of actin-based motility of intracellular *Listeria monocytogenes* equals the rate of actin polymerization. *Nature* 357:257–260.
- Tilney, L. G.** und Portnoy, D. A. (1989) Actin filaments and the growth, movement, and spread of the intracellular bacterial parasite *Listeria monocytogenes*. *J. Cell Biol.* 109:1597–1608.
- Tolson, D. L.**, Schnur, L. F., Jardim, A., und Pearson, T. W. (1994) Distribution of lipophosphoglycan-associated epitopes in different *Leishmania* species and in African trypanosomes. *Parasitol. Res.* 80:537–542.
- Towbin, H.**, Staehelin, T., Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 76:4350–4354.
- Ulmer, J. B.**, Donnelly, J. J., Parker, S. E., Rhodes, G. H., Felgner, P. L., Dwarki, V. J., Gromkowski, S. H., Deck, R. R., DeWitt, C. M., Friedman, A., Hawe, L. A., Leander, K. R., Martinez, D., Perry, H. C., Shiver, J. W., Montgomery, D. C., und Liu, M. A. (1993) Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. *Science* 259:1745–1749.
- Ulmer, J. B.**, Deck, R. R., Dewitt, C. M., Donnhly, J. I., und Liu, M. A. (1996) Generation of MHC class I-restricted cytotoxic T lymphocytes by expression of a viral protein in muscle cells: antigen presentation by non-muscle cells. *Immunology* 89:59–67.
- Unanue, E. R.** (1997) Inter-relationship among macrophages, natural killer cells and neutrophils in early stages of *Listeria* resistance. *Curr. Opin. Immunol.* 9:35–43.

- Vazquez-Boland, J. A.**, Kocks, C., Dramsi, S., Ohayon, H., Geoffroy, C., Mengaud, J., und Cossart P. (1992) Nucleotide sequence of the lecithinase operon of *Listeria monocytogenes* and possible role of lecithinase in cell-to-cell spread. *Infect. Immun.* 60:219–230.
- Vazquez-Boland, J. A.**, Kuhn, M., Berche, P., Chakraborty, T. Dominguez-Bernal, G., Goebel, W., Gonzalez-Zorn, B., Wehland, J., und Kreft, J. (2001) *Listeria* Pathogenesis and Molecular Virulence Determinants. *Clin. Microbiol. Reviews* 14:584–640.
- Vaudaux, P.**, und Waldvogel, F. A. (1979). Gentamicin antibacterial activity in the presence of human polymorphonuclear leukocytes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 16:743–749.
- Vogelstein, B.**, und Gillespie, D. (1979). Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 76:615–619.
- Walker, S. J.**, und Stringer, M. F. (1987) Growth of *Listeria monocytogenes* and *Aeromonas hydrophila* at chill temperatures. *J. Appl. Bacteriol.* 63:R20.
- Weiss, R.**, Dürnberger, J., Mostbröck, S., Scheibelhofer, S., Hartl, A., Breitenbach, M., Strasser, P., Dorner, F., Livey, I., Crowe, B., und Thalhammer, J. (2000) Improvement of the immune response against plasmid DNA encoding OspC of *Borrelia* by an ER-targeting leader sequence. *Vaccine* 18:815–824.
- Wendlinger, G.**, Loessner, M. J., und Scherer, S. (1996) Bacteriophage receptors on *Listeria monocytogenes* cells are the N-acetylglucosamine and rhamnose substituents of teichoic acids or the peptidoglycan itself. *Microbiology* 142:985–992.
- White, D.W.**, und Harty, J.T. (1998) Perforin-deficient CD8+ T cells provide immunity to *Listeria monocytogenes* by a mechanism that is independent of CD95 and IFN-gamma but requires TNF-alpha. *J. Immunol.* 160:898–905.
- Wolff, J. A.**, Malone, R. W., Williams, P., Chong, W., Acsadi, G., Jani, A., und Felgner, P. L. (1990) Direct gene transfer into mouse muscle *in vivo*. *Science* 247:1465–1468.
- Wood, S.**, Maroushek, N., und Czuprynski, C. J. (1993) Multiplication of *Listeria monocytogenes* in a murine hepatocyte cell line. *Infect. Immun.* 61:3068–3072.
- Wuenschel, M. D.**, Köhler, S., Goebel, W., und Chakraborty, T. (1991). Gene disruption by plasmid integration in *L.monocytogenes*: insertional inactivation of the listeriolysin determinant *lisA*. *Mol. Gen. Genet.* 228:177–182.
- Wuenschel, M. D.**, Köhler, S., Bubert, A., Gerike, U., und Goebel, W. (1993) The *iap* Gene of *Listeria monocytogenes* is essential for cell viability, and its gene product, p60, has bacteriolytic activity. *J. Bacteriol.* 175:3491–3501.
- Yamamoto, S.**, Yamamoto, T., Kataoka, T., Kuramoto, E., Yano, O., und Tokunaga, T. Unique palindromic sequences in synthetic oligonucleotides are required to induce IFN [correction of INF] and augment IFN-mediated [correction of INF] natural killer activity. *J. Immunol.* 148:4072–4076.
- Young, R.** (1992) Bacteriophage lysis: mechanism and regulation. *Microbiol. Rev.* 56:430–481.
- Zentrale Kommission für biologische Sicherheit.** (1999) Robert-Koch-Institut, Berlin. (<http://www.rki.de/GENTEC/ZKBS/ZKBS.HTM?ALLGSTELL/99/LISTERIA.HTM&1>).

8. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

aa	Aminosäuren
Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
BHI	„Brain heart infusion“ (Hirn-Herz-Glukose)
<i>bla</i>	Gen für β -Lactamase
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
<i>cat</i>	Gen für Chloramphenicol-Acetyltransferase
CDS	kodierende Sequenz
CFU	„colony forming units“, Kolonie-bildende Einheiten
CHAPS	3-[(3Cholamidopropyl)-dimethyl-amino]-Propansulfat
Cm	Chloramphenicol
CMV	Zytomegalievirus
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindol
dATP	2'-Desoxyadenosin-5'-Triphosphat
dCTP	2'-Desoxycytosin-5'-triphosphat
dGTP	2'-Desoxyguanosin-5'-triphosphat
dTTP	2'-Desoxythymidin-5'-triphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	1,4-Dithiothreitol
DZ	Durchflusszytometrie
EDTA	Ethylen-Diamin-tetra-Essigsäure
EGTA	[Ethylenglycol-bis(β -amoniethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure]
EGFP	„enhanced green fluorescent protein“
<i>egfp</i>	Gen für das „enhanced green fluorescent protein“
Em	Erythromycin
<i>ermAM</i>	Gen für Erythromycin-Adeninmethylase
FITC	Fluorescein-isothiocyanat
H ₂ O _{deion.}	deionisiertes (entsalztes) Wasser
HEPES	N-2-Hydroxyethyl-piperazin-N'-2-ethansulfonsäure
<i>iap</i>	Gen für das „invasion associated protein“ p60
IL	Interleukin
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactosid
Kan.	Kaninchen
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
KE	Kletteinheiten
<i>lacZ</i>	Gen für β -Galaktosidase
MAK	monoklonaler Antikörper
MOI	„multiplicity of infection“
MQ-H ₂ O	Millipore-Wasser
MWB	„modified Welshimer's broth“
OD _x	optische Dichte bei x nm
<i>ori</i>	Replikationsursprung
P	Promotor
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAK	polyklonaler Antikörper
<i>p.i.</i>	„post infection“, nach Infektion
PCR	„Polymerase chain reaction“ Polymerase-Kettenreaktion
PIPES	Piperazin-1,4-bis-(2-ethansulfon-säure)
<i>Pfu</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>

poly A	Polyadenylierungssignal
<i>rep</i>	Replikationsprotein
rpm	„rounds per minute“, Umdrehungen pro Minute
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SD/SA	“Splice donor/ splice acceptor”
SDS	Natrium-dodecylsulfat
ssDNA	einzelsträngige DNA
Sv	Serovar
SV40	Simian Virus 40
Tab.	Tabelle
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
Tc	Tetracyclin
tet	Tetracyclin-Resistenz-Gen
Tris	Tris-(hydroxy- ethyl)-aminomethan
TRITC	Tetramethylrhodamin- isothiocyanat
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure
TrpRS	Tryptophanyl-tRNA-Synthetase
<i>trpS</i>	Gen für Tryptophanyl-tRNA-Synthetase
VT	Volumenteil
Wt	Wildtyp
x^R	Resistenz gegen x
MWB	„modified Welshimer’s broth“
TEM	Transmissions-Elektronenmikroskopie
REM	Raster-Elektronenmikroskopie
ECL	„enhanced chemiluminescence“, verstärkte Chemoluminiszenz
SDS	Natriumdodecylsulfat
FKS	Fötale Kälberserum
RPMI	„Rosewell Park Memorial Institute“
MAK	monoklonaler Antikörper
U	„units“, Einheiten

9. ANHANG

Umrechnungen für Proteine: 1000 bp = 37 kDa

Berechnung der Proteinkonzentration c: $c \text{ (mg / ml)} = \frac{\text{Molekulargewicht} \times E_{280}}{\text{Extinktionskoeffizient}}$

Umrechnung von Oligonukleotiden: $\frac{\mu\text{g} / \text{ml} \times 1000}{309 \times \text{Oligolänge}} = \text{pmol} / \mu\text{l}$

Konzentrationsbestimmung für RNA: 1 OD₂₆₀ = 40 μl / ml RNA

Konzentrationsbestimmung für DNA: 1 OD₂₆₀ = 50 μl / ml RNA

-6 Verdünnung bedeutet: Verdünnungsfaktor 10⁻⁶

Bestimmung der Bakteriengeneration: $N_t = N_0 2^n$,

N_t = Anzahl der Bakterien zu einem best.
Zeitpunkt

N_0 = Anzahl der Bakterien zu Versuchsbeginn

n = Zahl der Generationen

$$n = \frac{\log N_t - \log N_0}{\log 2}$$

Variationskoeffizient (VK)

VK = Standardabweichung (Stichprobe) /
arithmetisches Mittel

10. CURRICULUM VITAE

PERSÖNLICHE DATEN

Geburtsdatum: 13. September 1967
 Geburtsort: Marburg jetzt Wehrda
 Familienstand: ledig
 Staatsangehörigkeit: deutsch

SCHULBILDUNG

1974-1978 Grundschule in Rauschenberg
 1978-1987 Stiftsschule St. Johann in Amöneburg: Erwerb der allgemeinen Hochschulreife mit Abschlußnote 2,3

BERUFSAUSBILDUNG

1987-1990 Fa. Behringwerke AG in 3550 Marburg: Ausbildung zur Biologielaborantin mit den Abschlußnoten gut (Fertigungsprüfung) und sehr gut (Kenntnisprüfung)

BERUFSPRAXIS

1990-1993 Anstellung als Biologielaborantin bei der Fa. Behringwerke AG, 3550 Marburg in den Abteilungen Produktion Vakzine und Plasmaprotein-Diagnostica
 1993-1997 Beschäftigung als Werksstudentin für jeweils 2 Monate im Jahr bei der Fa. Behringwerke AG

HOCHSCHULBILDUNG

1993-1998 Studium der Humanbiologie an der Universität Marburg, Wahl des Hauptfaches Immunologie und der Nebenfächer Zellbiologie und Virologie
 12. Januar 1997 Diplom-Vorprüfung (Gesamtnote: gut)
 07. Oktober 1997 mündliche Diplomprüfung (Gesamtnote: sehr gut)
 16. Oktober 1997 –
 15. Oktober 1998 Diplomarbeit bei der Fa. Chiron-Behring GmbH & Co, Abt. Präklinische Forschung Vakzine bei Herrn Dr. B. Knapp, Thema: Immunologische Charakterisierung eines äußeren Membranproteins von *Helicobacter pylori*

PROMOTIONSSTUDIUM

1998-2002 Promotionsstudium am Lehrstuhl für Mikrobiologie, Universität Würzburg, „Entwicklung eines „DNA Delivery“ Systems auf der Basis von Virulenz-attenuierten Listerien“
 2000-2002 Teilnahme am Graduiertenkolleg GK 520 "Immunomodulation"

11. PUBLIKATIONEN

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

*Beide Autoren sind gleichermaßen an der Arbeit beteiligt.

Gentschev, I., Dietrich, G., Spreng, S., Pilgrim, S., Stritzker, J., Kolb-Mäurer, A, und Goebel, W. (2002) Delivery of protein antigens and DNA by attenuated intracellular bacteria. *Int J Med Microbiol* **291**:577-582.

Pilgrim, S., Kolb-Mäurer, A, Kuhn, M., Gentschev, I., und Goebel, W. (2002) Deletion of the *iap* gene in *Listeria monocytogenes* leads to abnormal cell division and to loss of actin-based motility. *In submission*.

Poster:

Pilgrim, S., Kolb-Mäurer, A., Geginat, G., Gentschev, I. und Goebel, W. Is p60 really an essential housekeeping protein of *L. monocytogenes*. ISOPOL. Mannheim, May13-16, 2001.

Pilgrim, S., Stritzker, J., Schoen, C., Kolb-Mäurer, A., Gentschev, I., und Goebel, W. Development of an improved DNA-delivery system using *Listeria monocytogenes* as carrier. Strategies for Immune Therapy. Wuerzburg, January 16-18, 2002.