
**Molekularbiologischer Nachweis und Immunologie des
P60-Proteins, sowie *in vitro*-Transkription PrfA-abhängiger
bzw. –unabhängiger Gene von *Listeria monocytogenes***

DISSERTATION

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

vorgelegt von

Mio Lalic-Mülthaler

aus

Rosenheim

München, 25.11.2003

Eingereicht am:

07. Januar 2004

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. Ulrich Scheer

Gutachter: Prof. Dr. W. Goebel

Gutachter: Prof: Dr. D. Palm

Tag des Promotionskolloquiums:

22. Mai 2004

Doktorurkunde ausgehändigt am:

.....

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass die vorgestellte Arbeit von mir selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt wurde.

Ich erkläre außerdem, dass die vorliegende Dissertation weder in gleicher, noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

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

München, 25. November 2003

Mio Lalic-Mülthaler

*“Die Wissenschaft richtig verstanden, heilt
den Menschen von seinem Stolz, denn sie zeigt
ihm seine Grenzen.“*

Albert Schweizer 1875-1965

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	1
1.1. Summary (in English).....	2
2. Einleitung	3
2.1. Taxonomie der Listerien	3
2.2. Mikrobiologie der Listerien	3
2.3. Pathogenese, Therapie und Epidemiologie	4
2.4. <i>L. monocytogenes</i> - ein fakultativ intrazelluläres Bakterium	7
2.5. Beteiligte Virulenzfaktoren	9
2.5.1. innerhalb des Virulenzgenclusters	9
2.5.1.1. Listeriolysin O (LLO).....	9
2.5.1.2. Phosphatidylinositol-spezifische Phospholipase C (PI-PLC)	10
2.5.1.3. ActA.....	10
2.5.1.4. Phosphatidylcholin-spezifische Phospholipase C (PC-PLC)	11
2.5.1.5. Metalloprotease.....	12
2.5.1.6. Das PrfA-Regulatorprotein	12
2.5.2. außerhalb des Virulenzgenclusters.....	14
2.5.2.1. kleine sekretierte Internaline	14
2.5.2.2. die großen Internaline.....	14
2.5.2.3. <i>fbp</i>	15
2.5.2.4. das vom <i>iap</i> -Gen kodierte P60.....	15
2.5.2.5. <i>spl/p45</i>	18
2.5.2.6. <i>lap/p104</i>	18
2.5.2.7. Superoxiddismutase, Katalase und LmaA.....	18
2.5.2.8. ClpP	19
2.5.2.9. GAD	19
2.6. Immunologie.....	20
2.7. Detektion	24
2.8. Zielsetzung dieser Arbeit	26
3. Material.....	27
3.1. Bakterienstämme	27
3.2. Versuchstiere	27
3.2.1. Legehühner.....	27
3.2.2. Mäuse	27
3.3. Peptide für die Immunisierung.....	28
3.4. Oligonukleotide	28
3.4.1. Oligonukleotide zu Reverse Dot-Blot und PCR-Primer	28
3.4.2. Oligonukleotide zur Herstellung von DNA-Sonden für Footprint	29
3.4.3. Oligonukleotide zur Herstellung der Plasmide für <i>in vitro</i> -Transkriptionsassays	29
3.4.4. Radioaktive Markierung der DNA-Sonden	29
3.4.5. Radionukleotide	29
3.5. verwendete Kits	29
3.6. Puffer und Lösungen:.....	30

3.6.1. Standardpuffer	30
3.6.2. Puffer für die Gewinnung der Proteinextrakte (RNA-Pol)	32
3.6.3. Blockpuffer	32
3.6.4. Lösungen	33
3.6.4.1. Lösungen für das EPITOP-mapping	33
3.6.4.2. Standardlösungen.....	33
3.7. Chemikalien und Enzyme.....	35
3.7.1. Chemikalien für immunologische Analysen: Filter-Synthese und Antikörper-Assay.....	35
3.7.2. Aminosäuren:.....	36
3.7.3. Antikörper	36
3.7.4. Enzyme und Seren	37
3.7.4.1. für den Aufschluss.....	37
3.7.4.2. für immunologische Analysen: Filter-Synthese und Antikörper-Assay.....	37
3.7.4.3. für molekulargenetische Versuche.....	37
3.8. Medien, Agarplatten und Antibiotika	38
3.8.1. Medien	38
3.8.2. Agarplatten.....	38
3.8.3. Antibiotika	38
3.9. EDV-elektronische Datenverarbeitung	38
3.10. Molekulargewichtsstandards	39
3.11. Verbrauchsmaterial	39
3.12. Geräte.....	40
4. Methoden.....	41
4.1. Diagnostik.....	41
4.1.1. Multiplex-PCR (P olymerase C hain R eaction).....	41
4.1.2. Reverse-Dot-Blot zur Post-PCR-Detektion von Listerien	42
4.1.2.1. Kolonieblothybridisierung auf Membranen	42
4.1.2.2. Immobilisierung im Mikrotiterplattenformat	44
4.1.2.3 DNA-Hybridisierung.....	45
4.1.2.4. Alkaline Phosphatase vermittelte Detektion im Mikrotiterplattenformat.....	45
4.2. Immunologie.....	46
4.2.1. Gewinnung von P60 Überstandsprotein aus <i>L. monocytogenes</i> EGD	46
4.2.1.1. Anzucht	46
4.2.1.2. Isolierung des P60	46
4.2.1.3. Geleluatation	47
4.2.2. α -P60 Antikörper aus Hühnereiern	47
4.2.2.1. Immunisierung von Hühnern	47
4.2.2.2. Extraktion und Reinigung der IgY	48
4.2.3. Peptid-Spot-Synthese	48
4.2.3.1. Synthese des Spacers	49
4.2.3.2. Programmierung des Pipetierroboters.....	49
4.2.3.3. Der Syntheszyklus.....	50
4.2.3.4. finale Acetylierung und Abspaltung	52
4.2.4. Antikörper-Assay:	53
4.2.5. Strippen der Filter	53
4.2.6. Untersuchungen zu den T-Zell-Klonen	53

4.3. PrfA	54
4.3.1. Gewinnung von Proteinextrakten.....	54
4.3.1.1. Gewinnung der Proteinextrakte im großen Maßstab	54
4.3.1.2. Gewinnung der Proteinextrakte im kleinen Maßstab	55
4.3.2. Aufreinigung von PrfA	55
4.3.3. Konstruktion der Template-Plasmide	57
4.3.4. <i>In vitro</i> -Transkriptionsassay	57
4.3.5. Gelretardationsexperimente (Bandshift).....	58
4.3.5.1. Gießen der Gele.....	58
4.3.5.2. Herstellung der P _{hly} ⁻ (bzw. P _{actA})-Sonde.....	59
4.3.5.3. Bindungsreaktion.....	59
4.3.6. Densitometrische Analyse	60
4.4. Standardmethoden	61
4.4.1. molekularbiologische.....	61
4.4.1.1. Aufschluss von Listerien	61
4.4.1.2. RT-PCR	61
4.4.1.3. Gelelektrophorese der DNA und Anfärbung	62
4.4.1.4. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	62
4.4.1.5. Isolierung von Plasmid-DNA mit kommerziellen Produkten	62
4.4.1.6. Isolierung chromosomaler DNA aus Listerien	62
4.4.1.7. Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen.....	63
4.4.1.8. Transformation von Plasmid-DNA in Bakterien	63
4.4.2. proteinchemische Methoden	63
4.4.2.1. SDS-Page	63
4.4.2.2. Transfer auf Nitrozellulose	64
4.4.2.3. Western-Blot.....	64
4.4.2.4. Antikörper-ELISA	65
4.4.2.5. Proteinquantifizierung nach Bradford	65
4.4.3. sonstige.....	65
4.4.3.1. Rehydrierung gefriergetrockneter Bakterienstämme.....	655
4.4.3.2. Anlegen von Glycerinkulturen	66
4.4.3.3. Präparation der Dialyseschläuche	66
5. Ergebnisse.....	67
5.1. Molekularbiologischer Nachweis von <i>L. monocytogenes</i>	67
5.1.1. PCR-Amplifikation	67
5.1.2. Reverse-Dot-Blot zur Post-PCR-Detektion von <i>L. monocytogenes</i>	68
5.1.2.1. Detektion auf Membranen:.....	68
5.1.2.2. Detektion in Mikrotiterplatten	68
5.2. Immunologie von <i>L. monocytogenes</i>	73
5.2.1. Aufreinigung des P60 Proteins	73
5.2.2. Peptid-Spot-Synthese	74
5.2.3. Epitopmapping.....	75
5.2.3.1. Seroanalyse mit humanen Antikörpern	75
5.2.3.2. Seroanalyse mit Hühnereierantikörpern IgY	78
5.2.4. Antikörperisolierung aus Hühnereiern.....	78

5.2.5. Suche nach CD4 T-Zellen im Mausmodell und deren Charakterisierung	79
5.2.5.1. Gewinnung und Charakterisierung P60-spezifischer T-Zell Klone	79
5.2.5.2. Zytokinproduktion P60-spezifischer T-Zell Klone	82
5.2.5.3. P60-spezifische TH1-Klone lysieren <i>L. monocytogenes</i> -infizierte Makrophagen	83
5.2.5.4. TH1-Klon 1A erkennt MHC-Klasse II H-2A ^d -restringiert P60 ₃₀₁₋₃₁₂	84
5.2.5.5. P60-spezifische TH1-Klone sind protektiv <i>in vivo</i>	85
5.2.5.6. Kreuzreaktivität <i>L. monocytogenes</i> P60-spezifischer T-Zellklone mit <i>L. innocua</i> -P60	86
5.2.5.7. Unterschiede in der P60-Antikörperpräsentation von <i>L. monocytogenes</i> und <i>L. innocua</i> infizierten Makrophagen	87
5.2.5.8. Eine <i>L. innocua</i> -Infektion kann <i>in vivo</i> keine P60-spezifische T-Zell-Antwort induzieren	89
5.2.5.9. <i>L. innocua</i> verstärkt die T-Zellerinnerung nach einer <i>L. monocytogenes</i> -Infektion	91
5.2.5.10. Limitierte protektive Effizienz von <i>L. innocua</i> -Infektionen	92
5.3. <i>In vitro</i> -Transkription PrfA-abhängiger und –unabhängiger Gene von <i>L. monocytogenes</i> ...	94
5.3.1. PrfA-Abhängigkeit der <i>in vitro</i> -Transkription von <i>actA</i> , <i>plcA</i> , <i>hly</i> , <i>mpl</i> , <i>prfA</i> ₁₊₂ , <i>iap</i>	94
5.3.2. <i>In vitro</i> ist die Transkriptions-Initiation bei allen Promotoren abhängig von der Verfügbarkeit der ersten drei rNTPs und hohen Konzentrationen an ATP	955
5.3.3. Effizienz der <i>in vitro</i> -Transkription von RNA-Polymerasen, die unter verschiedenen Wachstumsbedingungen gewonnen wurden	977
6. Diskussion	103
6.1. Optimierung der Listeria Diagnostik	103
6.1.1. Molekularbiologische Detektion von <i>L. monocytogenes</i>	103
6.1.2. Immunologische Detektion von <i>L. monocytogenes</i>	104
6.2. Immunologie des P60-Proteins von <i>L. monocytogenes</i> bzw. <i>L. innocua</i>	106
6.2.1. Die protektive Wirkung <i>L. monocytogenes</i> -P60-spezifischer TH1-Zellen <i>in vivo</i>	106
6.2.2. Die Rolle von <i>L. innocua</i> beim Schutz vor <i>L. monocytogenes</i>	109
6.3. PrfA	1122
7. Literaturverzeichnis	117
8. Abkürzungen	11739
9. Anhang Epitop-Spot-Mapping	13941
9.1. Aminosäuresequenz der generierten Peptidlibrary des listeriellen p60-Proteins	141
9.2. Listeria P60 Aminosäuresequenz	157
9.3. Zusammenfassung der Seroanalyse	160
10. curriculum vitae	166
11. Danke !	167

Listeria monocytogenes, ein Gram-positives, fakultativ intrazelluläres Bakterium, kann bei immunsupprimierten Menschen schwere Infektionen des Zentralnervensystems auslösen. In Folge seines ubiquitären Vorkommens, sowie seiner hohen Resistenz gegenüber Lebensmittel-Konservierungsmethoden besteht ein großes Interesse an seiner raschen Identifizierung und Differenzierung gegenüber den apathogenen Spezies seiner Gattung. Sein P60 als essentielles Housekeeping-Gen bietet sich auf Grund der zwischen den einzelnen Spezies konservierten und variablen Bereiche für die Etablierung gattungs- und speziesspezifischer Nachweissysteme an.

Mit Hilfe des EPITOP-SPOT-Mappings wurde eine Immunogenitätskarte des P60 von *L. innocua* bzw. *L. monocytogenes* erstellt, P60-spezifische CD4-T-Zelllinien charakterisiert und das Epitop eines dieser T-Zellklone exakt bestimmt. Transferexperimente mit diesen T-Zelllinien und Boosterinfektionen mit *L. monocytogenes* bzw. *L. innocua* zeigten, dass *L. innocua* alleine zwar nicht in der Lage ist, einen Immunschutz gegen *L. monocytogenes* zu etablieren, diesen jedoch *in vitro* und *in vivo* erhalten kann, indem es durch kreuzreaktive Epitope Gedächtnis-T-Zellen stimuliert.

Die *in vitro*-Transkription von P_{hly} , P_{plcA} und P_{actA} erfolgt strikt PrfA-abhängig, während P_{iap} , $P_{prfA1/2}$ und - unerwarteter Weise - auch P_{mpl} PrfA-unabhängig transkribiert werden. Sie erfolgt - ausgenommen bei P_{prfA} - nur bei ausreichender Verfügbarkeit von ATP nicht jedoch GTP. Um eine effiziente Transkription zu gewährleisten, müssen die ersten drei initiierten Nukleotide in höherer Konzentration vorliegen. Die verschiedenen, über eine Heparinsäule aufgetrennten RNAP-Fractionen von *L. monocytogenes* zeigten je nachdem, ob die Kulturen einer Hitzeschockbehandlung bei 48°C (RNAP₄₈) ausgesetzt, in MEM geshiftet (RNAP_{MEM}) oder aber direkt aus dem BHI-Medium (RNAP_{BHI}) geerntet wurden, mit den oben genannten Promotoren unterschiedliche Aktivitätsprofile. Demnach benötigen *actA* und *hly* für ihre optimale Transkription womöglich einen alternativen Sigmafaktor (als $\sigma-43$).

1.1. Summary

Listeria monocytogenes, a Gram positive, optionally intracellular bacterium is capable of causing heavy infections of the central nervous system in immunocompromised humans. Due to its ubiquitous occurrence, as well as its high resistance to preservation methods there is a great interest in its rapid identification and differentiation towards the apathogenic species of *Listeria*. Due to the preserved and variable domains P60 as an essential housekeeping gene represents a promising target in order to establish genus- and species-specific detection systems.

An immunogenic map of the P60 of *L. innocua* and *L. monocytogenes* was generated by EPI-TOP-SPOT-mapping. Furthermore CD4-T-cells specific for P60 were hereby characterized and for one of them the epitope was exactly determined. Transfer experiments with these T-cells and booster infections with *L. monocytogenes* and/or *L. innocua* showed that *L. innocua* alone is not capable of establishing an immune protection against *L. monocytogenes*, while *in vitro* and *in vivo* it was sufficient to maintain an existing immunity through stimulating memory T-cells by cross-reactive epitopes.

In vitro-transcription from P_{hly} , P_{plcA} and P_{actA} occurs strictly PrfA-dependent while that of P_{iap} , $P_{prfA1/2}$ and, unexpectedly, also from P_{mpl} is PrfA-independent. It requires – except with P_{prfA} - high concentrations of ATP but not GTP. In order to ensure an efficient transcription, the first three initiating nucleotides have to be available in higher concentration. RNAP separated over a heparin column after preparation from *L. monocytogenes* either exposed to heat shock treatment at 48°C (RNAP₄₈), shifted to MEM (RNAP_{MEM}), or cultured directly in BHI (RNAP_{BHI}) showed different activity profiles with the promoters mentioned above. Therefore *actA* and *hly* may require an alternative sigma factor (not σ -43) for their optimal transcription.

2.1. Taxonomie der Listerien

Listerien sind Gram-positive, reguläre, asporogene, fakultativ anaerobe, kurze ($0,4-0,5 \times 0,5-2 \mu\text{m}$) Stäbchenbakterien mit peritricher Begeißelung (Seeliger et al. 1994). 16S-rRNA-Vergleiche ordnen Listerien in die Gruppe der Gram-positiven Bakterien mit niedrigem GC-Gehalt von 36-42% ein. Es besteht eine enge Verwandtschaft zur Gattung *Brochothrix*, mit der die Listerien zwischen *Lactobacillus* und *Bacillus* anzusiedeln sind. Ferner verwandt sind sie mit *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Staphylococcus*, *Kurthia*, *Gemella* und *Erysipelothrix* (Jones 1988).

Man unterscheidet sechs Arten: *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*, sowie *L. grayi* mit *subsp. grayi* und *subsp. murrayi* (Sallen et al. 1996). Die zuvor eigenständigen Spezies *L. murrayi* und *L. grayi* wurden früher auf Grund von DNA-DNA-Hybridisierungen aus der Gattung ausgegrenzt (Stuart et al. 1974), nach 16S-rRNA-Sequenzanalysen wieder reintegriert (Rocourt 1988). Schließlich konnte anhand weiterer molekulargenetischer Analysen *L. murrayi* in die Spezies *L. grayi*, als Subspezies eingegliedert werden (Rocourt et al. 1992). *Listeria denitrificans* musste aus der Gattung *Listeria* in die neue Gattung *Jonesia*, als *J. denitrificans*, überführt werden (Rocourt 1988). *L. monocytogenes* ist als einziger Vertreter dieser Gattung human- und tierpathogen. *L. ivanovii* ist bis auf Einzelfälle nur tierpathogen (Schafe), während *L. seeligeri*, *L. welshimeri*, *L. innocua* und *L. grayi* als harmlose Saprophyten gelten (Hof et al. 1988; Schwarzkopf 1996).

2.2. Mikrobiologie der Listerien

Listerien sind in der Natur ubiquitär verbreitet; so kommen sie z.B. in Gewässern, im Abwasser, Boden, auf bzw. in Pflanzen (Pushkareva et al. 1996), in Nutztieren, wie Kühen und Schafen, somit auch in Milch und Milchprodukten (Käse), rohem Gemüse und Fleischprodukten, sowie im Darm von gesunden Menschen vor (Weis et al. 1975; Schlech 2000; Capita et al. 2001; Pingulkar et al. 2001).

Listerien lassen sich auf komplexen, mit verschiedenen Aminosäuren, Biotin, Riboflavin und Thiamin supplementierten Medien züchten. Je nach Spezies (vgl. Tab. 1) können sie verschiedene Kohlenhydrate ohne Bildung von Gas fermentieren (Pine et al. 1989). Zusammen mit der bei einigen Arten vorhandenen Fähigkeit zur β -Hämolyse, die als Unterscheidungsmerkmal mit Hilfe des CAMP-Tests gesteigert werden kann, zieht man diese Kriterien zur biochemischen Differenzierung heran. Bei dem, nach den Entdeckern **Christie**, **Atkins** und **Munch-Petersen** benannten CAMP-Phänomen verstärken von *Staphylococcus aureus* bzw. *Rhodococcus equi* sekretierte Faktoren synergistisch die β -Hämolyse bei *L. ivanovii* und *L. monocytogenes* (Christie et al. 1944; Schuchat et al. 1991; Fernandez-Garayzabal et al. 1996).

Tab. 1: Biochemische Differenzierung von Listerien (frei nach (Pine et al. 1989)):

Kennzeichen	Art	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. ivanovii</i>	<i>L. seeligeri</i>	<i>L. welshimeri</i>	<i>L. grayi</i>
β-Hämolyse		+ ¹	-	+	+	-	-
CAMP-Test (<i>S. aureus</i>)		+	-	-	+	-	-
CAMP-Test (<i>R. equi</i>)		+	-	+	-	-	-
Säureproduktion aus Methyl- α -D-mannopyranosid		+	+	-	-	+	n. b. ³
D - Glucose		+	+	+	+	+	+
D - Mannit		-	-	-	-	-	+
Rhamnose		+	v ²	-	-	v	-/v
Xylose		-	-	+	+	+	-
Nitratreduktion		-	-	-	-	-	-/+
Mäusevirulenz		+	-	+	-	-	n. b.

¹ "+" bzw. "-": $\geq 90\%$ der Stämme waren positiv bzw. negativ

² v = variabel

³ n. b. = nicht bestimmt

L. monocytogenes ist sogar zu einer Acetaldehyd-induzierten Chemolumineszenz fähig, bei der ein extrazelluläres Superoxidanion gebildet wird (Roth et al. 1980). Des Weiteren verhalten sich Listerien, von einigen Ausnahmen (Bubert et al. 1997) abgesehen, Katalase-positiv, Oxidase-negativ, Methylrot-positiv und Voges-Proskauer-positiv (Schuchat et al. 1991). Sie vermehren sich im vergleichsweise breiten Temperaturbereich von -0,4°C bis 50°C (Walker et al. 1990). Selbst Temperaturen bis 60°C und Salzkonzentrationen von bis zu 10% können kurzfristig toleriert werden (Gray et al. 1966). Das Temperaturoptimum liegt jedoch bei 37°C. Da die Regulation der Flagellinexpression auf transkriptioneller Ebene temperaturabhängig ist (Dons et al. 1992), sind sie bei dieser Temperatur unbegeißelt (Peel et al. 1988) und zeigen einen charakteristischen blaugrünen Schimmer, wenn sie in einem spitzen Winkel angestrahlt werden (Henry 1933). Bei ca. 20°C bis 25°C dagegen beobachtet man - als Konsequenz der Ausbildung peritricher Geißeln - eine starke Motilität. Der minimale zum Wachstum notwendige pH liegt, je nach Temperatur, bei 5,0 bis 5,7 (4°C) bzw. bei 4,3 bis 5,2 (30°C) (Farber et al. 1989); der maximale bei 9,6. Optimales Wachstum wird allerdings bei 30-35°C und neutralen bis leicht alkalischen pH-Werten beobachtet.

2.3. Pathogenese, Therapie und Epidemiologie

Der Überbegriff Listeriose steht für ein komplexes Krankheitsbild mit grippalen Symptomen bei Krankheitsbeginn und häufig basalen Meningitiden (Hirnhaut-) bzw. Meningoenzephalitiden (Hirnhaut- und Hirnparenchyminfektionen), bis hin zur Sepsis im weiteren Krankheitsverlauf. Zusätzlich kann eine Vielzahl weiterer Symptome die Diagnose verschleiern, weshalb die Entwicklung einer schnellen und einfachen Nach-

weismethode für eine effektive Therapie dringend notwendig ist. *L. monocytogenes* kann als einziges bisher bekanntes Bakterium eine Enzephalitis hervorrufen, da es die Fähigkeit besitzt, die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden (Gray und Killinger 1966). Vielleicht ist es gerade diese, für Bakterien einzigartige Fähigkeit, die es dem Listerium ermöglicht, auch die Plazenta zu passieren. Dadurch kann es zu Amnionitis, vorzeitigem Einsetzen der Wehen und einem Befall des Fötus kommen, was sich in einer Sepsis, einem spontanen Abort oder einer Totgeburt manifestiert (Schuchat et al. 1991). Der harmlose Verlauf einer listeriellen Infektion in Form einer Gastroenteritis wurde in der Vergangenheit meist nicht mit *L. monocytogenes* in Verbindung gebracht (Dalton et al. 1997).

Eine frühzeitige Therapie wird durch die Komplexität des Krankheitsbildes, sowie die langwierigen Nachweismethoden (selektive Anzucht) erschwert. Durch rechtzeitige Applikation von Ampicillin, zusammen mit einem Aminoglykosid-Antibiotikum (Gentamycin) oder mit Sulfamethoxazol/Trimethoprim innerhalb der ersten vier Tage, ist die Krankheit erfolversprechend therapierbar (Hof 1990; Temple et al. 2000).

Obwohl der opportunistische Keim ubiquitär vorkommt, manifestiert sich die Listeriose-Erkrankung nur selten, verläuft dann aber mit einer Wahrscheinlichkeit von 13 - 34% (für das Jahr 1989, je nach Land) tödlich. Die Listeriose-Risikogruppe stellen fast ausschließlich Menschen mit einem geschwächten Immunsystem: Neugeborene, Schwangere und ältere Menschen, sowie Patienten mit AIDS, Diabetes, Alkoholismus oder Krebserkrankung (Kampelmacher et al. 1972), bzw. solche, die Immunsuppressiva verabreicht bekommen.

Wenngleich alle Serovarianten von *L. monocytogenes* eine Listeriose verursachen können, treten klinisch hauptsächlich nur die Serotypen 1/2a, 1/2b und 4b auf (Vines et al. 1998). Die Dominanz eines Serotypen kann von geographischen Gegebenheiten (z.B. ist in Europa der Serotyp 4b besonders verbreitet), der betroffenen Risikogruppe (perinatale Listeriose scheint insbesondere von den Serotypen 1/2b, 3b, und 4b ausgelöst zu werden (Gellin et al. 1991)) oder dem Träger (Nahrungsmittel), abhängig zu sein. So tritt z.B. Serotyp 1 vorwiegend in Fleisch, sowie bei Tomaten und Radieschen auf (Heisick et al. 1989). Eine besondere Gefahr geht von Nahrungsmitteln aus, die bereits ab Werk kontaminiert sind, da auf diese Art Epidemien ausgelöst werden können. Listerien werden mit dem Nahrungsmittel weit verbreitet, weil die üblichen Konservierungsmethoden, wie Kühlung und Osmolaritätserhöhung (z.B. Salami) hier als selektive Anreicherungsverfahren wirken. Zum Beispiel waren 1985 81 von 93 schwangerschafts-assoziierten Listeriosefällen in Kalifornien Frauen spanischer Abstammung betroffen, die eine spezielle Sorte eines kontaminierten mexikanischen Weichkäses zu sich genommen hatten. In dem Käse konnte *L. monocytogenes* Serotyp 4b nachgewiesen werden, der wahrscheinlich mit unpasteurisierter Milch in den Käse gelangte. Dadurch wurde im Juli 1985 zum ersten Mal ein Produkt wegen Listerienbefall noch während der Epidemie vom Markt gerufen und die Fabrik geschlossen (Linnan et al. 1988). Aber auch Rohgemüse (Ho et al. 1986), Fertigsalate (Salamina et al. 1996; Aureli et al. 2000), pasteurisierte Milch (Alavi et al. 1999) und weitere Milchprodukte (Goulet et al. 1995; Lyytikäinen et al. 2000), sowie Fisch (Tham et al. 2000), Meeresfrüchte (Brett et al. 1998; Farber 2000), Fleisch (Anonymous 2000) und Fleisch-

produkte (Jacquet et al. 1995) waren bereits Ursachen für beschriebene listerielle Epidemien. Auch muss bedacht werden, dass durch Silofutter infizierte Nutztiere (Vazquez-Boland et al. 1992; Wiedmann et al. 1996) entweder direkt oder indirekt, wie z.B. in Nova Scotia über die Düngung von Kohlfeldern mit listerienhaltigem Dung, als Überträger dienen könnten (Davies et al. 1984). Zudem können Listerien in der Umwelt lange persistieren. So blieb z.B. gerade im Klärschlamm die Zahl von *L. monocytogenes* über acht Wochen konstant (Watkins et al. 1981) und selbst Monate, bzw. gar Jahre später war das Bakterium im Klärschlamm noch nachweisbar (Geuenich et al. 1984), da eine Unempfindlichkeit gegenüber der aeroben Abwasserbehandlung existierte (De Luca et al. 1998). Jedoch konnte die Kontaminationszahl in Klärschlammblöcken durch eine mindestens 8-wöchige Trocknungsperiode bei subtropischen Wetterbedingungen unter die Nachweisgrenze gesenkt werden (al-Ghazali et al. 1988). Die hier angesprochene Problematik des Einsatzes von Klärschlamm oder tierischer Exkremente als Düngemittel, wird durch die Verbreitung von *L. monocytogenes* durch Wildvögel (Seemöwen), welche zur Futtersuche kontaminierte Kläranlagen aufsuchen, erweitert (Fenlon 1985).

Schließlich kann es zu einer Ansteckung durch nosokomiale Keime kommen, wenn Hygienemaßnahmen nicht sorgfältig genug durchgeführt werden oder Mehrweggeräte nicht gründlich sterilisiert werden. Auch eine Übertragung mittels Bluttransfusion kann nicht ausgeschlossen werden (Maayan et al. 1981; Lin et al. 1994).

2.4. *L. monocytogenes* - ein fakultativ intrazelluläres Bakterium

L. monocytogenes wurde erstmals 1926 von E. G. D. Murray et al. aus den Monozyten infizierter Laborhasen und Meerschweinchen isoliert und als *Bakterium monocytogenes* beschrieben (Murray et al. 1926). Von Pirie wurde es 1927 in *Listerella hepatolytica* und schließlich 1940 zu Ehren von Lord Lister, dem Entdecker der Antisepsis, in *L. monocytogenes* umbenannt (Pirie 1940; Gray und Killinger 1966). Das Umweltbakterium hat einen Durchmesser von 0,4 bis 0,5 μm und eine Länge von 0,5 bis 2 μm . Wenn es ausreichend Zeit zur Verfügung hat, ist es in der Lage, selbst bei Einhaltung der Kühlkette, in verschiedenen Nahrungsmitteln Zellzahlen zu erreichen, die - fast ausschließlich nur bei immunsupprimierten Individuen - zu einer Listeriose führen können.

Da die Pathogenese von *L. monocytogenes* der von *Rickettsia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Legionella*, *Trypanosomas cruzii* und *Yersinia* ähnelt (Cossart und Mengaud 1989; Finlay und Falkow 1997; Meyer et al. 1997), ist dieses Modell für ein fakultativ intrazelluläres Bakterium - in Anbetracht der großen Verbreitung dieser Infektionskrankheiten - von besonderem Interesse für die Grundlagenforschung, in Hinblick auf die Schaffung neuer Präventions- und Therapiemethoden. Insbesondere die leichte Handhabbarkeit, die Ungefährlichkeit für gesunde Menschen und die Einsatzfähigkeit im Mausmodell, sprechen für *L. monocytogenes* als Modellorganismus (Goebel et al. 1993). Pionierarbeit auf diesem Sektor leistete 1971 G. B. Mackaness, wodurch man heute ein recht gutes Bild davon hat, was bei einer Listerien-Infektion geschieht. So führt bei Mäusen eine intravenöse Infektion mit subletaler Dosis (0,5 LD₅₀) zu einer raschen Aufnahme der Bakterien durch die Makrophagen in Leber und Milz. Die überlebenden Keime (ca. 50%) vermehren sich in den ersten drei Tagen exponentiell, bis sie schließlich im Ablauf der nächsten 3-7 Tage vom Immunsystem eliminiert werden. Danach sind diese Mäuse gegen eine zweite Infektion mit letaler Bakteriendosis (10 LD₅₀) immun, wogegen nicht behandelte Mäuse am zweiten bzw. dritten Tag sterben (Mackaness 1962).

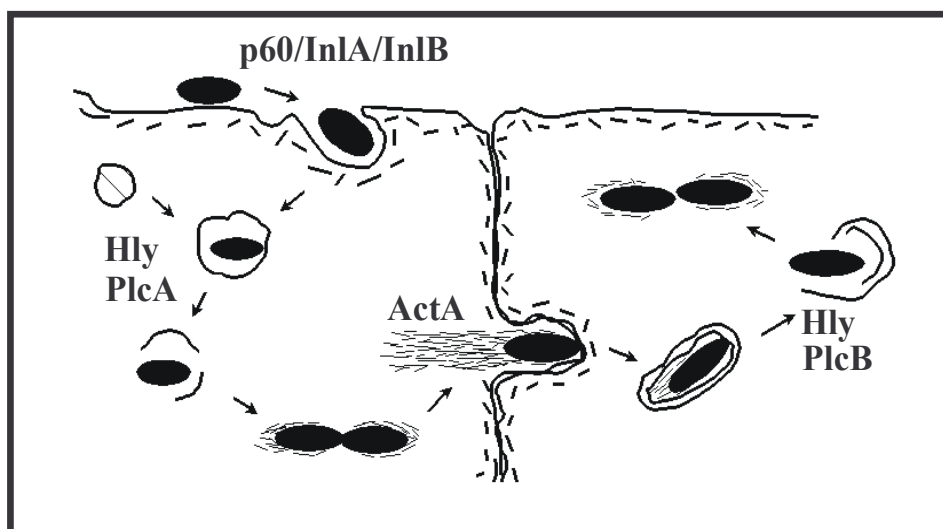


Abb. 1: Intrazellulärer Vermehrungszyklus von *L. monocytogenes* (modifiziert nach Tilney und Portnoy 1989).

Abb. 1 gibt einen Überblick der aktuellen Vorstellung über das Geschehen beim intrazellulären Vermehrungszyklus des Bakteriums. Das Pathogen gelangt durch die orale Aufnahme kontaminierter Nahrung in den Darm, adhärirt an den Darmepithelzellen (Racz et al. 1972) und induziert dort aktiv seine Phagozytose.

Infolge der Invasion wird es in ein Phagosom eingeschlossen. Obwohl im Phagosom, durch die Verschmelzung mit dem Lysosom, die Zerstörung der Bakterien eingeleitet wird, schaffen es einige, sich rechtzeitig aus dieser Falle zu befreien, um sich dann intrazellulär - für die humorale Immunantwort unerreichbar - zu vermehren. Durch die Induktion eines Aktinschweifs ("comet tail") gelangt *L. monocytogenes* über Bildung von Pseudopodien in die angrenzenden Zellen. Diese befinden sich dabei in den Pseudopodien und werden dort von Makrophagen oder - nach Induktion - von normalerweise nicht phagocytierenden Zellen wie Epithelzellen, Fibroblasten oder dendritischen Zellen (Gaillard et al. 1987; Portnoy et al. 1988; Kuhn und Goebel 1989; Guzman et al. 1995) assimiliert. Weiter erreicht das Listerium über Makrophagen der darunter liegenden Lamina propria (Racz et al. 1972) die Leber, wo es sich in den Hepatocyten vermehrt (Rogers et al. 1996). Über die Blutbahn kann es dann schließlich auf noch ungeklärte Art und Weise bis zum Gehirn gelangen (Greiffenberg et al. 1998; Huang et al. 2000).

2.5. Beteiligte Virulenzfaktoren

2.5.1. innerhalb des Virulenzgenclusters

Eingebettet zwischen Genen für essentielle Stoffwechsellzyme, dem *prs* (Phosphoribosyl-pyrophosphat-Synthetase) "upstream" und der *ldh* (Lactat-dehydrogenase) liegt das PrfA-abhängige Virulenzgencluster (Goebel et al. 1993). Es enthält sechs gut untersuchte Gene: *prfA* (positively regulating factor A), *plcA*, *hly*, *mpl*, *actA* und *plcB*, sowie drei weitere offene Leseraster (ORF X, Y, Z) mit noch unbekannter Funktion. Sie kodieren für Listeriolysin (*hly*), zwei Phospholipasen (*plcA* und *plcB*), eine Metalloprotease (*mpl*), ActA (*actA*) und den pleiotropen Transkriptionsfaktor („positiv regulatory factor A“) PrfA (*prfA*).

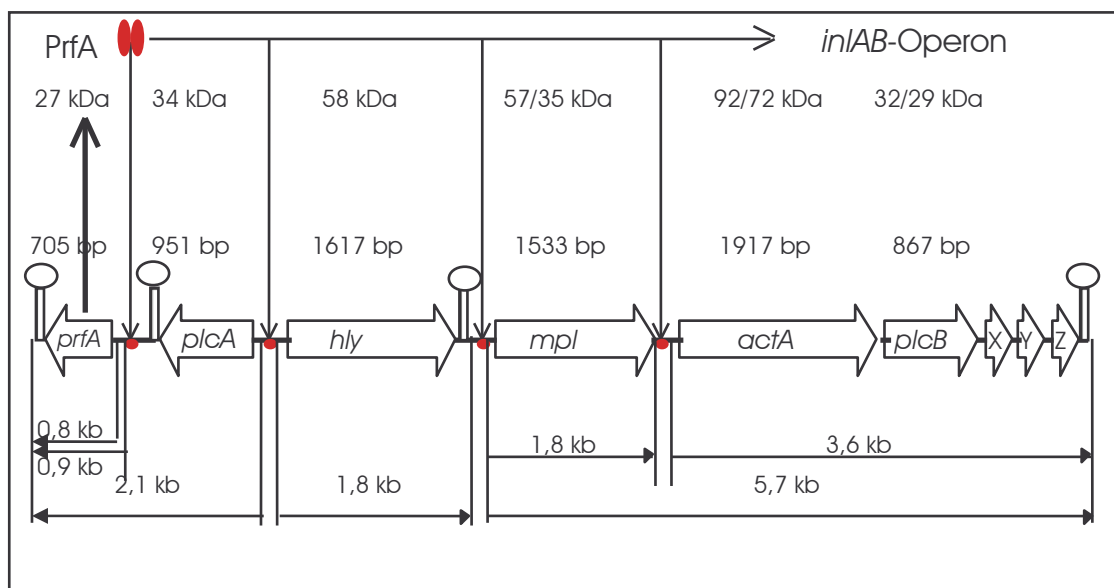


Abb. 2: Aufbau und Anordnung des PrfA-Regulons von *L. monocytogenes* mit den Genen *prfA*, *plcA*, *hly*, *mpl*, *actA* und *plcB*. Die dünnen Pfeile zeigen die Leserichtung und die Länge der Transkripte an (frei nach (Portnoy und Jones 1994)).

2.5.1.1. Listeriolysin O (LLO)

Das von *hly* codierte Listeriolysin O ist ein porenformendes, pH-abhängiges, durch reduzierende Agentien (DTT) aktivierbares und durch Cholesterin inaktivierbares Zytolysin (Walton et al. 1999). Das pH-Optimum von 5,5 ist ein weiteres Indiz für dessen Einsatz im sauren Milieu des Phagosoms (Geoffroy et al. 1987). Innerhalb von 30 min befreit sich das Pathogen aus dem Phagosom mit Hilfe von LLO (MG= 58 - 60 kDa) (Kreff et al. 1989; Goebel und Kreff 1997). Auch durch Zugabe von Histag-LLO zu Nickel-umhüllten LLO-negativen Mutanten konnte gezeigt werden, dass LLO keinen Einfluss auf die Bildung von Pseudopodien und die Ausbreitung zu den Nachbarzellen hat, jedoch entscheidend für das Entkommen aus der Doppelmembranvakuole ist (Gedde et al. 2000). In HeLa-Zelllinien ist LLO für die Aktivierung des Raf-MEK-MAP Kinase Signalweges (Tang et al. 1994; Weiglein et al. 1997; Tang et al. 1998) und - insbesondere bei der Aktivierung von HUVECs im Verlauf einer Infektion - für die Stimu-

lation von NF- κ B, Adhäsionsmolekülen (ICAM-1 und E-Selectin) und Chemokinen (IL-8 und das Monozytenchemotaktische Protein-1) verantwortlich (Kayal et al. 1999). Die MAP-Kinase(n) ERK-1 bzw. ERK-2 scheinen für die Aufnahme und das intrazelluläre Überleben in J774 Makrophagen verantwortlich zu sein (Kugler et al. 1997). Kürzlich konnte in HUVECs die Induktion verschiedener Signaltransduktionswege (einschließlich NF- κ B und Phospholipase-Aktivierung) gezeigt werden, wobei LLO für die Produktion der proinflammatorischen Zytokine IL-6, IL-8 und des Granulozyten-Makrophagen Koloniestimulierenden Faktors verantwortlich gemacht werden konnte (Rose et al. 2001).

Während in Makrophagen die lytische Wirkung durch Cholesterin inhibiert werden konnte, wurde die IL-1 Produktion dadurch nicht beeinflusst (Yoshikawa et al. 1993). Weiter wäre ein Einsatz von LLO zur Verfügbarmachung von Eisen aus der Hämgruppe des Hämoglobins durch die Lyse der Erythrozyten denkbar, da Eisenmangel im Phagosom zur verstärkten LLO-Produktion führt (Sword 1966).

Die Induktion des Listeriolysins in *L. monocytogenes* mittels Hitzestress oder oxidativem Stress geht mit der Co-Induktion mindestens fünf weiterer "heat-shock"-Proteine einher (Sokolovic und Goebel 1989; Sokolovic et al. 1990). Ebenso zeigt auch Eisen bzw. Selen (Fisher und Martin 1999) oder ein Chelator induzierende Wirkung, wobei Chelex-100 spezifisch LLO Transkription induziert (Ermolaeva et al. 2000). Unter Stressbedingungen ist die Aktivität von LLO auch von der Serinprotease ClpP abhängig (Gaillot et al. 2000). Die Zerstörung der Wirtszelle in Folge unkontrollierter LLO-Aktivität wird durch dessen rechtzeitige - von der PEST-Aminosäure-Sequenz vermittelte - Degradation verhindert (Decatur und Portnoy 2000).

2.5.1.2. Phosphatidylinositol-spezifische Phospholipase C (PI-PLC)

PI-PLC bewirkt, zusammen mit LLO, die Lyse der primären phagosomalen Membran (Portnoy et al. 1994; Goldfine et al. 1995). Sein pH-Optimum bei pH 5,5 - 7,0 ist ein weiterer Hinweis auf die Aktivität des Enzyms in der sauren Vakuole. Das 33 kDa schwere Überstandsprotein verwendet als Substrat mit hoher Spezifität Phosphatidylinositol (Goldfine und Knob 1992). Für sich alleine betrachtet scheint es keine relevante Bedeutung für die Pathogenität von *L. monocytogenes* zu besitzen, jedoch bewirkt die Deletion von *plcA* zusammen mit *plcB* (s.u.) eine 500-fach erhöhte LD₅₀ (Wadsworth und Goldfine 1999). Es gibt Hinweise darauf, dass beide Phospholipasen verantwortlich für die Ceramid- und E-Selektin-Bildung, NF- κ B Aktivierung und das „rolling“ bzw. die Adhäsion polymorphkerniger Leukozyten an humanen Epithelzellen (*in vitro*) verantwortlich sind (Schwarzer et al. 1998). Makroskopisch werden *plcA* -Mutanten durch die verminderte Hämolyse auf Blut-Agar-Platten (Kathariou et al. 1990) und die verlangsamte Ausbreitung auf Fibroblastenmonolayern (Sun et al. 1990), die zu kleinen Plaques führen, charakterisiert.

2.5.1.3. ActA

Nach der Flucht aus dem Phagosom in das Zytoplasma, vermehren sich die Listerien trotz limitierten Nährstoffangebots mit einer Generationszeit von ca. eine Stunde (Gaillard et al. 1987). Nach ca. 2,5

Stunden beginnen sie Wirtszell-Aktin zu einem "Schweif" ("comet tail") zu polymerisieren. Dadurch sind sie in der Lage, sich mit bis zu 1,5 mm/sek intra- und interzellulär fortzubewegen (Dabiri et al. 1990). Verantwortlich für die Rekrutierung des Wirtszellaktins ist als einziger listerieller Faktor das 610 Aminosäuren lange (ca. 90 kDa) Oberflächenprotein ActA (Kocks et al. 1992; Smith et al. 1995; Cameron et al. 1999), wobei die N-terminale Domäne allein hinreichend hierfür wie auch für die Dimerisierung ist (Mourrain et al. 1997). Intrazelluläre Listerien besitzen - auf Grund von Phosphorylierung - drei verschiedene ActA Varianten, die der Regulierung der ActA-Aktivität dienen könnten (Brundage et al. 1993).

Infolge der Zellteilung entsteht an den neuen Polen eine verminderte ActA-Konzentration (Kocks et al. 1993). Diese Polarisierung legt die Bewegungsrichtung fest. An den „alten“ Polen induziert ActA zwischen der Bakterienoberfläche und dem „Schweif“ die Aktinpolymerisation (Smith und Portnoy 1997), daher ist es nicht im Aktinschweif zu entdecken (Niebuhr et al. 1993). Die stark positiv geladene N-terminale Domäne ist dabei für die Aktinbindung zuständig, während der prolinreiche Bereich mit VASP interagiert (Gertler et al. 1996). Über Profilin wird so die Polymerisierungsfunktion des wirtszelleigenen Arp2/3-Komplexes aktiviert (Skoble et al. 2000). Mit Hilfe des „Yeast Two-Hybrid“-Systems konnte LaXp180 als weiteres ActA-bindendes Protein identifiziert werden (Pfeuffer et al. 2000).

ActA ist auch mitverantwortlich für die Internalin-unabhängige Aufnahme von *L. monocytogenes* durch Epithelzellen (Alvarez-Dominguez et al. 1997). Die Entfernung des Heparansulfats von den Epithelzellen mittels Heparitinase II zeigte dabei, dass die Interaktion von ActA mit Heparansulfat-Proteoglykan-Rezeptoren, die sowohl auf professionell als auch auf nicht professionell phagozytierenden Zellen vorkommen entscheidend ist.

2.5.1.4. Phosphatidylcholin-spezifische Phospholipase C (PC-PLC)

Außer der hochspezifischen Phosphatidylinositol-spezifischen Phospholipase C (PI-PLC), kennt man noch eine weitere Phospholipase mit breiterem Substratspektrum: die Phosphatidylcholin-spezifische Phospholipase C (PC-PLC) hydrolysiert auch Phosphatidyl-Ethanolamin, Phosphatidyl-Serin und mit geringerer Aktivität auch Sphingomyelin, nicht aber Phosphatidylinositol. Die alte Bezeichnung "Lecithinase" stammt von den beobachteten Trübungshöfen auf Eigelbagar-Platten (Füzi und Pillis 1962). Ihren heute gebräuchlichen Namen hat sie vom Phosphatidylcholin, einem im listeriellen Lebenszyklus funktionell wichtigen Substrat (Geoffroy et al. 1991). Nachdem die Zellausstülpungen von den Nachbarzellen oder von Makrophagen phagozytiert wurden, befinden sich die Bakterien nun von einer Doppelmembran umgeben in der neuen Wirtszelle. Offensichtlich ist die PC-PLC - zusammen mit Listeriolysin bzw. PI-PLC - verantwortlich für die Lyse dieser Doppelmembran, wodurch die Ausbreitung in die nächste Zelle ermöglicht wird. Bei Henle 407-Zellen konnte gezeigt werden, dass auch *llo* - Deletionsmutanten mit Hilfe von PC-PLC und einer Metalloprotease auch in der Lage waren, die primäre phagosomale Membran zu lysieren (Marquis et al. 1995). Parameter für die optimale Funktion der zinkabhängigen Phospholipase C sind: pH-Werte zwischen pH 6 und 7, 0,5 M NaCl sowie 0,05 mM ZnSO₄ (Goldfine und Knob 1992). Auch kann die Zn-Metalloprotease (*mpl*) für die Prozessierung des

32 kDa Proteins zum 29 kDa Protein verantwortlich sein (Marquis et al. 1997). Dabei spaltet die Metalloprotease die Proform, sobald der pH-Wert in der Vakuole unter sieben fällt, wobei keine de novo Proteinsynthese nötig ist, sondern der bereits vorhandene Pool an proPC-PLC genutzt wird (Marquis und Hager 2000). In der murinen Makrophagen-ähnlichen Zelllinie P388D₁ sorgen die beiden Phospholipasen zusammen mit Lipoteichonsäuren für eine persistente NFκB-Aktivierung indem sie vermutlich direkt in den Signaltransduktionsweg eingreifen und so ständig IκBβ abbauen (Hauf et al. 1997). Im Mausmodell ist PC-PLC ein wichtiger Virulenzfaktor der listeriellen Meningitis (Schluter et al. 1998). Im Gegensatz zu Säuger-Zellkulturen zeigen *plcB* - Mutanten bei infizierten Mäusen vermindertes Wachstum in Leber und Milz (Raveneau et al. 1992). Auch die LD₅₀ ist im Vergleich zum Wildtyp um zwei Größenordnungen kleiner.

2.5.1.5. Metalloprotease

Kodiert wird die zinkabhängige Metalloprotease von dem Gen *mpl*, dem ersten Gen des "Lecithinase-Operons" (Vazquez-Boland et al. 1992). Offenbar wird das 60 kDa Präprotein zur fertigen 35 kDa Metalloprotease gespalten (Mengaud et al. 1991), von der nur geringe Mengen im Überstand von *L. monocytogenes* nachgewiesen werden (Domann et al. 1991).

Seine proteolytische Aktivität ist – neben einem *mpl*-unabhängigen Weg - wichtig für die posttranslationale Prozessierung des 32 kDa PC-PLC-Vorläufers (Marquis et al. 1997) und des ActA-Proteins (Sokolovic et al. 1996).

2.5.1.6. Das PrfA-Regulatorprotein

Das erste Gen des Virulenzgenclusters *prfA* kontrolliert die Transkription der meisten bekannten Virulenzgene (Leimeister-Wachter et al. 1990; Mengaud et al. 1991; Dramsi et al. 1993; Freitag et al. 1993; Sheehan et al. 1995; Engelbrecht et al. 1996). Es kodiert für ein 237 Aminosäuren langes pleiotropes Regulatorprotein mit einem Molekulargewicht von 27 kDa, das zur Crp/Fnr Transkriptionsaktivator-Familie zählt (Lampidis et al. 1994; Sheehan et al. 1996). Allen Proteinen dieser Familie gemein ist ein konserviertes "Helix-Turn-Helix"-Motiv im C-Terminus. PrfA besitzt zusätzlich noch eine "leucine zipper"-ähnliche Domäne mit putativer DNA-Erkennungsfunktion und ein weiteres "Helix-Turn-Helix"-Motiv am N-Terminus (Kolb et al. 1993). Auch führt ein Aminosäureaustausch (Position 145 Gly -> Ser), der an einer ähnlichen Stelle bei Crp zur Arretierung in einer aktiven Form führt, ebenfalls zur Überexpression der Virulenzgene (Ripio et al. 1997). Daher liegt die Vermutung nahe, dass auch PrfA nach Interaktion mit einem Cofaktor von einer inaktiven in eine aktive Form übergeht (Vega et al. 1998).

Das PrfA-Regulon sorgt dafür, dass die Virulenzgene nur dann gebildet werden, wenn sie auch gebraucht werden, d.h. dass die Virulenzgene erst bei dem Übergang aus dem saprophytischen Habitat in den eukaryontischen Wirt angeschaltet werden (Freitag und Jacobs 1999). Im Vergleich zu *plcA* und *hly* werden *mpl*, *actA* und *plcB* viel später, im Zytoplasma induziert (Dietrich et al. 1998). So wird auch bei 20°C - obwohl bei dieser Temperatur ein deutliches Wachstum zu beobachten ist - keines der Virulenzgene induziert, während bei 37°C alle PrfA-kontrollierten Gene transkribiert werden (Leimeister-

Wachter et al. 1992). Auch Glucose und Cellobiose können unabhängig von PrfA supprimierend auf die Transkription von *hly* und *plcA* wirken (Klarsfeld et al. 1994; Milenbachs et al. 1997; Huillet et al. 1999). Neben dem unspezifischen Mechanismus über Katabolitrepression wurde auch ein spezifisches 2-Komponenten-System über Bvr identifiziert (Brehm et al. 1999). Glucose-1-Phosphat dagegen, das hauptsächlich in Säugerzellen als primäres Abbauprodukt von Glykogen vorkommt, wird durch PrfA positiv reguliert und reprimiert nicht die Transkription der Virulenzgene (Ripio et al. 1997).

Vermutlich induziert PrfA seine eigene Synthese über die konstitutive Transkription an den durch PrfA selbstregulierten Promotoren *prfAP1* und *prfAP2*, wobei Glucose (0,5%) *prfAP1* aktiviert, während *prfAP2* gehemmt wird (Freitag et al. 1993). Das dabei gebildete zunächst inaktive PrfA kann dann eine selbstregulierende Schleife („autoregulatory loop“) aktivieren, in der über den *plcA*-Promotor ein bicistronisches *plcA-prfA* Transkript gebildet wird (Mengaud et al. 1991).

Die Regulation des Virulenzgenclusters ist jedoch nicht allein von der Konzentration an *prfA*-Transkript, sondern auch von der PrfA-„Qualität“ und vielen weiteren miteinander vernetzten Faktoren abhängig (Bohne et al. 1996; Milenbachs et al. 1997; Renzoni et al. 1997; Bubert et al. 1999). Der Einfluss von äußeren Reizen über dritte Regulationssysteme zeigt sich z.B. an der - von „heat-shock“-Proteinen vermittelten - gesteigerten LLO-Produktion unter Hitzeschock-Bedingungen (Sokolovic et al. 1990; 1993). Auch Chelex-100 induziert spezifisch LLO, während durch die Behandlung mit Aktivkohle alle PrfA-abhängigen Virulenzgene induziert werden (Ripio et al. 1996; Ermolaeva et al. 2000).

Außerdem hängt zumindest in BHI die Bindung des PrfA-Dimers von der „Qualität“ der spezifischen 14 bp-Palindromsequenz (*plcA/hly*: 5´-TTAACANNTGTAN-3´; „PrfA-Box“) ab (Sheehan et al. 1995; Brehm et al. 1996; Williams et al. 2000).

Tab. 2: PrfA-Boxen verschiedener Promotoren von *L. monocytogenes* (Brehm et al. 1996).

PROMOTOR	PrfA-Box		
<i>plcA</i>	<u>TTAACA</u>	AA	<u>TGTTAA</u>
<i>hlyP1</i>	<u>TTAACg</u>	A <u>c</u>	<u>gaTaAA</u>
<i>hlyP2</i>	<u>TTAACA</u>	tt	<u>TGTTAA</u>
<i>mpl</i>	<u>TTAACA</u>	AA	<u>TGTaAA</u>
<i>actA</i>	<u>TTAACA</u>	AA	<u>TGTTAg</u>
<i>inIC</i>	<u>TTAACg</u>	ct	<u>TGTTAA</u>
<i>InIAP3</i>	a <u>TAACA</u>	tA	a <u>GTTAA</u>
<i>prfAP2</i>	a <u>TAACA</u>	At	<u>TGTTgt</u>

asymmetrische Nukleotide sind kleingeschrieben, komplementäre unterstrichen.

Neben den PrfA-abhängigen *hly*-Promotoren P1 und P2, kennt man noch einen weiteren PrfA-unabhängigen Promotor P3, mit *sigD*-homologer Konsensussequenz, der für eine geringe Hämolyseexpression verantwortlich ist (Domann et al. 1993). Bei *mpl* sind zwei weitere Promotoren bekannt, die zumindest *in vitro* PrfA-unabhängig sind. Der eine initiiert eine monocistronische 1,8 kb mRNA bzw. auch zusammen mit *actA* und *plcB* (sowie drei weiteren unbekanntenen Genen *x*, *y*, *z*), eine 5,4 - 5,7 kb mRNA. Der andere Promotor der direkt vor dem *actA*-Gen liegt, führt zu einem 3,6 kb langen bicistronischen Transkript aus *actA* und *plcB* (Bohne et al. 1994).

Darüber hinaus wird die Aktivität von mindestens fünf weiteren Genen, die nicht zum Virulenzgencluster gehören, von PrfA reguliert (Sokolovic et al. 1993; Kuhn und Goebel 1995; Engelbrecht et al. 1996). Aus der Auswertung des EU-geförderten „*Listeria*-Genom Sequenzierungsprojektes“ erhofft man sich die Identifizierung weiterer PrfA-abhängiger Gene.

2.5.2. außerhalb des Virulenzgenclusters

2.5.2.1. kleine sekretierte Internaline

Das kleine sekretierte *inlC* (Engelbrecht et al. 1996), (auch *irpA* genannt (Domann et al. 1997)) scheint nicht am Internalisierungsprozess beteiligt zu sein, da es in phagozytierenden J774-Zellen nur im späten Infektionsstadium exprimiert wird. Es gehört ebenso wie die kleinen Internaline *i-inlC*, *i-inlD*, *i-inlF* und *i-inlE* aus *L. ivanovii* zu den MEM-induzierbaren PrfA-abhängigen Genen (Engelbrecht et al. 1998a; Engelbrecht et al. 1998b). Im Gegensatz dazu sind alle anderen bisher bekannten Internaline nur partiell (s.u.) PrfA-abhängig (Lingnau et al. 1995; Bohne et al. 1996; Raffelsbauer et al. 1998).

2.5.2.2. die großen Internaline

Diese Oberflächenproteine besitzen, zusätzlich zu dem allen Internalinen gemeinsamen N-terminalen Signalpeptid und den 15 Leucin-reichen Aminosäure-Wiederholungen („leucin rich repeats“, LRR), noch den sog. B-repeat, gefolgt von einem C-terminalen Zellwandanker (Kobe und Deisenhofer 1994). Organisiert sind sie in Clustern (*inlAB*, *inlC2DE* bzw. *inlGHE*) oder (wie auch *inlC*) einzeln (Gaillard et al. 1991; Dramsi et al. 1997; Raffelsbauer et al. 1998).

InlA und InlB können sowohl PrfA-abhängig, als auch PrfA-unabhängig transkribiert werden (Lingnau et al. 1995; Sheehan et al. 1995; Bohne et al. 1996; Dickneite et al. 1998), so ist lediglich einer der vier *inlA*-Promotoren (*inlAP3*) PrfA-abhängig. Die durch Eisen induzierbare Transkription (Conte et al. 1996) erfolgt entweder bi- oder monocistronisch (vgl. Abb. 2). Wie für Caco-2 Zellen gezeigt wurde, ist das 80 kDa große InlA an der Adhärenz und Invasion von Epithelzellen beteiligt, indem es an den Wirtszellrezeptor E-Cadherin bindet (Gaillard et al. 1991; Mengaud et al. 1996). Wird es in *L. innocua* exprimiert, so erlangt auch diese die Fähigkeit zur Invasion.

Weiterhin ist Internalisation nicht abhängig von der Stoffwechselaktivität oder dem Differenzierungsgrad, vielmehr vom Vermögen zu proliferieren: während InlA alleine für die Invasion bei nicht proliferierenden Zellen verantwortlich ist, vermittelt InlA synergetisch mit InlB die Aufnahme bei proliferativen Zellen über das E-Cadherin (Velge et al. 1997).

Internalin B vermittelt die Adhärenz an Hepatocyten und Endothelzellen (Dramsi et al. 1995; Braun et al. 1998; Greiffenberg et al. 1998; Parida et al. 1998). Dabei wird mittels der 213 Aminosäuren großen LRR-Region (Braun et al. 1999) über den Rezeptor Met (Shen et al. 2000) die Phosphoinositol 3-Kinase aktiviert (Iretton et al. 1999). Bereits fünf Minuten nach dem ersten Zellkontakt des Bakteriums werden dadurch InlA/B-abhängig verschiedene Wirtszellproteine einschließlich der pp60^{c-src} Substrate phosphoryliert (Van Langendonck et al. 1998). Da die Hemmung des srcFR Signals durch Herbimycin A den Eintritt von *L. monocytogenes* verhindert scheint die Familie der src verwandten („srcFR“, **src family-related**) Proteine eine entscheidende Rolle im Internalisationsprozess zu spielen.

Über die anderen großen Internaline (InlC2, InlD, InlE, InlG, InlH und InlI) ist erst wenig bekannt. Da die Deletion des PrfA-unabhängigen *inlGHE*-Clusters zu einer reduzierten Erregerzahlen in Leber und Milz führt, kann eine Funktion für die Virulenz vermutet werden (Dramsi et al. 1997; Raffelsbauer et al. 1998).

2.5.2.3. fbp

Das 55,3 kDa Protein Fbp gehört vermutlich auf Grund seiner „PrfA-ähnlichen“ box ebenfalls zu den PrfA-regulierten Proteinen (Gilot et al. 2000). Es wird an der listeriellen Zelloberfläche exprimiert und bindet an das humane dimere Glykoprotein Fibronectin.

2.5.2.4. das vom *iap*-Gen kodierte P60

Das Protein P60 stellt einen am Adhärenz- und Invasionsprozess von *L. monocytogenes* beteiligten Faktor dar. P60 ist ein aus 484 Aminosäuren bestehendes bifunktionales Protein, das in erster Linie essentiell für den Zellmetabolismus ist und gleichzeitig das Hauptantigen der Listerien darstellt (Pamer 1994). Der Name stammt vom scheinbaren Molekulargewicht, das bei 60 kDa liegt, während der tatsächliche Wert 47,5 kDa beträgt. Diese Diskrepanz lässt sich dadurch erklären, dass selbst unter den denaturierenden Bedingungen des SDS-PAGE stark basische Bereiche der Sekundärstruktur noch gefaltet bleiben und so das Laufverhalten negativ beeinflussen (Kohler et al. 1991). Experimentell ließ sich für das P60 ein ungewöhnlich hoher isoelektrischer Punkt von $pI = 9,3$ feststellen (Kuhn und Goebel 1989). Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass diese Bestimmung des isoelektrischen Punktes im gerade noch messbaren Grenzbereich stattfand, kommt er dem theoretischen Wert von $pI = 10,0$ sehr nahe. Das vom *iap* (**i**nvasion **a**ssociated **p**rotein) -Gen kodierte Protein wird hauptsächlich sezerniert und liegt zu 25% Oberflächen-assoziiert vor (Ruhland et al. 1993). Die Transkription des 1452 bp langen Gens erfolgt monocistronisch und unterliegt nicht der Kontrolle von PrfA. Sie wird vielmehr auf posttranskriptionaler Ebene reguliert (Kohler et al. 1991).

P60 wird von allen Listerien produziert, wobei jedoch Unterschiede im Molekulargewicht und der Reaktivität mit dem gegen das *L. monocytogenes*-P60 gerichteten Antiserum zu beobachten sind (Bubert et al. 1992). Betrachtet man die Unterschiede und Gemeinsamkeiten der Aminosäuresequenz aller P60 Proteine, so lässt sich folgendes Schema ableiten:

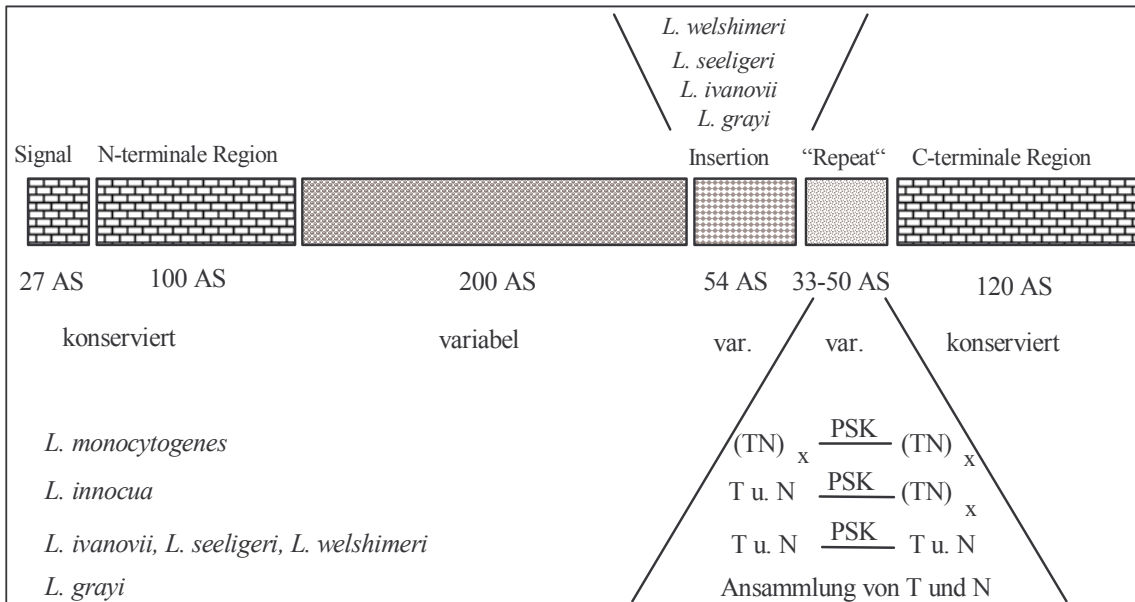


Abb. 3: Schematische Zusammenfassung der homologen und variablen Bereiche der P60 Proteine von *Listeria*, lt. Aminosäure-Sequenzvergleich. Oberhalb sind die Arten, die eine Insertion in ihrem P60 besitzen, aufgeführt. Die Struktur der Repeatregion der einzelnen Arten ist darunter angedeutet (nach Bubert et al. 1992).

Die N- und C-terminalen Enden stellen stark konservierte Bereiche dar, während der mittlere Teil der Proteine variabel ist. Dies könnte für die Entwicklung Spezies- und Gattungsspezifischer Tests sehr nützlich sein. Obwohl kurze Bereiche des P60 homolog zu anderen Zellteilungsproteinen sind, scheint die P60-Produktion ausschließlich auf Listerien beschränkt zu sein.

P60 enthält eine bis zu 20-malige Repetition des Aminosäure-Paars Threonin-Asparagin, die durch ein PSK-Motiv unterbrochen ist (Rasmussen et al. 1995). Nur beim *L. monocytogenes*-P60 ist eine spiegelbildliche Symmetrie an diesem Motiv vorhanden. Dies könnte der Grund für Unterschiede, trotz 90% Sequenzhomologie zum *L. innocua*-P60 (Bubert et al. 1992) sein.

Der einzige Cysteinrest des P60, im konservierten C-Terminus, der auch bei allen anderen Arten an dieser Position (396) konserviert ist, gerät dadurch in Verdacht, ein Bestandteil des aktiven Zentrums zu sein (Wuenscher et al. 1993). Beim Sequenzvergleich des C-terminalen Bereichs mit dem P54 von *Enterococcus faecium* und der Endopeptidase II von *Bacillus sphaericus* zeigt sich eine starke Homologie, welche die Vermutung nahe legt, dass es sich hierbei auch bei P60 um die katalytisch aktive Domäne handelt (Bubert et al. 1992). Dass P60 gegenüber *Micrococcus lysodeikticus* gattungübergreifende bakteriolytische Aktivität zeigt (Wuenscher et al. 1993), unterstützt diese Hypothese ebenso,

wie die starke Sequenzhomologie zum CwIF einer Zellwandhydrolase von *Bacillus subtilis* (Ishikawa et al. 1998). Ein anderer Bereich, der bei Autolysinen anderer Bakterien vermutlich Substratbindungsaktivität besitzt, kommt bei *L. monocytogenes* und *L. innocua* ebenfalls zweimal vor. In allen anderen P60 Proteinen ist diese 54 AS-Sequenz drei Mal vorhanden. Diese Homologien unterstützen die bislang vorliegenden funktionalen Analysen, dass das P60 aller Listerienarten als Zellteilungsprotein agieren kann. Daher geht man davon aus, dass es sich um eine, in einer späten Phase der Zellteilung benötigte, Mureinamidase, -hydrolase oder -endopeptidase handelt, wenn auch die genaue Spaltstelle im Murein noch nicht ermittelt werden konnte (Wuenscher et al. 1993).

Die spontan auftretende Rauh-Mutante (R III), die eine drastisch reduzierte P60-Expression aufweist ist nur vermindert invasiv und im Tiermodell weitgehend avirulent (Potel und Schulze-Lammers 1985; Kuhn und Goebel 1989). Charakteristisch für den Phänotyp ist auch die Ausbildung langer Ketten von vielen einzelnen Zellen mit Doppelsepten dazwischen. Durch die externe Zugabe von aus Kulturüberständen angereicherter *L. monocytogenes*-P60, lässt sich der Zerfall dieser langen Ketten, bis hin zum wildtypischen Phänotyp oder bei Überdosierung gar bis hin zur Lyse, induzieren. Diese Aktivität von P60 kann durch DTT gesteigert bzw. durch Iodacetat gehemmt werden (Bubert pers. Mitteilung), so dass ein möglichst naturgetreues System zur Untersuchung PrfA-spezifischer Genexpression geschaffen werden konnte (Bubert et al. 1997). Die Verkürzung der Ketten durch Ultraschall führt nicht zur Wiederherstellung der wildtypischen Adhärenz. Nur die Zugabe des *L. monocytogenes*-P60, nicht aber die von P60 anderer *Listeria*-Arten, kann dies bewerkstelligen (Bubert 1993). Mit Hilfe dieser RIII-Mutante konnte gezeigt werden, dass P60 *in vivo* für die Invasion der intestinalen Epithelzellen verantwortlich ist (Hess et al. 1996).

Eine andere Rauh-Mutante (R IV), die adhärenz, jedoch nicht invasiv für Maus-Fibroblasten ist, produziert P60 in wildtypischer Menge mit normaler Kettenzerfallsaktivität (Kuhn und Goebel 1989). Durch Zugabe von P60 lassen sich ihre Ketten nicht verkürzen, jedoch wird ihre Invasivität wiederhergestellt.

Neben den Rauh-Mutanten, deren Ketten aus mehreren Zellen bestehen (MCR genannt), kennt man auch noch eine andere atypische Gruppe rauher filamentöser Spontanmutanten, deren Ketten – bestehend aus einzelnen oder Paaren von Bakterien - sich nicht durch Zugabe von P60 verkürzen lassen. Sie sind ebenso adhärenz, invasiv und zytotoxisch für humane Hep-2, Caco-2 sowie HeLa Zellen und produzieren P60 in gleicher oder sogar höherer Menge als der Wildtyp (Rowan et al. 2000). Dieser Phänotyp lässt sich im Labor mittels Hitzeschock bzw. erhöhten Wachstumstemperaturen induzieren.

Mit Hilfe Fluoreszenz-aktivierter Durchflusszytometrie und Konfokallaser konnte P60 für die spezifische Bindung an Caco-2 Zellen verantwortlich gemacht werden (Park et al. 2000). Des Weiteren ist P60

nicht nur für die Funktion von LLO, sondern auch für die von PI-PLC, das ohne P60 eine um 31,46% reduzierte Aktivität aufweist wichtig (Wisniewski und Bielecki 1999).

2.5.2.5. spl/p45

Das P60-ähnliche 45 kDa Protein besitzt 55% Ähnlichkeit (zu 38% identisch) mit P60 (Schubert et al. 2000). Es ist ebenfalls sowohl im Überstand als auch an der Zelloberfläche anzutreffen. Benannt wurde es nach seiner Fähigkeit, Peptidoglykan spalten zu können (spl: secreted protein with lytic property).

2.5.2.6. lap/p104

Das zunächst p104 benannte 104 kDa Oberflächenprotein LAP („*Listeria* Adhesion Protein“) ist Vermittler der Adhäsion an Caco-2-Zellen (Pandiripally et al. 1999). Nicht bei 25°C, sondern lediglich bei 37°C bzw. 42°C ließ sich eine zeitabhängige Zunahme an LAP beobachten, die sich jedoch nicht in einer gesteigerten Invasivität manifestierte (Santiago et al. 1999).

2.5.2.7. Superoxiddismutase, Katalase und LmaA

Beim „oxidativen burst“ im Phagolysosom versucht die Wirtszelle mittels Ansäuerung, Defensinen, hydrolytischen Enzymen und Sauerstoffmetaboliten (z.B. Hydroxyradikal OH[•], Superoxidanion O₂^{•-}, Wasserstoffperoxid H₂O₂ und Hydroperoxyradikal HOO[•]) die Listerien unschädlich zu machen (Kaufmann 1993). Die bakteriellen Enzyme Superoxiddismutase (SOD) und Katalase (CAT) neutralisieren synergistisch die Effektivität dieser Angriffe (Bortolussi et al. 1987; Ohya et al. 1998; Geisen 1999), wobei v.a. für SOD die protektive Wirkung *in vivo* gegen Ozon gezeigt werden konnte (Fisher et al. 2000). Die 202 Aminosäuren lange SOD aus *L. monocytogenes* zeigt starke Homologien zu Mangan enthaltenden Superoxiddismutasen anderer Organismen (Brehm et al. 1992).

Obwohl Katalase-negative *L. monocytogenes* im Mausmodell eher von aktivierten Makrophagen abgetötet werden als der Wildtyp (van Dissel et al. 1993), scheint die Katalase nur von untergeordneter Bedeutung für die Virulenz zu sein, wie Untersuchungen an Transposonmutanten (Leblond-Francillard et al. 1989) und das Auftreten virulenter *cat*-negativer klinischer Isolate (Swartz et al. 1991; Elsner et al. 1996; Bubert et al. 1997) zeigten. Interessanter Weise ist, zumindest bei den in kleinen Kolonien intrazellulär in Pflanzen vorkommenden Pathogenen, eine erhöhte CAT-Aktivität zu beobachten (Pushkareva et al. 1996).

Durch Optimierung der Salzkonzentration (Dallmier und Martin 1990) oder die Zugabe von Eisen zum Medium kann die Aktivität von SOD und CAT gesteigert werden (Fisher und Martin 1999). Das für deren Synthese benötigte Eisen wird dabei - kompetitiv mit der Wirtszelle - mittels einer Cu⁺-ATPase durch die bakterielle Membran gepumpt (Agranoff und Krishna 1998).

LmaA (*Listeria monocytogenes* antigen **A**) ist ein sehr hydrophobes, sekretiertes Zellwandprotein, das in Mäusen eine Hypersensitivitätsreaktion des verzögerten Typs verursacht (Gohmann et al. 1990). Das

speziesspezifische *ImaA*-Gen bildet zusammen mit drei weiteren Genen das *ImaDCBA*-Operon, welches die 16.7 (LmaD), 16.4 (LmaC), 14.9 (LmaB), und 21 kDa (LmaA) Proteine kodiert (Schaferkordt und Chakraborty 1997). Nur bei 20°C wird es vermutlich wie Flagellin über ein Typ III Sekretionssystem sezerniert.

2.5.2.8. ClpP

ClpP ist eine Stress-induzierte 21 kDa Serinprotease, die an der Signalkaskade zur Stressantwort und der Aktivierung von LLO beteiligt ist (Gaillot et al. 2000).

2.5.2.9. GAD

Um die Aufzählung der listiellen Virulenzfaktoren abzuschließen soll noch das Glutamat Decarboxylase (GAD) System erwähnt werden. Es schützt das Pathogen im Magen vor dem sauren Milieu, indem Glutamat bei der Spaltung zu γ -Aminobutyrat mit einem intrazellulären Proton beladen wird (Cotter et al. 2001). Das GAD-System besteht aus zwei homologen Glutamatdecarboxylasen *gadA* und *gadB*, sowie einem putativen Glutamat/ γ -Aminobutyrat Antiporter *gadC*.

2.6. Immunologie

Wie vor allem Untersuchungen an SCID („severe combined immunodeficient“) Mäusen, die weder B- noch T- Zellen besitzen zeigen, werden vor allem im frühen Stadium der Bekämpfung einer listeriellen Infektion mit *L. monocytogenes* viele unspezifische, angeborene Abwehrmechanismen, die abhängig vom Gewebetyp das koordinierte Zusammenwirken vieler verschiedener Faktoren, Zytokine und Zelltypen voraussetzen aktiviert (Kuhn und Goebel 1998).

So wird unmittelbar nach dem Eindringen in J774-Zellen das Hitzestressprotein HSP70 („heat-shock protein“) induziert (Schwan und Goebel 1994). Die Expression von HSP60 und HSP90 dagegen bleibt von der Infektion unbeeinflusst. Die Phagozytose des Bakteriums scheint hierbei eine notwendige Voraussetzung zu sein, da Cytochalasin D die Induktion hemmt (Kuhn 1998). Auch die anschließende Lyse des Phagosoms ist für die Induktion der Protein-Tyrosine Phosphatase (PTP) und des HSP90 unentbehrlich. Wie an infizierten Ratten gezeigt werden konnte werden auch $\gamma\delta$ -T-Zellen in dieser frühen Phase der Infektion rekrutiert (Kimura, Tomida et al. 1996).

Bei einem anderen Beispiel, der Infektion der murinen Makrophagen-ähnlichen Zelllinie P388D₁ mit *L. monocytogenes* und verschiedenen Deletionsmutanten, konnte eine schnelle Induktion von IL-1 α , IL-1 β , IL-6 und TNF- α mRNAs beobachtet werden, während abgetötete Listerien nur IL-1 β induzieren (Kuhn und Goebel 1994). Einhergehend mit der induzierten mRNA steigt, mit Ausnahme von IL-1 α , auch der Gehalt an den entsprechenden Proteinen. Vergleichbare Ergebnisse erhält man, bei Einsatz ahämolytischer Mutanten, ebenso mit aus dem Knochenmark stammenden Makrophagen. Überdies werden auch IL-10, IL-12 und der IL-1-Rezeptorantagonist in diesen Zellen induziert.

Das mutmaßliche Primärsignal bei Infektionen von Schleimhautoberflächen, Interleukin-8, wird in polarisierten humanen Zellen vor allem an der basolateralen Seite (unabhängig von TNF- α) induziert (Eckmann et al. 1993). Parallel kann durch die listeriellen Phospholipasen der DNA-bindende Transkriptionsfaktor NF- κ B induziert werden (Baeuerle 1991; Hauf et al. 1997). In intestinalen Epithelzellen führt auf Grund von NF- κ B gebildetes IL-15 dann zur Proliferation und INF- γ Produktion (Hirose et al. 1998). Dass transgene Maushepatocyten, deren NF- κ B-Aktivierung blockiert wurde, höchst empfänglich für listerielle Infektionen waren, unterstreicht dessen grundlegende Bedeutung, evtl. durch die Koordination der angeborenen Immunabwehr in der Leber, für systemische Infektionen (Lavon et al. 2000). Auch seitens infizierter Makrophagen produzierte - proinflammatorische Schlüsselzytokine der angeborenen Immunabwehr - TNF- α und IL-12 (neben IL-1 α/β), wirken synergistisch auf die INF- γ Ausschüttung von natürlichen Killerzellen (Dunn und North 1991; Tripp, Wolf et al. 1993; Demuth et al. 1996). INF- γ , das schließlich auch NK-unabhängig von CD8 α^+ dendritischen Zellen zur Verfügung gestellt werden kann (Ohteki et al. 1999), bewirkt dann zusammen mit TNF- α die vollständige Aktivierung (einschließlich „oxidativem burst“) der Makrophagen (Portnoy et al. 1989; de Chastellier und Berche 1994; Dai et al. 1997). Durch die von TNF- α und INF- γ induzierte CR3-Expression wird auch die komplementvermittelte Phagozytose über C3-CR3

Interaktion verstärkt (Drevets et al. 1996). Außerdem bewirkt INF- γ die Verstärkung der Antigenpräsentation durch Induktion von MHC I, TAP, MECL-1, PA28, LMP2 und LMP7 (Pamer und Cresswell 1998; Fruh und Yang 1999). Das erst kürzlich entdeckte Zytokin Eta-1 (Osteopontin) scheint dabei eine regulierende Funktion auf die Produktion von IL-12, IL-10 und INF- γ auszuüben (Ashkar et al. 2000).

Während die Menge der Zytokine zunimmt, versuchen die Bakterien dem durch die Verminderung der entsprechenden Rezeptoren TNF-Rezeptor I und INF- γ Rezeptor entgegenzuwirken (Demuth et al. 1996). Zudem wird durch Inhibition von MHC I und MHC II mRNAs versucht, die Immunantwort negativ zu beeinflussen (Schuller et al. 1998). Des Weiteren verkürzt MPA (**m**onocytosis **p**roducing **a**ctivity) aus virulenten Stämmen bei *Listeria*-resistenten Mäusen über einen labilen endogenen 38 kDa Faktor (EM) die Generationszeit der Monocytenvorläufer und die Halbwertszeit der Monocyten. MPA besteht aus anionischem Material ohne Aminosäuren oder Kohlenhydrate, ist mit der Plasmamembran assoziiert und besitzt ein MG von 1 kDa (Shum und Galsworthy 1982; Galsworthy 1990).

Weitere angeboren unspezifische Abwehrmechanismen wären: die komplementvermittelte Phagozytose über C1q (Alvarez-Dominguez et al. 1993), TNF α und β (Rothe et al. 1993), γ/δ -T-Zellen (Hiromatsu et al. 1992), deren Rolle z.Zt. kontrovers diskutiert wird (Egan und Carding 2000; Bregenholt et al. 2001; Ikebe et al. 2001), sowie die Neutrophilen die - neben den Makrophagen - eine bedeutende Rolle bei der Eliminierung von Listerien spielen, da diese ebenfalls zu deren Phagozytose befähigt sind (Conlan 1999). Die polymorphkernigen Neutrophilen sind mit 50-70% (Makrophagen < 7%) die im Blut am stärksten repräsentierten weißen Zellen, während die Makrophagen in größeren Mengen in den Geweben anzutreffen sind (Davey 1989).

Da es sich bei *L. monocytogenes* um ein intrazelluläres Bakterium handelt, nimmt man an, dass die humorale Immunantwort nur von untergeordneter Bedeutung ist (Bhunia 1997). Obwohl Antikörper gebildet werden, geht man davon aus, dass diese streng T-Zell-vermittelt erfolgt (Berche et al. 1987; Kaufmann 1993). Daher werden in Folge einer *L. monocytogenes*-Infektion vor allem Bruchstücke von P60, aber auch von *hly*- und *mpl*-Proteinen zusammen mit MHC I Molekülen (major histocompatibility complex class I) von Makrophagen bzw. dendritischen Zellen präsentiert, so dass cytotoxische T-Zellen (CD8⁺) mit passenden Rezeptoren daran binden und die Bekämpfung der im Inneren der Wirtszelle lokalisierten Pathogene einleiten (Pamer et al. 1991; Harty und Pamer 1995; Busch et al. 1997). Sekretierte Antigene haben gegenüber zytoplasmatischen Antigenen den Vorteil, dass sie bereits für die Präsentation zur Verfügung stehen, während das Bakterium noch intakt ist (Hess et al. 1996). Im Mausmodell können nur sezernierte Peptide die endogen prozessiert werden, CD8⁺-T-Zell vermittelte Immunität induzieren (Shen et al. 1998). Die Degradation im Proteosom ist dabei eine Voraussetzung, damit sezernierte Proteine über den klassischen MHC I Weg prozessiert und präsentiert werden (Sijts et al. 1996). Wie Experimente mit LLO-negativen Mutanten, die sich nicht aus dem Phagosom befreien können, zeigten, ist dabei jedoch nicht einmal notwendig, dass sich das Bakterium im Zytoplast aufhält (Zwickey und Potter 1999). Antigene werden TAP („transporter associated with antigen presentation“) abhängig oder unab-

hängig aus dem Zytosol in das ER transportiert; dort bindet das Dodekamer an MHC I Moleküle, um über den Golgi-Apparat und das Trans-Golgi Netzwerk an die Zelloberfläche transportiert zu werden (Townsend und Trowsdale 1993; Rock et al. 1994; Darji et al. 1997; Rolph und Kaufmann 2000). Die Effektivität der Antigenprozessierung und somit die Stärke der T-Zellantwort ist dabei von vielen Faktoren abhängig, wie der relativen Dichte eines Proteins an der Zelloberfläche (Bouwer und Hinrichs 1996) und der relativen Häufigkeit eines Epitops (im Verhältnis zur Zahl weiterer Peptidbruchstücke) (Vijh et al. 1998), der AS-Sequenz am N-Terminus, da P60 im Zytosol nach der N-Regel abgebaut wird (Sijts et al. 1997) und schließlich der Dissoziationskinetik (neben der Bindungskinetik) von MHC I Molekülen mit P60 Peptiden im ER (Sijts und Pamer 1997). Andererseits kommt es bei der Reifung der T-Zellen nicht zu einer Konkurrenz. Die gegen unterschiedliche Epitope gleichen Ursprungs spezifischen T-Zellpopulationen entwickeln sich parallel (Vijh et al. 1999).

Durch die Präsentation mit MHC I werden CD8⁺-T-Zellen induziert, wogegen über MHC II CD4⁺-T-Helferzellen TH1 oder TH2 induziert werden (Kaufmann 1993). Während TH1-Zellen durch die Ausschüttung von IL-2 und INF- γ Makrophagen aktivieren (zelluläre Immunantwort), lösen TH2-Zellen mittels IL-4 und IL-5 die Reifung der B-Zellen aus (humorale Immunantwort). Je nach Zytokinmilieu z.Zt. der Antigen-Präsentation induziert das mit MHC II exponierte Antigen eine TH1- oder TH2-Antwort. Dabei übt IL-12 auf TH1 und IL-4 auf TH2 einen positiven Einfluss aus. Inwieweit die lange Lebensdauer der Gedächtnis T-Lymphozyten eine für diese typische Eigenschaft darstellt oder durch die wiederholte Stimulation seitens kreuzreaktiver Antigene erfolgt, ist ungewiss (Ahmed und Gray 1996; Zinkernagel et al. 1996; Sprent 1997). Für LLO konnte gezeigt werden, dass es ein potentes Antigen sowohl für CD8⁺-T-Zellen, als auch für CD4⁺-TH-Zellen darstellt (Pamer et al. 1991; Safley et al. 1991; Pamer 1994).

Allerdings ist für eine vollständige T-Zell vermittelte Langzeitimmunität die Replikation der Bakterien im Zytosol unerlässlich (Brunt et al. 1990; Pamer 1993), was sich auch nicht durch einen hohen Gehalt an Bakterien kompensieren lässt (Berche et al. 1987). Vor allem MHC Ib (neben MHC Ia) restringierte CTL (cytotoxic lymphocytes) sollen dabei essentiell sein (Seaman et al. 2000). Durch die Übertragung LLO- und P60-spezifischer CD8⁺-T-Zellklone konnte die protektive Wirkung gegen *L. monocytogenes in vivo* transferriert werden (Harty et al. 1992; Harty und Pamer 1995). Die so erworbene Immunität ist nicht zu verwechseln mit der unspezifischen Resistenz, die durch einen Immunmodulator, wie z.B. abgetötete Zellen von *Bordetella pertussis*, ausgelöst wird (Hof et al. 1978). Diese kann wie die Hypersensitivität des verzögerten Typs („delayed-type hypersensitivity reaction“) nur durch Lyt123⁺-T-Zellen auf andere Mäuse übertragen werden (Mackaness 1969; Blanden und Langman 1972; Lane und Unanue 1972; Youdim et al. 1973; Kaufmann et al. 1979).

Bzgl. der Prozessierung nicht sekretierter listerieller Antigene werden mehrere INF- γ abhängige bzw. unabhängige Szenarien diskutiert. Neben der Möglichkeit, dass endogene Peptide im Phagosom abgetöteter Listerien mittels LLO (das auch noch nach deren Tod aktiv ist) in das Zytosol gelangen (vgl. hierzu auch Higgins et al. 1999), wäre auch das Abtöten ins Zytosol entkommener Bakterien durch Ubiquicidin denkbar (Hiemstra et al. 1999). Ein INF- γ unabhängiger Weg wäre eine von dendritischen Zellen vermit-

telte CD8⁺-T-Zell Antwort, bei der entweder die Neutrophilen Antigene endogener Pathogene apoptotischer Zellen präsentieren (Albert et al. 1998), oder die dendritischen Zellen diese selbst, durch die Phagozytose von Listerien, die nach der Listerien-induzierten Apoptose von Hepatocysten für diese zugänglich wurden, erwerben (Tvinnereim und Harty 2000).

Wahrscheinlich wird die schutzvermittelnde Wirkung der MHC Klasse I restringierten T-Zellen noch durch Kreuzpräsentation MHC II restringierte T-Helfer-Zellen (Th-Zellen) verstärkt (Bennett et al. 1997). MHC-Klasse II-präsentierte Peptide werden zwar hauptsächlich nach der Endozytose durch saure Proteolyse im Endosom generiert (Germain 1994). Doch trotz der frühzeitigen Flucht aus dem Phagosom und den oben erwähnten Schutzmechanismen gegen den oxidativen Burst, als auch der intrazellulären Lebensweise, ist in vielerlei Hinsicht Kontakt mit extrazellulären listeriellen Peptiden denkbar. So z.B. in Folge der Sekretion bakterieller Proteine, sowie der Lyse vieler Keime, vor der Invasion und nach Phagozytose.

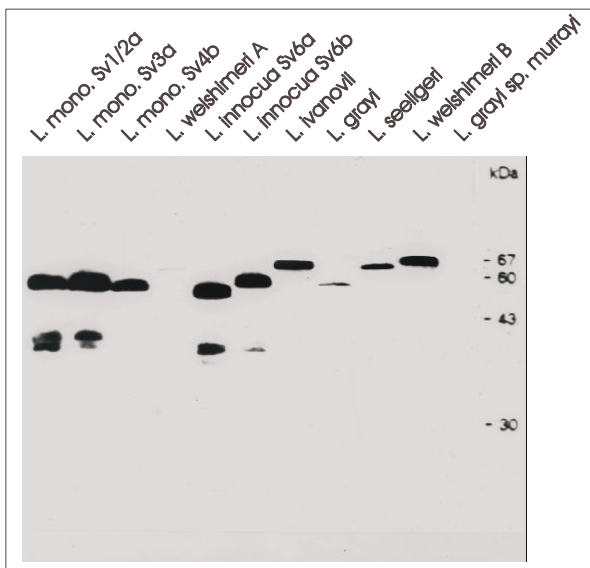


Abb. 4: Kreuzreaktive Bereiche verschiedener *Listeria*-Spezies. Western-Blot: Antiserum (1:500) α -*L. monocytogenes* Sv1/2a-P60.

Als das stärkste bekannte B-Zell- und T-Zell-Antigen, induziert P60 - auch bei gesunden Personen - einen hohen Titer an α -P60 Antikörpern (Gentschev et al. 1992; Pamer 1994; Harty und Pamer 1995; Kolb-Maurer et al. 2001). Diese Beobachtung, sowie die Feststellung, dass die P60-Proteine der verschiedenen *Listeria*-Spezies Kreuzreaktive Bereiche besitzen (Abb. 4), legt die Vermutung nahe, dass ein häufiger Kontakt mit apathogenen Spezies (insbesondere *L. innocua*) vor einer Infektion mit *L. monocytogenes* schützen könnte.

Attenuierte Listerien ($\Delta actA$), die im Wirtszellzytosol aktiv replizieren können sind attraktive Vektoren für spezifische immunogene Epitope anderer pathogener Mikroorganismen, da sie einen Langzeitschutz induzieren können (Goossens et al. 1995; Dietrich et al. 1998). Ein Vorteil gegenüber Gram-negativen Carrier-Bakterien ist das Fehlen von LPS und die Möglichkeit zur Präsentation sekretierter Peptide in Kombination mit LLO (Hess et al. 1996; Hess et al. 2000). Auch eine bereits bestehende Immunität gegenüber *L. monocytogenes* bzw. anderen Epitopen des einzusetzenden Antigens wirkt sich nicht störend aus (Bouwer et al. 1999; Vijn et al. 1999). Diese Vorteile sprechen für die Vakzination mit Hilfe von listeriellen Lebendimpfstoffen gegenüber alternativen Methoden wie dem Einsatz herkömmlicher Vakzine oder von Genpistolen (Fensterle et al. 1999).

2.7. Detektion

Den ersten Schritt beim Nachweis von Listerien stellt deren Anreicherung in geeigneten Nährmedien dar. Die hierfür gebräuchlichsten Medien wurden von Farber und Peterkin zusammengefasst (Farber und Peterkin 1991). Mit Hilfe von Despierres Agar (Golden et al. 1988) oder PSU-Medium (Suh und Knabel 2001) lassen sich hitzegeschwächte Listerien, deren Wachstum sonst (z.B. in modifiziertem Oxford Agar) gehemmt werden würde (Kang und Fung 1999), besser rekonstituieren. Während in Europa bevorzugt PALCAM-Agar (van Netten et al. 1989) eingesetzt wird, verwendet man in Nordamerika hauptsächlich LPM und Oxford Medien.

In gewöhnlich sterilen klinischen Isolaten aus Blut, Fruchtwasser und Gehirnflüssigkeit liegt *L. monocytogenes* angereichert vor (Swaminathan et al. 1988), so dass bereits durch Ausplattieren festgestellt werden kann, ob Listerien enthalten sind. Bei Isolaten aus Umwelt oder Nahrungsmitteln steht man vor dem Problem der Kontamination mit anderen Keimen. Zur selektiven Anreicherung machte man sich daher früher ihre Fähigkeit, selbst bei noch relativ niedrigen Temperaturen wachsen zu können, zu Nutze (Gray et al. 1948). Wegen des hohen Zeitaufwands von 3-4 Wochen (Hayes et al. 1986) und der Gefahr, dass andere Bakterien die Listerien überwachsen könnten, ging man dazu über, nach anderen Mitteln zu suchen. Durch den Einsatz selektiver Agentien wird versucht, das Wachstum anderer Spezies zu hemmen und gleichzeitig das von *L. monocytogenes* spezifisch zu fördern (Klinger 1988; Schuchat et al. 1991). LMBA („*Listeria monocytogenes* blood agar“) z.B. baut auf trypsinisiertem Sojamedium auf, dem 5% Schafblut, sowie als selektive Agentien Lithiumchlorid (10 g/l), Polymyxin B Sulfat (10 mg/l) und Ceftazidime (20 mg/l) zugegeben wurden (Johansson 1998). Es soll eine deutlich höhere Sensitivität für *L. monocytogenes* als die üblicherweise verwendeten PALCAM und Oxford Medien vorweisen. Neueren Studien zu Folge soll auch ALOA-Medium zur Anreicherung von *L. monocytogenes* besser geeignet sein, als die allgemein gebräuchlichen Selektionsmedien (Maemynck et al. 2000).

Jedoch bergen auch selektive Ausplattierungsmethoden die Gefahr falsch negativer Ergebnisse, wenn gleichzeitig hohe Zahlen an *L. innocua* vorhanden sind, da beim Auszählen die großen *L. innocua* Kolonien einzelne kleine *L. monocytogenes* Kolonien überdecken können (Beumer et al. 1997; Scotter et al. 2001).

Im Anschluss an die Anreicherung ist daher zumeist die genauere Charakterisierung anhand biochemischer Unterscheidungsmerkmale erforderlich (vgl. 2.2.). Da die biochemischen Eigenschaften einzelner Isolate stark voneinander Abweichen können (z.B. unterschiedliche Hämolysefähigkeit bzw. Identifizierung pathogener Katalase-negativer Stämme (Bubert et al. 1997)), werden alternativ auch neue Techniken eingesetzt, die kürzere Detektionszeiten und zuverlässigere Resultate versprechen. Dabei muss neben der Forderung nach höchstmöglicher Spezifität und Sensibilität auch auf die unkomplizierte Durchführbarkeit des Tests Wert gelegt werden. Daher scheiden Zellkulturassays (Bhunja et al. 1994; Caron et al. 1994), als einfache Schnellnachweissysteme aus, da sie ein gut ausgerüstetes Labor voraussetzen. Das gilt auch für Verfahren, die auf Durchflusszytometrie (Donnelly et al. 1988), Infrarotspektroskopie (Holt et al. 1995), radioaktiver Markierung (Wang et al. 1991), Analysen von Restriktionsfragment-Längenpolymorphismen (Harvey und Gilmour 1994; Comi et al. 1997) oder Pulsgelelektrophorese

(Harvey und Gilmour 2001) aufbauen. Durchsetzen konnte sich dagegen (A. Bubert persönliche Mitteilungen) die kommerziell erhältlichen Gattungs- („Pathalert *Listeria*“) bzw. Speziespezifischen („Pathalert *L. monocytogenes*“) ELISA-Kits der Merck KGaA, Darmstadt, die von unserem Institut mit entwickelt wurden (Bubert et al. 1994). Im Gegensatz zu anderen immunologischen Systemen (Mattingly et al. 1988; Siragusa und Johnson 1990) zeigen sie keine Kreuzreaktivität mit anderen Spezies und erlauben auch die Differenzierung gegenüber *L. innocua* (mit „Pathalert *L. monocytogenes*“).

Neben immunologischen Methoden verspricht der Einsatz DNA-basierter Sonden, die mit Hilfe der PCR zu einer vielfachen Amplifikation des Gens führen, eine Verbesserung der Detektion. Das *iap*-Gen hat dabei gegenüber *hly* (Mengaud et al. 1988) oder *ImaA* den Vorteil, als essentielles listerielles „House-keeping-Gen“ mit seinen konservierten Bereichen in allen Listerien vorhanden zu sein und Dank der speziespezifischen variablen Genbereiche - selbst in einer einzigen Multiplex-PCR-Reaktion - alle einzelnen Arten diskriminieren zu können (Bubert et al. 1992). Sogar die Unterscheidung zwischen einzelnen Serotypen ist mit *iap*-Primern möglich (Saito et al. 1998).

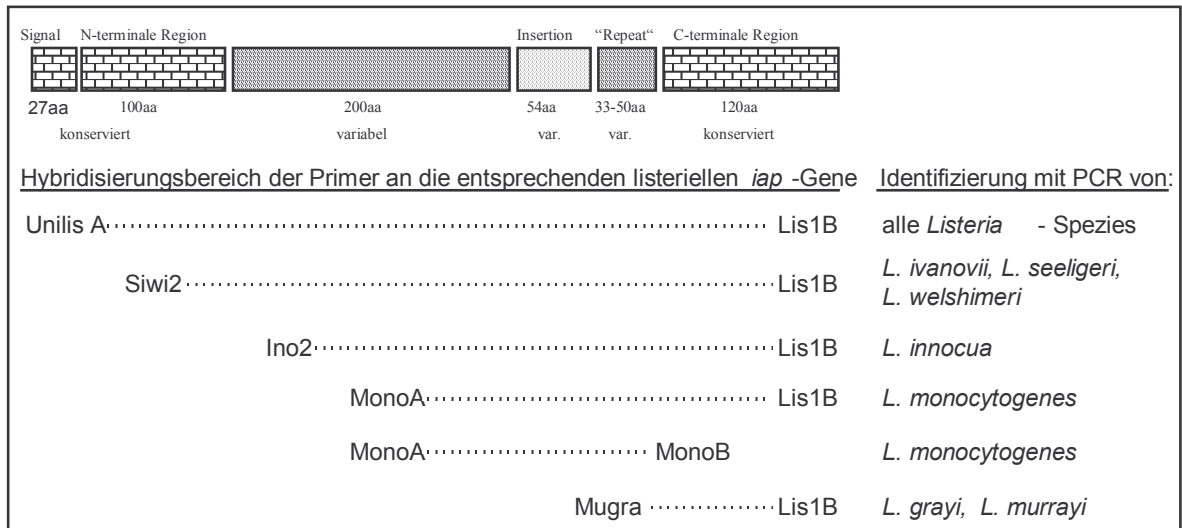


Abb.

5: Primerkombinationen für gattungs- und speziespezifischen PCR-Nachweis von Listerien

Der PCR-Nachweis lässt sich noch durch die Probenaufarbeitung mit Hilfe von Dynabeads (Uyttendaele et al. 2000) oder die enzymatisch verstärkte Detektion in gecoateten Mikrotiterplatten nach spezifischer Hybridisierung des Digoxigenin-markierten PCR Produktes (Cocolin et al. 1997) optimieren.

2.8. Zielsetzung dieser Arbeit

Diese Arbeit soll zum einen durch die Identifikation möglicher Targets und die Verbesserung von Verfahrensabläufen bzw. Methoden die immunologische bzw. molekularbiologische Detektion von *L. monocytogenes* optimieren helfen. Ein zweiter Aspekt dieser Arbeit versucht die Frage zu klären, ob *L. innocua* als nicht pathogenes Umweltbakterium einen Beitrag zur Induktion bzw. den Erhalt der Immunität gg. *L. monocytogenes* leistet. Schließlich solle die *in vitro*-Transkription der Promotoren des Virulenzgenclusters in Hinblick auf ihre Abhängigkeit von der PrfA-Konzentration, der Fraktion und den Anzuchtbedingungen im Zuge der RNAP-Aufbereitung untersucht werden.

3.

Material

3.1. Bakterienstämme

Nr.:	Spezies :	Stamm :	Serotyp :
1.	<i>L. monocytogenes</i> EGD	NCTC 7973	1/2 a
2.	<i>L. monocytogenes</i>	SLCC 2755	1/2 b
3.	<i>L. monocytogenes</i>	NCTC 5348	1/2 c
4.	<i>L. monocytogenes</i>	NCTC 5105	3 a
5.	<i>L. monocytogenes</i>	SLCC 5543	3 b
6.	<i>L. monocytogenes</i>	SLCC 2479	3 c
7.	<i>L. monocytogenes</i>	L 99	4 a
8.	<i>L. monocytogenes</i>	SLCC 4561	4 ab
9.	<i>L. monocytogenes</i>	SLCC 4013	4 b
10.	<i>L. monocytogenes</i>	ATCC 19116	4 c
11.	<i>L. monocytogenes</i>	ATCC 19117	4 d
12.	<i>L. monocytogenes</i>	ATCC 19118	4 e
13.	<i>L. monocytogenes</i>	SLCC 2482	7
14.	<i>L. ivanovii</i>		
15.	<i>L. seeligeri</i>		
16.	<i>L. welshimeri</i>		
17.	<i>L. innocua</i>	NCTC 11288	6 a
18.	<i>L. grayi</i> ssp. <i>murrayi</i>		
19.	<i>L. grayi</i>		
22.	<i>Escherichia coli</i>		
23.	<i>L. innocua</i>		6 b
24.	<i>L. monocytogenes</i> EGD +P60 Überproduzent	5 µg/ml EM + CM	Nr.: 178 MG
25.	<i>L. monocytogenes</i> Δ <i>prfA</i>	A42	B. Middendorf
31.	<i>L. monocytogenes</i> (EGD) Δ <i>actA</i> (in frame)		AB: 215
30.	<i>E. coli</i> JM 109 (für komp. Zellen)		MG
32.	DH10b <i>E. coli</i> (für komp. Zellen)	MgSO ₄	

Legende:

NCTC : **N**ational **C**ollection of **T**ype **C**ulture, London, UK

ATCC : **A**merican **T**ype **C**ulture **C**ollection (Rockville, Md.)

SLCC : "**S**pecial **L**isteria **C**ulture **C**ollection" des Instituts für Hygiene und Mikrobiologie in Würzburg

L 99 : nach T. Chakraborty (Gießen)

EM: Erythromycin, CM = Chloramphenicol

Alle verwendeten Listerienstämme wurden der institutseigenen Stammsammlung entnommen.

3.2. Versuchstiere

3.2.1. Legehühner

Acht legereife Junghühner (21 Wochen alt) der Rasse Rhodeländer-Hybride (rot), Arokanerhahn x Blausperberhenne (grün) bzw. Lohmann selected Leghorn (Lsl; weiß) aus der Landes-Kleintierzuchtanlage Ochsenfurt, Deutschland.

3.2.2. Mäuse

Sechs bis acht Wochen alte weibliche BALB/cOlaHsd (H-2^d), C57BL/6J (H-2^b) bzw. C3H/HeNHsd (H-2^k) Mäuse wurden von Harlan-Winkelmann, Borcheln, Deutschland bezogen und nach Standardbedingungen behandelt. Lediglich für Infektionsversuche wurden die Mäuse in einer Laminar-Flow-Box keimfrei gehalten.

3.3. Peptide für die Immunisierung

Die zur Immunisierung verwendeten Peptide aus *L. innocua* wurden durch die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. D. Palm (Physiologische Chemie I, TBI für Biowissenschaften, Würzburg), in Anlehnung an das Protokoll von TentaGel® MAP, mit einem Lysin-"Baum" synthetisiert. Allerdings wurde auf die POE-beads verzichtet:

Nr.:	Sequenz: N -> C-Terminus	Name	AS	Anmerkung
1.	TEQQTTTKAPTQ	INO A	12	„Lysinweig“
2.	GQKPAIKQPTKT	INO B	12	„Lysinweig“
3.	TSTPVVKQEVKK	INO C	12	„Lysinweig“
4.	PAIKQPTKTVAPK	INO D	13	„Lysinweig“
5.	TNNNTNASTPSKN	INO E	13	„Lysinweig“

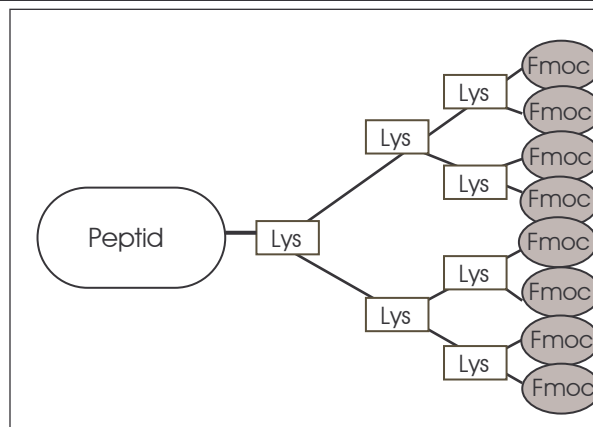


Abb. 6: Schematische Darstellung der Lysinverästelung (Lys) eines gekoppelten Peptides

3.4. Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide stammten von der Firma MWG BIOTECH GmbH. Alle Sequenzen sind in 5' -> 3'-Richtung dargestellt. Abweichungen von der Originalsequenz sind durch Fettdruck hervorgehoben, und die eingeführten Schnittstellen sind unterstrichen. Bezugssequenzen (falls nicht anders angegeben): *prfA*: (Leimeister-Wachter et al. 1990); *hly*: (Mengaud et al. 1989); *inIA*: (Gaillard et al. 1991); *actA*: (Vazquez-Boland et al. 1992); *iap*: (Kohler et al. 1990).

3.4.1. Oligonukleotide zu Reverse Dot-Blot und PCR-Primer

Nr:	Art.-Nr.:	Name:	Position:	Orient. ¹	b ²	Basensequenz (5' → 3'):
0	M 850	Siwi 2	212-237	I	20	TAA CTG AGG TAG CGA GCG AA
1	M 851	Mugra 1	1066-1086	I	21	CCA GCA GTT TCT AAA CCT GCT
2	M 852	Mono A	736-756	I	21	CAA ACT GCT AAC ACA GCT ACT
3	M 853	Mono B	1086-1106	C	21	GCA CTT GAA TTG CTG TTA TTG
4	M 854	Lis 1B	1434-1454	C	21	TTA TAC GCG ACC GAA GCC AAC
4 B	M 857	Biolis 1B	1434-1454	C	21	w. o. -biotinyliert
5	M 855	Unilis A	28-47	I	20	GCT ACA GCT GGG ATT GCG GT
6	M 856	Ino 2	433-457	I	22	ACT AGC ACT CCA GTT GIT AAA C

¹ Orient.: = Orientierung; C: (Complement) komplementär zu; I: Identisch mit kodierender Sequenz

² b: Anzahl der Basen

Fangsonde Mono A: CAAACTGCTAACACAGCTACT

3.4.2. Oligonukleotide zur Herstellung von DNA-Sonden für Footprint

<i>hly</i> -Promotor (109 bp):		
BM1	¹²⁷⁵ TCCAT <u>TCTAGA</u> AGTGACTTTTATGTT ¹³⁰⁰	XbaI-Schnittstelle
BM2	¹³⁹⁵ GCTTCT <u>TCTAGA</u> TGAAACGCAATATTA ¹³⁷⁰	XbaI-Schnittstelle
<i>actA</i> -Promotor (97 bp):		
CD1	²² GATGCTT <u>TCTAGA</u> AAAAGTTGCTGAAGC ⁴	XbaI-Schnittstelle
B- <i>actA</i>	entspricht CD1 mit biotinyliertem 5'-Ende	XbaI-Schnittstelle
CD2	⁹² TATT <u>TCTAGA</u> ATTATTTAAGAATATCA ⁶⁵	XbaI-Schnittstelle

3.4.3. Oligonukleotide zur Herstellung der Plasmide für *in vitro*-Transkriptionsassays

<i>actA</i>
5'- GAAGAGAATTCAAAAAAGTTGCTGA-3'
5'-CTCCCTCCTCTAGATACGGTAA-3'
<i>iap</i>
5'-ACAGAATCTTACAAATAGTTGGT-3'
5'-ATCCCAGCTCTAGACGCGATA-3'

3.4.4. Radioaktive Markierung der DNA-Sonden

1 x STE	Tris-HCl (pH 7,5) NaCl EDTA (pH 8,0)	20 mM 100 mM 10 mM
Markierungsansatz:	10 x One-Phor-All-Buffer (Pharmacia) 2 mM dNTPs (bis auf radioaktives) [α - ³² P]dATP / [α - ³² P]dCTP (10 μ Ci) Klenow-Enzym (1 U/ μ l) H ₂ O _{dest}	2 μ l je 1 μ l je 1 μ l 2 μ l ad 20 μ l
Bindungsansatz: (in Pipettier- Reihenfolge)	H ₂ O _{dest} 5 x Bindungspuffer MgSO ₄ BSA (15 ng/ μ l) Poly (dI-dC) (1 μ g/ μ l) gereinigtes Protein [³² P]-markierte DNA-Sonde ev. Proteinextrakte	ad 15 μ l 3 μ l 5 mM 1 μ l 1 μ l 10-500 ng 140000 cpm 2-15 μ l

3.4.5. Radionukleotide

Alle radioaktiv markierten (P32- α -) Ribonukleotide wurden bei ICN (oder Amersham) bestellt.

rNTP	Bestellnummer ICN:
³² P α -ATP ICN (600 Ci)	32014H.2
³² P α -CTP ICN (600 Ci)	32015H.2
³² P α -GTP ICN (600 Ci)	32010H.2
³² P α -UTP ICN (600 Ci)	39313X.2

3.5. verwendete Kits

ABI PRISM™ Dye Terminator Cycle Sequencing Kit
(PERKIN ELMER)
Quantum Plasmid-Miniprep Kit (BioRad)
QIA quick PCR Purification Kit (QIAGEN)
NucTrap™-Säule (Stratagen)

GeneClean Kits (Bio 101 Inc.)
Jetprep Miniprep Kit (Genomed)
Nucleobond AX100-Kit (Macherey-Nagel)
Qiafilter Plasmid Midi Kit (Qiagen)

3.6. Puffer und Lösungen:

3.6.1. Standardpuffer

Anodenpuffer I	25 mM Tris-HCl, pH 10,4 20% (v/v) Methanol	3,05 g/l oder 250 ml 100 mM Tris ad 1l		
Anodenpuffer II	300 mM Tris-HCl, pH 10,4 20% (v/v) Methanol	36,3 g/l		
Bindungspuffer (Tris-Cl- Bindungspuffer): (ad 10 ml H ₂ O 1,248 ml)	1 m Tris pH 8,0 1 M MgCl ₂ 1 M Ca Cl ₂ 0,5 M DTT 1 M KCl Glyzerin	50 mM 50 mM 25 mM 1 mM 250 mM 50%	0,5 ml 0,5 ml 0,25 ml 2 µl 2,5 ml 5 ml	
Blaupuffer (Farb- puffer) für Bands- hiff (1 ml)	Glyzerin Bromphenolblau HEPES	10 mM 0,01% 10 mM	73 ml 0,1 mg 10 µl	
Hybridisierungs- puffer	Blockierungsreagens + N-Laurylsarcosin + Heringssperma DNA fr. denat. 20 Minuten bei 100°C 5 Minuten bei 90°C gekocht- noch heiß hinzupipettieren		2% in 2xSSC 0,5% 10 mg/ml	
Kalium- Phosphatpuffer 1 l Präparation von 0,1 M Kali- um-Phosphat- puffer bei 25°	pH	Vol. 1 M K ₂ HPO ₄ (in ml)	Vol. 1 M KH ₂ PO ₄ (in ml)	
	5,8	8,5	91,5	
	6,0	13,2	86,8	
	6,2	19,2	80,8	
	6,4	27,8	72,2	
	6,6	38,1	61,9	
	6,8	49,7	50,3	
	7,0	61,5	38,5	
	7,2	71,7	28,3	
	7,4	80,2	19,8	
	7,6	86,6	13,4	
	7,8	90,8	9,2	
	8,0	94,0	6,0	
Kaliumcacody- lat Puffer	Kaliumcacodylat Tris-HCl BSA Kobaltchlorid dTTP	200 mM 25 mM 250 mg/ml 1,2 mM-1,5 mM	pH = 6,6 bei 25°C	
Kathodenpuf- fer:	25 mM Tris-HCl, 40 mM ε-Amino-n-Caprinsäure 20% (v/v) Methanol	3,05 g/l oder 250 ml Transferpuffer 2 ad 1l pH 9,4		
Laemmli- Probenpuffer 5 x (AB-DA)	Na ₂ EDTA: 0,41 g NaH ₂ PO ₄ x 2 H ₂ O: 0,15 g SDS: 1,1 g 2-Mercaptoethanol: 1,1 ml (1:1 ad 10 ml mit H ₂ O) Bromphenolblau in 50% Glyzerin: 0,2%	Puffer Puffer Detergens zum Denaturieren pH 7,2 einstellen und dann ad 10 ml Die hohe spezifische Dichte des Glyzerins hindert die Probe daran, aus den Taschen nach oben hin herauszudiffundieren.		
Laemmli- Probenpuffer (MG) 2x	Tris 1 M Glyzerin 86% SDS 10%-ig 2-Mercaptoethanol dd H ₂ O Bromphenolblau 1%	100 mM 10% 2% 0,4 mM 0,05%	1 ml 1,16 ml 2 ml 0,5 ml (5),3 ml 5,0 mg	(= pH 6.8) als Puffer hohe spezifische Dichte Detergens zum Denaturieren (5%) uv. 0,3 ml/verd. 5,3 ml Farbstoff
Laemmli- Probenpuffer (Mio) 4x	Tris 2 M Glyzerin 86% SDS Pulver 2-Mercaptoethanol dd H ₂ O Bromphenolblau 1%	400 mM 40% 8% 1,6 mM 0,2%	2 ml 4,64 ml 0,8 g 2 ml 0,54 ml 20 mg	(= pH 6.8) als Puffer hohe spezifische Dichte Detergens zum Denaturieren Farbstoff zum Sichtbarmachen der Pro- be und als Indikator der Laufmittelfront.

Lysepuffer	Tris-HCl, pH 8,0 EDTA SDS Proteinase P	10,0 mM 1,0 mM 1% 500 µg/ml	
Natrium-Phosphatpuffer 1 l Präparation von 0,1 M Natrium- Phosphatpuffer bei 25°C (1 M)	pH 5,8 6,0 6,2 6,4 6,6 6,8 7,0 7,2 7,4 7,6 7,8 8,0	Vol. 1 M Na ₂ HPO ₄ (in ml) 7,9 12,0 17,8 25,5 35,2 46,3 57,7 68,4 77,4 84,5 89,6 93,2	Vol. 1 M NaH ₂ PO ₄ (in ml) 92,1 88,0 82,2 74,5 64,8 53,7 42,3 31,6 22,6 15,5 10,4 6,8
PBS 10 x	NaCl 80 g KCl 2 g Na ₂ HPO ₄ : 11,5 g KH ₂ PO ₄ : 2 g	0,02 M Na ₂ HPO ₄ 0,02 M NaH ₂ PO ₄ 0,15 NaCl ad 1 l mit H ₂ O _{dest}	Lsg. A: 2.74 g NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O + 8.7 g NaCl (ad 100 ml) Lsg. B: 3.54 g Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O + 8.7 g NaCl (ad 1 l) Lsg. B mit Lsg. A auf pH 7,6 einstellen.
Phosphat-Citrat	0,1 M NaH ₂ PO ₄ mit Citrat auf pH = 3,0 einstellen		
Proteineluationspuffer	10 x ansetzen 25 mM Tris 132 mM Glycin max. 0,025% SDS		für 1 l Stammlösung (10 x) 30,275 g 144,1 g 25 ml (10% -ig)
Puffer A	0,01 M Kaliumphosphatpuffer 0,1 M NaCl		7,17 ml K ₂ HPO ₄ + 2,83 ml KH ₂ PO ₄ pH = 7,2; ad 1 l
SSC 20 x	3 M NaCl 0,3 M Trinatriumcitrat pH 7,0 H ₂ O _{dest}		175,3 g 88,2 g ad 1000 ml
SDS-PAGE Laufpuffer:	10 x ansetzen (für ÜN) / l 144 g Glycin 30 g Tris 10 g SDS		5 x TURBO (für schnelleren Lauf) / l 144 g Glycin 30 g Tris 5 g SDS
STE	0,1 M NaCl, 10 mM Tris - Cl (pH 8,0) 1 mM EDTA (pH 8,0) (auch TEN genannt)		
STET	0,1 M NaCl, 10 mM Tris - Cl (pH 8,0) 1 mM EDTA (pH 8,0) + 5% Triton X-100		
Stoppuffer 10 x	EDTA: Glycerin: Bromphenolblau: Xylencyanol:		100 mM 30% 0,05% 0,05%
Strippingpuffer	Tris-HCl: 2-Mercapto-EtOH: SDS:	62,5 mM 100 mM / 2%	pH = 6,8 (= 7 ml/l)
TAE (50 x)	Tris Essigsäure 0,5 M EDTA	242 g/l 51,7 ml 100 ml	ad 1 l mit H ₂ O _{dest} pH=8,0
TBE (10 x)	Tris Borsäure EDTA (Autoklavieren)	108 g/l 55 g/l; 7,45 g/l	890 mM 890 mM 20 mM
TBS (1 x)	Tris NaCl KCl	6,1 g/l ; pH = 7,0 8,0 g/l 0,2 g/l	T-TBS (1 x) wie TBS + 0,05% Tween²⁰ (0,5 ml ad 1 l)
TE	pH 7,4 10 mM Tris - Cl (pH 7,4) 1 mM EDTA (pH 8,0)		pH 7,6 10 mM Tris - Cl (pH 7,6) 1 mM EDTA (pH 8,0)
TNT	10 mM Tris - Cl (pH 8,0), 150 mM NaCl, 0,05% Tween ²⁰		
Transformationsmedium	A: LB-Medium 10,0 mM MgSO ₄ 0,2% Glucose		B: LB-Medium 10,0 mM MgSO ₄ 36% Glycerin 12% PEG (MW 7500)

3.6.2. Puffer für die Gewinnung der Proteinextrakte (RNA-Pol)

TBP₅₀ /Tris-Cl-Bindungspuffer bzw. Dialysepuffer (2 x 3 l) :							
Stammisg.	TBP ₅₀	10 ml	1 l	2 l	3 l	6 l	115 x
1 m Tris pH 8,0	10 mM	0,1 ml	10 ml	20 ml	30 ml	60 ml	50 ml
1 M MgCl ₂	10 mM	0,1 ml	10 ml	20 ml	30 ml	60 ml	50 ml
1 M CaCl ₂	5 mM	50 µl	5 ml	10 ml	15 ml	30 ml	25 ml
0,5 M EDTA	1 mM	20 µl	2 ml	4 ml	6 ml	12 ml	10 ml
1 M DTT	0,2 mM	2 µl	0,2 ml	0,4 ml	0,6 ml	1,2 ml	1 ml
1 M KCl	50 mM	0,5 ml	50 ml	100 ml	150 ml	300 ml	250 ml
Glycerin	10%	1 ml	100 ml	200 ml	300ml	600 ml	500 ml
H ₂ O		8,228 ml	822,8 ml	1,646 l	2,47 l	4,94 l	114 ml

Wasch- und Eluationspuffer				
	TWP ₃₀₀	1 l	TEP ₁₀₀₀	1 l
1 m Tris pH 8,0	10 mM	10 ml	10 mM	10 ml
1 M MgCl ₂	10 mM	10 ml	10 mM	10 ml
1 M CaCl ₂	5 mM	5 ml	5 mM	5 ml
0,5 M EDTA	1 mM	2 ml	1 mM	2 ml
1 M DTT	0,2 mM	0,2 ml	0,2 mM	0,2 ml
2 M KCl	300 mM	150 ml	1 M	500 ml
Glycerin	10%	100 ml	10%	100 ml
H ₂ O		722,8 ml		372,8 ml

Puffer A	Firma	100 ml	
1 M HEPES	Serva	1 ml	pH 7,9 mit NaOH einstellen
1 M KCl		1 ml	
0,5 M EDTA		20 µl	pH 8,0
0,5 M EGTA	S30	20 µl	pH 8,0 (Ethylenglycol-bis-(Aminoethylether) N,N'-Tertraessigsäure)
1 mM DTT	Roth	20 µl	(Stamm 0,5 M) Dithiothreitol oder -erythrit
0,5 mM PMSF	Sigma	50 µl	(Stamm 0,1M) Phenylmethansulfonylfluorid genereller Inhibitor von Serinproteasen (Trypsin, Chymotrypsin, Thrombin) und die Cysteinprotease Papain, instabil in wässriger Lsg. (t _{1/2} =1h) daher bei jedem Schritt frisch zufügen, gut lösl. in Isopropanol/MeOH + EtOH
jeweils frisch zugeben:			

3.6.3. Blockpuffer

Verschiedene Blockreagenzien (Heringssperma DNA, ELISA-Blockpuffer A, Event Blockreagens, BSA, Casein aufgereinigte Fraktion, Puffer mit Denhardt Lösung **und Blockpuffer B mit boehringschem Blockreagens**)

Blockreagens A	Anmerkung	Menge:
2xSSC		
SDS	0,1%	
EDTA	1 mM	
5 x Deinhardt's Lösung	100 x Deinhardt's Lösung:	2 g Ficoll
Polyvinylpyrrolidon		2 g
BSA	ad 100 ml H ₂ O	2 g
Heringssperma DNA	Sigma fr. denat. 20 Minuten bei 100°C	100 mg/ml
5 Minuten bei 90°C gekocht	auf Eis stellen	

Blockpuffer B	Firma	Best.-Nr.:	Menge:
Blockierungsreagens	Boeinger Mannheim	1096176	2% in 2xSSC
N-Laurylsarcosin	Fluka	61744	0,5%
Heringssperma DNA	Sigma fr. denat. 20 Minuten bei 100°C		10 mg/ml
5 Minuten bei 90°C gekocht	- noch heiß .zupipettieren		

Blockreagens C	Anmerkung: (Urdea et al. 1988)	Menge:
4xSSC	1xSSC = 0,15 M NaCl, 0,01 M Natriumcitrat	pH = 7)
SDS	0,1%	
BSA	ad 100 ml H ₂ O	1 g
Heringssperma DNA	mit polyA fünf Minuten im Ultraschall	1 mg/ml
mit 10 atto-pmol Oligo / eine Stunde bei 55°C im Wasserbad (Parafilm)		20 µl

Hybridisierungspuffer incl. Block	
Blockierungsreagens	0,5 - 1%
SSC	5 x
Tween ²⁰ oder SDS	0,1/0,02%

Zu der frisch angesetzten Lösung wird Blocking Reagenz zugeben und für eine Stunde bei ca. 70°C unter ständigem Rühren erhitzt. (Anm.: Die Flüssigkeit wird dabei nicht klar.)

3.6.4. Lösungen

3.6.4.1. Lösungen für das EPITOP-mapping

Derivatisierungslösung	5 ml	10 ml
0,2 M F-moc- α -Ala oder Fmoc-Ala-OPfp (in DMF)	311/447 mg	623/895 mg
bzw. für lösliche Peptide 0,2 M Fmoc-Pro-OPfp	503,5 mg	1007 mg
0,24 M DIC	186 µl	372 µl
0,4 M HOBT in NMI	159 µl	318 µl

Lösung für das Spotten des Grundmusters		
0,3 M F-moc- β -Ala	134 mg/ml	} Aktivierungscocktail
bzw. 0,5 M F-moc-Lys (Boc)-OH	234,3 mg/ml	
0,36 M DIC	56 µl	
0,45 M HOBT in NMP	61 mg/ml	

Lösungen zum Abspalten löslicher Peptide:		
HCl in Methanol/Wasser 1:1	0,1%	
Phosphat-Citrat Puffer	0,1 M	pH = 3,0
Phosphatpuffer	0,1 M	pH = 7,0 für 3 h

Luminollösung	Firma	Best.-Nr.:
Lösg. A.: 22,5 mg Luminol (3-Aminophthalhydrazid) in 0,5 ml DMSO lösen.	Fluka	09253
+ 50 ml 0,1 M Tris-HCl pH 8,5		
+ 220 µl 90 mM trans-p-Hydroxizimtsäure in DMSO	Fluka	56670
Lösg. B: 0,02% H ₂ O ₂ Lösg. (33 µl 30% - ige) in 50 ml 0,1 M Tris-HCl pH 8,5		
Unmittelbar vor der Detektion werden Lösung A und Lösung B im Verhältnis 1:1 vermischt und sofort auf den Filter geben.		

3.6.4.2. Standardlösungen

3.6.4.2.1. SDS-PAGE (Protein-Gel)

1. Trenngel in ml (pH = 8,8)				2. Sammelgel in ml (pH = 6,8)			
1 x dünn	1 x = 50 ml	3 x = 150 ml	4 x = 200 ml		1 x dünn	1 x = 20 ml	4 x = 78 ml
4,12	9,24	27,3	37	H ₂ O _{dest}	7,35	14,7	58,8
11,5	21	62,25	84	30% Acrylamid	1	2	8
9,5	18,95	56	75,8	Tris-HCl 1 M	1,25	2,5	10
0,25	0,5	1,5	2	10% SDS	0,1	0,2	0,8
0,097	0,195	0,575	0,78	APS 10%	0,064	0,128	0,512
0,025	0,05	0,15	0,2	TEMED	0,01	0,02	0,08

Acrylamidlösung: 40 g Acrylamid mit 0,2 g Bisacrylamid ad 100 ml H₂O; APS: Ammoniumperoxodisulfat: 0,1 g/1ml frisch

1 x PAGE	Konzentration	Anmerkung
Tris	6 g	
Glycin	28,8 g	
SDS	1 g	ad 1 l

Färbelösung	Konzentration	Anmerkung
Methanol	50%	
Essigsäure	10%	
Coomassie® Brilliant Blue R250	0,05%	

Fixierlösung	Konzentration	Anmerkung
Methanol	50%	
Essigsäure	10%	

Entfärbelösung	Konzentration	Anmerkung
Methanol	5%	
Essigsäure	7%	

3.6.4.2.2. Lösungen zum Immunoblotting

Ponceau S-Lösung	Menge	Anmerkung
Ponceau S	0,5 g	
Eisessig	1 ml	
H ₂ O _{dest}	98,5 ml	

Basispuffer	Menge	Anmerkung
BSA	1%	
Tween ²⁰	0,05%	in TBS-Puffer

Substratreaktion	Menge	Anmerkung
TBS	47 ml	
Chloronaphthol	3 ml	Fluka 25328
H ₂ O ₂	40 ml	

3.6.4.2.3. PCR

PCR-Mix:	Konz.	Firma:
10 x One-Phor-All Puffer		Pharmacia Biotech
Nukleotide (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	20mM	Pharmacia Biotech
RNAguard pro µg RNA	1 µl	Pharmacia Biotech

3.6.4.2.4. Agarosegefärbung

Ethidiumbromidbad	Konz.	Anmerkung
von der Stocksolution	10 mg/ml	
gibt man	20 µl	in 100 ml H ₂ O _{dest.}

3.6.4.2.5. Waschlösung

Waschlösung	Konz.	Anmerkung
NaOH	0,4 N	
SDS	0,25%	erwärmt auf 50°C















3.6.4.2.6. ABTS-Detektionslösung

ABTS-Detektionslösung	Anm.:	Firma:	Bestell-Nr.:	Menge:
Lösg. A.: ABTS (2,2 Azino-di-(3-Ethylbenz-thiazolin-sulfonat))		Sigma	A-1888	1,95 mg/ml
Lösg. B: Citrat +		Sigma	241	19,2 mg/ml
Di-Natriumperborat		Sigma	6586	14,2 mg/ml
Natriumperborat		Sigma	6560	0,4 mg/ml
in 100 µl H ₂ O _{dest.} lösen und durch 0,45 µm Membran filtrieren; (pH-Soll = 4,3). Die Lösungen A und B werden kurz vor Gebrauch im Verhältnis 1: 2 gemischt.				
Stopplösung: Natriumazid in H ₂ O _{dest}	giftig !	Sigma	6688	0,95 mg/ml








3.7. Chemikalien und Enzyme

3.7.1. Chemikalien für immunologische Analysen: Filter-Synthese und Antikörper-Assay

Alle verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Merck KGaA, Gibco BRL, Difco, ICN, Amersham, Aldrich, Oxoid, Sigma, Boeringer Mannheim, Roth, Serva, Aldrich und Fluka bezogen.

Name	Gefahrenhinweis	Firma	Artikelnummer	MG	Verbrauch
Bromphenolblau		Merck	8 122		0,5 g
BSA rein		Serva	11 930	67 kDa	17,5 mg
Dichlormethan, (DCM: CH ₂ Cl ₂) > 98%, reinst, DAB, stabilisiert mit Amylen (~25 mg/l)	 R 20 S 24	Riedel de Haen	24 233	84,93	1 l
N,N'-Diisopropylcarbodiimide (DIC: C ₇ H ₁₄ N ₂)		Fluka	38 370	126,20 d=1.33	< 1,5 ml
Dimethylformamid p.a. [DMF: HCON(CH ₃) ₂]	 R 20, 21-36/S 28-36	Riedel de Haen	33 120	73,10	11 l ≙ 5 Flaschen á 2,5 l
Essigsäureanhydrid p.a. [(CH ₃ CO) ₂ O] 2%		Merck		102,09	60 ml
Ethanol (Primasprit)					3 l
Ethanol (CH ₃ CH ₂ OH)			vergällt		5 l
1-Hydroxybenzotriazole (HOBT: C ₆ H ₅ N ₃ O aq.)	 / 	Fluka	54 802	135,13 aq.	300 mg
N-Methylimidazole (99%)/(NMI : C ₄ H ₆ N ₂)		Fluka	67 560	82,11/ d=1,033	1 ml
1-Methyl-2-pyrrolidon (NMP/C ₅ H ₉ NO)	R 36/38 S 41 	Fluka	69 118	99,13/ d=1,032	50 ml
Piperidin (99%) (C ₅ H ₁₁ N)	 / 	Fluka	80 640	85,15 d=0,86	300 ml
Trifluoressigsäure (TFA: CF ₃ COOH)	 R 20, 35/ S 9, 26- 28	Solvay	50 514	85,15/ d=0,862	100 ml
Triisobutylsilan (99%)		Aldrich	27 878 -5	d=0,764	3,6 ml

Legende:

-  : sehr giftig
-  : giftig
-  : mindergiftig
-  : leicht entzündlich
-  : lichtempfindlich
-  : ätzend
-  : reizend

Anm.: Piperidin wurde nur 20% -ig und Essigsäureanhydrid nur 2% -ig eingesetzt.

3.7.2. Aminosäuren:

Code	Bezeichnung	Bestell-Nr.:	MG	mg/ml
β-A	Fmoc-βAla-OH	04-12-1044	311,3	103,8
A	Fmoc-Ala-OPfp	04-12-1500	477,4	159,13
C	Fmoc-Cys-(Trt)-OPfp	04-12-1504	751,8	250,60
D	Fmoc-Asp-(tBu)-OPfp	04-12-1502	577,5	192,50
E	Fmoc-Glu-(tBu)-OPfp	04-12-1506	591,6	197,20
F	Fmoc-Phe-OPfp	04-12-1514	553,5	184,50
G	Fmoc-Gly-OPfp	04-12-1507	463,4	154,47
H	Fmoc-His-(Trt)-OPfp	04-12-1526	785,8	261,93
I	Fmoc-Ile-OPfp	04-12-1509	519,5	173,17
K	Fmoc-Lys-(Boc)-OPfp	04-12-1511	634,6	213,33
L	Fmoc-Leu-OPfp	04-12-1510	519,5	174,67
M	Fmoc-Met-OPfp	04-12-1512	537,6	179,20
N	Fmoc-Asn-(Trt)-OPfp	04-12-1538	762,7	254,23
P	Fmoc-Pro-OPfp	04-12-1515	503,5	167,83
Q	Fmoc-Gln-(Trt)-OPfp	04-12-1539	776,8	258,93
R	Fmoc-Arg-(PMC)-OPfp	Bachem	828,9	276,30
S	Fmoc-Ser-(tBu)-ODhbt	NOVA	528,6	176,20
T	Fmoc-Thr-(tBu)-ODhbt	NOVA	542,6	180,87
V	Fmoc-Val-OPfp	04-12-1520	505,5	170,00
W	Fmoc-Trp-OPfp	04-12-1518	592,5	197,50
Y	Fmoc-Tyr-(tBu)-OPfp	04-12-1519	625,6	208,53

Anm.: Serin und Threonin der Firma Bachem sollen eine verbesserte Lagerfähigkeit besitzen und sind auch mit OPfp-Schutzgruppen erhältlich. Sie lösen sich jedoch schlechter als das vergleichbare Produkt von Nova Biochem. Arg (PMC) sollte man täglich neu ansetzen. Die oben angeführten Bestellnummern gelten jeweils für die Firma Nova Biochem.

3.7.3. Antikörper

Detektions-Enzym:	Ziege α-Maus-IgG, Fcγ, Peroxidase-konjugiert	Schwein-α-Kaninchen-IgG, Fcγ, Peroxidase-konjugiert
Firma	dianova	dianova
Best.-Nr.:	115-035-008	115-600-081
Ausgangskonz.:	0,8 mg/ml	1,3 mg/ml
Konz. eingesetzt:	1:5 000 in TBS	1:5 000 in TBS

3.7.4. Enzyme und Seren

Die Enzyme stammen von dianova, DIFCO, Pharmacia, Boehringer Mannheim, Appligene, Gibco-BRL, New England Biolabs, Promega bzw. Stratagene.

3.7.4.1. für den Aufschluss

<u>Aufschluss:</u>		
Lysozymlösung I für Listerien	120 µg/µl	in H ₂ O
Proteinase K	12 µg/µl	in H ₂ O
Lysozymlösung II (gepuffert für Zellen)	20 mg/ml	in 0,01 M Na ₂ PO ₄
	20%	Saccharose

3.7.4.2. für immunologische Analysen: Filter-Synthese und Antikörper-Assay

Antikörper	Bemerkung	Titer (CN/ECL)	Hersteller
1. Ziege-α-RNAP-UE (αββ')	polyklonal	1:1000/1:2000	H. Heumann
2. Kaninchen-α-Ziege	HRP-konjugiert	1:2000/1:2500	Sigma
3. Serum aus Kaninchen Anti-P60 <i>L. monocytogenes</i> EGD	polyklonal	1:500/1:2000	(Kohler et al. 1990)

CN: Entwicklung mit 4-Chloro-1-Naphthol (0,5 mg/ml)
ECL: Entwicklung mit Chemolumineszenz (Amersham)

Detektions-Enzym:	Ziege α-Maus-IgG, Fcγ, Peroxidase-konjugiert	Schwein-α-Kaninchen-IgG, Fcγ, Peroxidase-konjugiert
Firma	dianova	dianova
Best.-Nr.:	115-035-008	115-600-081
Ausgangskonz.:	0,8 mg/ml	1,3 mg/ml
Konz. eingesetzt:	1:5 000 in TBS	1:5 000 in TBS

Detektions-Enzym:	Kaninchen α-Mensch-IgG, Fcγ, Peroxidase-konjugiert	Schwein α-Huhn-IgY, Fcγ, Peroxidase-konjugiert
Firma	Dako	dianova
Best.-Nr.:	P 0161 10	
Ausgangskonz.:	0,8 mg/ml	0,8 mg/ml
Konz. eingesetzt:	1:5 000 in TBS	1:100 in TBS

Humanseren:

1.	A. B.	gesund	Die Seren 1. und 2. stammen von phänotypisch gesunden Freiwilligen unseres Instituts, 3. und 4. von Patienten mit Listerioseverdacht.
2.	G. L.	gesund	
3.	76 C	keine Listeriose ?	
4.	Großhadern	keine Listeriose ?	

3.7.4.3. für molekulargenetische Versuche

Enzym:	DNA-Polymerase	Streptavidin-(HRP) Peroxidase-konjugiert	Terminale Transferase (aus Kalbsthymus)
Firma	Perkin Elmer	dianova	Pharmacia Biotech
Best.-Nr.:	N808-0097	016-030-084/lot. 29703	27-0730
Konz.:	500 U	1 mg/ml	19 200 U/ml
spez. Akt.	1 U	1:1000 in 2xSSC	76 800 U/mg

Enzym:	Reverse Transkriptase, AMV	Reverse Transkriptase, AMV
Firma	Pharmacia Biotech	Stratagene
Best.-Nr.:	27-0922	60 00 81
Ausgangskonz.:	17 000 U/ml	17 000 U/ml
Konz. eingesetzt:	28,333 U/mg	28,333 U/mg

3.8. Medien, Agarplatten und Antibiotika

3.8.1. Medien

BHI-Medium	Menge	Anmerkung
BHI (Brain Heart Infusion) Merck KGaA	38,0 g	ad 1000 ml H ₂ O _{deion.}

LB-(Luria-Bertani)Medium:	Menge	Anmerkung
Bacto-Tryptone (Pepton)	10 g	(pH = 7,5)
YE yeast extrakt (Hefeextrakt)	5 g	ad 1 l
NaCl (zur osmotischen Stabilisierung)	10 g	Autoklavieren

LB-(Ampicillin) Medium:	Menge	Anmerkung
zum LB-Medium (w.o.) gibt man	pro ml	nach! dem Autoklavieren
Ampicillin	100 µg	

3.8.2. Agarplatten

Agar-Medium	Menge	Anmerkung
BHI-Medium +	ad 1 l	Dem Medium wird 1,5% Agar zugegeben.
1,5% Agar	15,0 g/l	

Nach dem Autoklavieren wird die ca. 50°C warme Flüssigkeit (evtl. nach Antibiotikazugabe) in Petrischalen gegossen.

3.8.3. Antibiotika

Antibiotikum	Stammlösung	Endkonzentration	
Ampicillin	50 mg/ml H ₂ O _{dest}	50 µg/ml	
Chloramphenikol	25 mg/ml 96% EtOH	25 µg/ml	<i>E. coli</i>
Chloramphenikol	5 mg/ml 96% EtOH	5 µg/ml	<i>Listeria</i>
Erythromycin	100 mg/ml 96% EtOH	300 µg/ml	<i>E. coli</i>
Erythromycin	5 mg/ml 96% EtOH	5 µg/ml	<i>Listeria</i>
Gentamycin	50 mg/ml H ₂ O _{dest}	10 µg/ml	
Kanamycin	25 mg/ml H ₂ O _{dest}	25 µg/ml	<i>E. coli</i>
Kanamycin	25 mg/ml H ₂ O _{dest}	15 µg/ml	<i>Listeria</i>
Penizillin	40 mg/ml in 70% EtOH	10 µg/ml	
Tetracyclin	10 mg/ml 96% EtOH	10 µg/ml	
Streptomycin	40 mg/ml in 70% EtOH	10 µg/ml	

Alle in H₂O_{dest} angesetzten Antibiotika müssen sterilfiltriert werden. Die Lagerung erfolgt bei -20°C.

3.9. EDV-elektronische Datenverarbeitung

Die densitometrische Analyse der Röntgenfilme zu den *in vitro*-Transkriptionsassays wurde an einem Macintosh Computer mit Hilfe des frei erhältlichen NIH Image Programms V. 1.6.1. laut der beiliegenden Anleitung durchgeführt (entwickelt am U.S. National Institutes of Health; erhältlich unter <http://rsb.info.nih.gov/nih-image/>). Weitere verwendete Programme CorelDraw, Microsoft Office (Word, Excel).

3.10. Molekulargewichtsstandards

PROTEIN

DNA

LW low weight-marker		DRigest™ III	1 kb-Ladder	kb DNA Ladder	
Protein	in kDa	Größe (in bp)	in bp	in bp	in ng
Myosin		23 130	12216	12 000	50
β-Galactosidase	116,25	9416	11198	10 000	50
Phosphorylase b	97,4	6557	10180	9 000	50
BSA	66	4361	9162	8 000	50
Ovalbumin	45	2322	8144	7 000	50
Carboanhydrase	31	2027	7126	6 000	40
Trypsininhibitor	21,5	1353	6108	5 000	42
Lysozym	14,4	1078	5090	4 000	42
Apoprotinin	6,5	872	4072	3 000	43
		603	3054	2 000	40
		310	2036	1 500	10
		281	1635	1 000	8
		271	1018	750	8
		234	516/506	500	7
		194	394	250	10
			344		
			298		
			220		
			200		
			154		
			142		
Firma:	Bio-Rad	Amersham	Amersham	Stratagen	
Best.-Nr.:	161-0303	27-4060-01	274001-01	201115	
Konz.:	1:20			500 ng/μl	
Menge:	1 μl	0,7-1,0 μg	1 μg/Spur	6 μl	

3.11. Verbrauchsmaterial

200	Centricons 10 kDa (grün) von Amicon
50	Einwegplastikküvetten
ca. 500	Eppendorfreaktionsgefäße á 1,5 ml/2 ml (Sarstedt)
1 Rolle	Frischhaltefolie
je 1	Gilson Pipetten 2 μl/20 μl/200 μl und 1000 μl
30	PP-Röhrchen zu 15 und 50 ml (Greiner)
20	Mikrotiterplatten (high absorbance) mit Deckel
1	Ni-NTA Resin (Qiagen)
1 Rolle	Nitrozellulose (Amersham)
	Papiertücher
1 Rolle	Parafilm (Noras)
5	Pasteurpipetten (kurz)
ca. 1000	Petrischalen 92x16 mm (Sarstedt)
ca. 2500	PCR-Eppendorfreaktionsgefäße mit Schraubverschluss (BIOzym)
1	PD 10-Säule (Sephadex 25) von Pharmacia
2 Bögen	Polytrap 296 PE; Schleicher & Schüll
4	PP-Schalen mit Glasplatten
1 Packg.	Röntgenfilm (Kodak X-OMAT)
ca. 3000	Spitzen gelb
	sterile Spritzen (z.T. mit Kanülen)
1 Packg	Sterilfilter
1 Packg	Teflonbällchen für French press
1 Rolle	Verbandmüll
3 Packg.	Vinyl-Einweghandschuhe (rotiprotect Nr.: 1904)
4 Bögen	Whatman Filterpapier Rundfilter Ø150 cm bzw. 540 /3 MM: 13 x 9 cm
	Whatman S 5 Filterpapierbögen zum Trocknen

3.12. Geräte

	Gerätebezeichnung	Hersteller
1	Absaugkammer EVENT 4160	Eppendorf
1	Autoklav	Webeco
2	automatische Dispensoren für DMF und EtOH	Eppendorf
1	Begasungsbrutschrank	NuncCellstar, Heraeus
1	Blot-Kammer	Bio-Rad
2	Brutschränke	Heraeus, Memmert
1	Elektroelutionskammer	Biotrap BT 1000 (Schleicher & Schuell)
2	Elektrophorese-Kammern	(Semidryblotter (Glas-Kohle-Fasern, CTI))
1	ELISA-Photometer	Dynatech MR600
4	Erlenmayerkolben (2 l, 500 ml, 100 ml, 50 ml)	Schoff
1	Exsiccator (25 cm)	Schoff
1	Feinwaage	Sartorius 2304
3	Filmkassetten	BRL
8	Fotomaterial	AGFA
1	Fraktionssammler	Broma LKB 2112 Redirec, Biotech
1	French-Press	SLM Amicon
1	Geiger-Müller-Zähler	Berthold LB 1210 B
1	Gelrockner	Bio-Rad Modell 1125B
3	Gelelektrophoresekammern	Mechanikwerkstatt des Instituts
1	Grobwaage	Sartorius
1	Haartrockner mit Kaltgebläse	Braun
3	Heizblöcke	Liebisch
1	Klettphotometer	Klett-Summerson Modell 900-3
2	Kühlzentrifugen, Modelle J-21B und J2-21 Mikro Rapid K; mit JA10- und JA20-Rotoren	Beckmann/Hettich
1	Magnetrührer	Gerhardt
6	Messzylinder verschiedene Größen	Brandt
1	Mikrowellengerät	Siemens Meisterkoch electronic
	Minigelkammer Mini Protean II	BioRad
2	Netzgeräte 500 V/ 100 mA / Modell 1000/500	Desaga Netzgerät / Bio-Rad
2	Plastik- (Nylon-) pinzetten	Sarstedt
1	pH-Meter	WTW pH523, Metrohm-Herisau
1	Photometer PM 6; DM 4/LKB Ultrospec III.	Zeiss/Pharmacia
1	Pipettierroboter	Auto-Spot-Robot ASP 222 (Abimed)
4	PP-Schalen mit Glasplatten	Mechanikwerkstatt
1	RNA/DNA Calculator	Gene Quant II
1	Röntgenfilmentwickler	Kodak M 35 X-OMAT Processor
3	Röntgenfilmkassetten	Dr. Goos Suprema
1	Schere	Solingen (Hartenstein)
1	Schüttelinkubator	Infors AG, Braun-Melsungen
1	Schüttler, Clim-O-Shake	System Kühne
1	Speedvac Konzentrator	Savant, Modell RH40-11
1	Sterilbank	Heraeus, Nuair
	Szintillationszähler	Beckmann LS 1800
1	Thermocycler	bio-med Thermocycler 60
1	Tischzentrifugen 5415 C bzw. Sepatech Biofuge 15	Eppendorf / Heraeus
1	Trockenofen	Heraeus
	Ultraschallgerät	Branson Sonic Power B12
1	UV-Lampe	Desaga
3	Verstärkerfolien	Dr. Goos
1	Videoprinter	Cybertech
1	Vortex	Heidolph, Boskamp
1	Wasserbadinkubator	Memmert

4.

Methoden

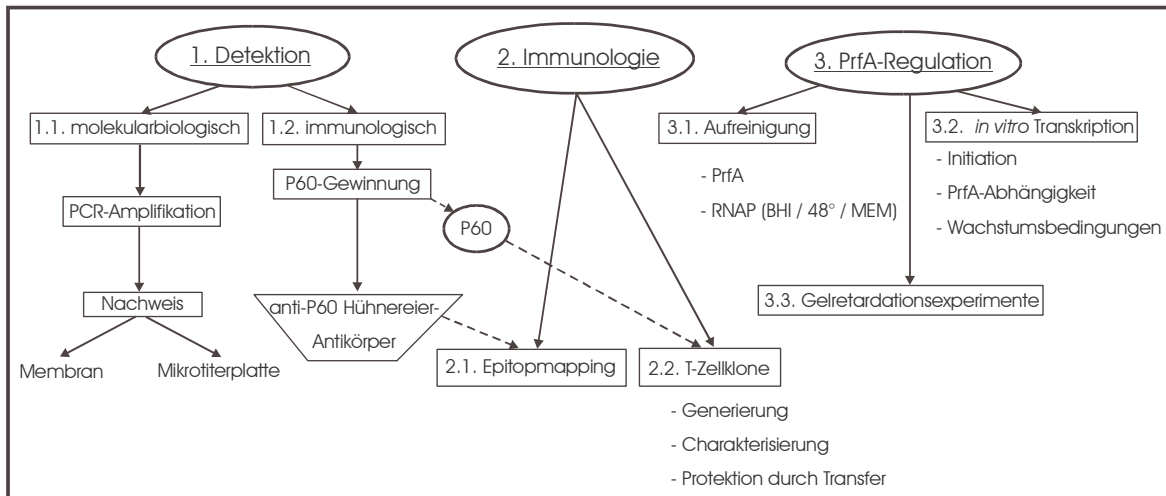


Abb.

7: Übersichtsschema zu den Versuchen

Routinearbeiten, die nicht mit einem Quellenverweis versehen sind, wurden dem Laborhandbuch "Molecular Cloning" entnommen (Sambrook 2001).

4.1. Diagnostik

4.1.1. Multiplex-PCR (Polymerase Chain Reaction)

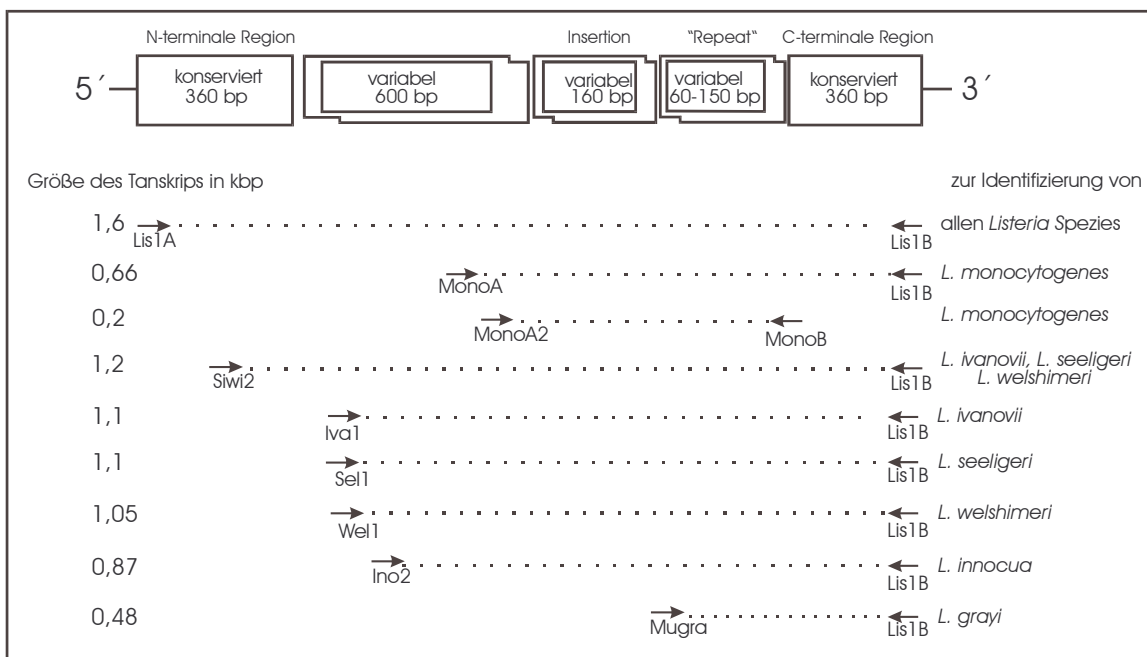


Abb. 8: Schematische Zusammenfassung der für die verschiedenen *Listeria* PCR-Nachweisreaktionen verwendeten Primerkombinationen.

Bei 92°C lösen sich die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Nucleinsäurepaaren, somit wird die Doppelstrang-DNA (ds DNA) in die Einzelstränge (ssDNA = single strand DNA) aufgebrochen. Nach dem Abkühlen auf ca. 55°C können komplementäre Oligonukleotide mit den entsprechenden DNA-

Abschnitten hybridisieren und dienen dann der DNA-Polymerase als Primer. Diese ergänzt vorzugsweise bei ca. 72°C die vorliegenden Einzelstränge zur vollständigen Doppelhelix-DNA, wodurch eine Verdopplung erreicht wird. Die *Taq*-DNA-Polymerase stammt aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* und toleriert auch eine kurzzeitige Erhitzung auf 95°C. Daher können die drei Schritte

- Hitze-Denaturierung: 92°C; 1 Minute
- Primerannealing: 55°C; 45 Sekunden
- Polymerisation: 72°C; 1 Minute

automatisiert mehrfach wiederholt werden, so dass geringe Mengen DNA *in vitro* um den Faktor 10⁶ bis 10⁸ vervielfältigt werden können. Die angegebenen Zeiten wurden in ausgewählten Versuchen auch modifiziert, so lassen sich z.B. unspezifische Produkte durch Erhöhen der "annealing"-Temperatur unterdrücken. Vor den 30-40 Zyklen wird ein initialer Denaturierungsschritt (first step delay) von 3 Minuten bei 94°C, sowie nach dem letzten Zyklus ein finaler Syntheseschritt von ebenfalls 3 Minuten bei 72°C (last step delay) durchgeführt.

4.1.2. Reverse-Dot-Blot zur Post-PCR-Detektion von Listerien

Zur Steigerung der Empfindlichkeit eines auf PCR basierenden Nachweissystems wurde - vergleichbar mit der auf ELISA (Enzym-Linked Immunoabsorbent Assay) basierenden Methode von Landgraf, Reckmann und Pingoud (Running et al. 1990) – das generierte PCR-Produkt auf einer Membran bzw. in einer Mikrotiterplatte immobilisiert und durch die Hybridisierung spezifischer Sonden detektiert. Dabei wurde das Signal in Folge einer enzymatischen Farbreaktion noch verstärkt.

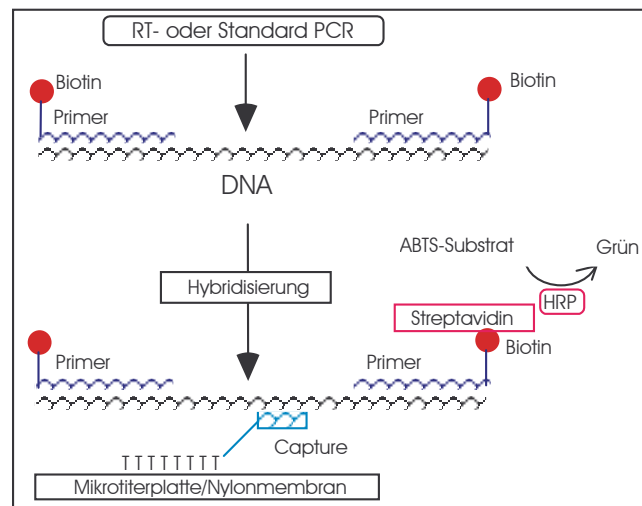


Abb. 9: Schema zum spezifischen Nachweises eines PCR-Produktes nach DNA-Hybridisierung.

4.1.2.1. Kolonieblothybridisierung auf Membranen

4.1.2.1.1. Kolonie-Transfer

Der Kolonie-Transfer kann auf drei unterschiedlichen Wegen erfolgen:

- A. Der Filter wird blasenfrei auf eine Nähragarplatte aufgelegt, die Kolonien mittels Zahnstocher auf den Filter übertragen und die Platte bei 37°C über Nacht bebrütet.
- B. Der Filter wird blasenfrei auf eine mit Kolonien bewachsenen Agarplatte aufgelegt, wobei die Position des Replikafilters markiert wird, bevor man den Filter langsam abzieht.
- C. Via Dot-Blot, indem das Zellmaterial direkt durch Aufreiben oder Durchsaugen mit einer an einer Wasserstrahlpumpe angeschlossenen Dot-Blot-Apparatur, auf den Filter auftragen wird.

4.1.2.1.2. Lyse der Bakterien

Der Filter wird zur Lyse der Bakterien mit der Kolonieseite nach oben für 20 Minuten auf ein Whatman 3MM Papier, welches mit Denaturierungslösung (0,5 N NaOH, 1,5 M NaCl) getränkt ist, gelegt. Anschließend wird dieser - wie auch vor Applikation aller folgenden Lösungen - für fünf Minuten auf frischem 3 MM Papier getrocknet. Dieser Vorgang wird zweimal wiederholt. Dann kommt der Filter für 15 Minuten auf ein mit 0,2% Triton-X100, 0,5 N NaOH getränktes Whatman 3 MM Papier. Der getrocknete Filter wird auf einem mit 1M Tris-HCl (pH 7,5), 1,5 M NaCl getränktem Whatman 3MM Papier neutralisiert und erneut getrocknet. Nach dem Waschen mit 2xSSC wird der Filter zur DNA-Fixierung auf die Nylonmembran zwischen zwei Whatman 3MM Papiere gelegt und bei 80°C für ein bis zwei Stunden gebacken.

4.1.2.1.3. Entfernung von Zellresten

Falls notwendig können Zellreste vorsichtig mit einem Wattestab entfernt werden bevor der Filter mit 2xSSC/1% SDS bei 50°C, 20 Minuten gewaschen wird. Es folgen noch zwei weitere Waschschriffe bei RT zu je 20 Minuten mit 2xSSC, 0,1% SDS und 2xSSC.

4.1.2.1.4. Hybridisierung

Zunächst werden die Filter in einer verschweißten Plastiktasche mit 20 ml Hybridisierungslösung pro 100 cm² Filterfläche bei 68°C für eine Stunde vorhybridisiert (dabei von Zeit zu Zeit die Lösung über den Filter verteilen). Die Prähybridisierungslösung ersetzt man durch 2,5 ml frische Hybridisierungslösung pro 100 cm² Filterfläche. Der Hybridisierungslösung wird die Sonde zugegeben, die zuvor durch Aufkochen für zehn Minuten bei 95°C und sofortigem Abkühlen auf Eis für fünf Minuten denaturiert wurde. Die Hybridisierung erfolgt über Nacht im Wasserbad bei 60°C.

4.1.2.1.5. Waschen

Die Filter werden zwei Mal fünf Minuten bei RT in mindestens 50 ml 2xSSC/0,1% SDS pro 100 cm² Filtergröße unter leichtem Schütteln waschen.

Ein spezifischer Waschschriff, der Basenpaarungen mit weniger als 95% Homologie zwischen der Hybridisierensonde und der DNA auf dem Filter verhindern soll, erfolgt für zwei Mal 15 Minuten bei 60°C mit einer Lösung aus 0,04xSSC/0,1% SDS.

4.1.2.1.6. Färbereaktion

Nachdem der Filter ca. eine Minute in Puffer 1 gewaschen wurde, lässt man ihn 30 Minuten in ca. 100 ml Puffer 2 bei RT unter leichtem Schütteln inkubieren, wäscht erneut (in Puffer 1, eine Minute) und schüttelt für 30 Minuten mit 20 ml Antikörperkonjugat (*tube 8*) (1:5000 in Puffer 1 verdünnt) bei RT. Nach zwei weiteren Waschschriffe zu je 15 Minuten in Puffer 1 äquillibriert man zwei Minuten in 20 ml Puffer 3. Für die Färbereaktion wird der Filter mit 10 ml Färbelösung in eine Plastiktasche einschweißten und im Dunkeln bis zum Sichtbarwerden der Banden inkubieren. Die Färbereaktion wird schließlich durch Wa-

schen des Filters in 50 ml TE-Puffer abgestoppt. Der Filter kann nach dem Trocknen bei RT für längere Zeit (ebenfalls bei RT) aufbewahrt werden.

4.1.2.2. Immobilisierung im Mikrotiterplattenformat

Voraussetzung ist allerdings, dass einer der in der PCR-Reaktion eingesetzten Primer eine zur Immobilisierung (z.B. Biotin an Streptavidin gecoateter Oberfläche) befähigende Markierung trägt. Es wird soweit nicht anders angegeben jeweils eine Minute lang gewaschen. Zum Entfernen der Lösung klopft man die Mikrotiterplatte auf einem Papiertuch aus.

4.1.2.2.1. Synthese des Poly-T-Schwanzes

Die Fangsonde wird über einen Spacer, den Poly-T-Schwanz, an der Oberfläche der Mikrotiterplatte immobilisiert. Mit Hilfe der, erstmals von Bollum aus Kalbsthymus isolierten, Terminalen Deoxynucleotidyl Transferase werden am 3'-OH-Ende ca. 600 Thyminreste angehängt (Deng et al. 1983).

200 pmol (1,5 µg) der Fangsonde Mono A werden mit

Puffer (Kalium-Cacodylat-Puffer)	20 µl
H ₂ O	72,5 µl (ad 100 µl)
d TTP	1,2 µl (100 mmol = 1,2 mmol)

auf 37°C vortemperiert. Nach der Zugabe von 75 Units (1,2 µl) Terminaler Transferase wird für 1,5 Stunden bei 37°C inkubiert und schließlich mit 2 µl 0,5 M EDTA abgestoppt.

4.1.2.2.2. Fixieren der Oligonukleotide an der Mikrotiterplatte

Vier verschiedene Methoden zur Immobilisierung der Fangsonde werden miteinander verglichen. Jede einzelne davon wurde in mindestens drei Ansätzen durchgeführt:

- UV-Licht:

Um die mit dem Poly-dT-Schwanz versehene Fangsonde zu immobilisieren, gibt man 10 pmol des Oligomers zusammen mit 100 µl dest. Wasser in die Vertiefung der Mikrotiterplatte und bestrahlt fünf Minuten bei 300 nm mit UV-Licht (Galindo 1993).

- Organosilane

Nach der Aktivierung der Mikrotiterplattenoberfläche durch simple Inkubation mit Organosilanen in wässriger Lösung, binden 10 pmol der Fangsonde ohne Poly T-Schwanz direkt an.

- EGS

Die dritte Methode gewährleistet dass fast alle eingesetzten Sonden für die Hybridisierung zur Verfügung stehen (Landgraf et al. 1991). Zunächst muss die Polystyren-Mikrotiterplattenoberfläche mit Poly-(Lys-HBr, Phe) aktiviert werden. Dann bindet man die mit **EGS** (Ethylen-Glykol bis-succinimidylsuccinat) aktivierte Fangsonde (hierbei kann ein 20-150 mer ohne Poly T-Schwanz eingesetzt werden) an die Mikrotiterplatte.

- EDC

Zunächst wird die Mikrotiterplattenoberfläche (Nunc Maxisorp-Platte) mit 25 μl frisch angesetztem und vorgekühltem 40 mM EDC (1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid-hydrochlorid) aktiviert. Die aus dem Agarosegel aufgereinigte DNA wird zehn Minuten bei 95°C denaturiert und für ca. zehn Minuten auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 1/10 Vol 0,1 M 1-Methylimidazol pH=7,0 (1-Melm₇) werden je 75 μl der Proben in den Näpfen der vorgekühlten Mikrotiterplatte verteilt (auf Eis). Die Anbindung erfolgt entweder für vier bis fünf Stunden bei 50°C oder über Nacht bei 37°C (Rasmussen et al. 1991; Nikiforov et al. 1994).

Es folgen zwei Waschschrte mit H₂O und drei weitere mit 2xSSC, bevor man mit der Hybridisierung fortfährt. Alternativ wird drei Mal mit 10 mM Tris-HCl pH = 7,5; 150 mM NaCl, 0,05% Tween²⁰ gewaschen (bzw. drei Mal mit Nunc Immuno wash) und zwei Mal für zehn Minuten mit der Waschlösung.

4.1.2.3 DNA-Hybridisierung

Durch vorheriges Prähybridisieren (15 Minuten) wird der Hintergrund deutlich reduziert. Man gibt daraufhin die vorgekühlten markierten Oligonukleotide (evtl. mit Poly T-Schwanz) bzw. die markierte DNA (auf Eis) auf 0,05 pmol/ μl in Hybridisierungspuffer (150 μl) verdünnt in die Mikrotiterplatte und inkubiert 30 Minuten bei 54°C in einer feuchten Kammer (Wasserbad-Thermocycler).

Nach der Hybridisierung wird mit unterschiedlichen Konzentrationen an SSC mit 0,1% Tween²⁰ gewaschen (drei Mal waschen, 15 Minuten einwirken lassen, drei Mal waschen), um unspezifisch gebundene Nukleinsäuren zu entfernen. Nach dem Blocken ÜN (mind. eine Stunde) in 3% BSA gibt man den Streptavidin-HRP-konjugierten sekundären Antikörper 1:1 000 in 2xSSC für eine weitere Stunde hinzu. Es wird zwei Mal mit T-TBS und 1 Mal mit TBS gewaschen, bevor die Detektion mit 100 μl ABTS-Substratlösung pro Napf erfolgt. Hierzu lässt man 30 Minuten bei RT (im Dunkeln) inkubieren und stoppt die Reaktion mit 10 μl Stopplösung ab. Bei 405 nm gegen 490 nm kann die Intensität der Farbreaktion im Mikrotiterplatten Reader bestimmt werden.

4.1.2.4. Alkaline Phosphatase vermittelte Detektion im Mikrotiterplattenformat

Alternativ werden pro Mikrotiterplatte 5 mg 4-Nitrophenyl-phosphat (PNPP) als Substrat in 10 mM Diethanolamin (pH = 9,5) mit 0,5 mM MgCl₂ gelöst. Nach dem letzten Waschschrte mit PBS wird die Platte zwei Mal mit 10 mM Diethanolamin (pH = 9,5) das 0,5 mM MgCl₂ enthält gewaschen. Mit je 50 μl Substratlösung lässt man 10 - 30 Minuten bei RT bis zur Färbung inkubieren. Positive Proben erscheinen hellgelb. Sobald die gewünschte Farbtintensität erkennbar ist, wird die Substratreaktion mit 10 μl Stopplösung abgebrochen. Eine quantitative Auswertung kann nun durch Messung bei 405 nm gegen 490 nm im Mikrotiterplatten-Reader erfolgen.

4.2. Immunologie

4.2.1. Gewinnung von P60 Überstandsprotein aus *L. monocytogenes* EGD

4.2.1.1. Anzucht

Beim Ausplattieren des P60-Überproduzenten ist darauf zu achten, dass eine vorgewärmte (37°C) BHI-Platte benutzt wird, da das enthaltene Plasmid temperatursensitiv ist. Die Kultur wird mit Übernachtskultur (1:20) in BHI (von DifCo; kein Merck Medium) mit je 1 µl/ml Erythromycin und Chloramphenicol im Erlenmeyerkolben angeimpft (z.B. 40 ml ad 1l im 2l Erlenmeyerkolben). Unter ständigem Schütteln bei 37°C lässt man die Zellen bis 340 Klett wachsen.

4.2.1.2. Isolierung des P60

4.2.1.2.1. Im kleinen Maßstab (1 ml)

1 ml Übernachtskultur (stationäre Phase) des jeweiligen Bakterienstamms wird abzentrifugiert (fünf Minuten / bei 14.000 Upm). Der Überstand wird mit eiskalter Trichloressigsäure bis zu einer Endkonzentration von 7% versetzt und eineinhalb Stunden bei 0°C gefällt. Nach erneuter Zentrifugation (zehn Minuten) wäscht man das Pellet mit Aceton und trocknet es zwei Minuten lang im Vakuum. Aufgenommen in 15 µl H₂O, 1 µl 5 N NaOH und 4 µl 5xLaemmli-Probenpuffer, werden die Proteine durch Kochen (fünf Minuten bei 95°C) denaturiert und auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen (Ludwig 1987).

4.2.1.2.2. Im Labormaßstab:

Die Bakterien werden in der vorgekühlten Zentrifuge max. 15 Minuten (10 000 U/min in JA 10 Rotor bei 4°C) abzentrifugiert. Der mit 7% TCA (140 ml für 2l bzw. 17,5 ml für 250 ml) versetzte Überstand wird ÜN bei 4°C gefällt. Am nächsten Tag wird das ausgefallene Protein (v.a. P60) abzentrifugiert (15 Minuten 10 000 U/min, 4°C), nachdem das Pellet mit einem Viertel des Ausgangsvolumens Aceton (500 ml, gekühlt auf -20°C) gewaschen wurde (15 Minuten 10 000 U/min), lässt man es fünf Minuten trocknen und nimmt es in möglichst geringem Volumen (max. 5 ml pro 250 ml ÜS) Laemmli-Probenpuffer (1:30 verdünnt = 333 µl 2 N NaOH auf 10 ml) aufnehmen. Die Proben werden 20 Minuten bei 95° C gekocht (Loch im Deckel nicht vergessen) und auf das SDS-GEL (dicke Spacer ohne Kamm, große Glasscheiben) aufgetragen.

Die Proteine werden ÜN bei 50 V (limitierte Spannung und Stromstärke) aufgetrennt. Nachdem die blaue Lämmlifront herausgelaufen ist, lässt man das Gel noch gut eine Stunde weiterlaufen. Einen schmalen Streifen schneidet man als Marker ab und färbt diesen zehn Minuten mit Coomassie (unverd.). Der Rest des Gels wird mit wässriger Coomassie-Lösung möglichst leicht angefärbt, so dass auf einem Leuchtkasten die P60-Bande (vgl. Marker) möglichst knapp ausgeschnitten werden kann. (Hier kann die Reinigung unterbrochen werden, indem man die Gelstücke in Greinerröhrchen gibt und bei -20°C einfriert.)

4.2.1.3. Geeluation

Die Biotrap-Kammer wird nach Anleitung zusammengesetzt (2 Membranen BT 1 - Glyzerin-feucht, sowie eine Membran BT 2 - trocken) und mit den in ca. 0,5 cm² große Stücke geschnittenen Gelstücken gefüllt. ÜN eluiert man das P60 in 1 x Proteinelutionspuffer bei 100 V. Das Umpuffern in **50 mM Tris-Cl (pH = 8,0) mit 0,025% Tween²⁰** kann ebenfalls in der Biotrap-Kammer (100 V 3 Mal eine Stunde) oder mittels Dialyse erfolgen. Um die Moleküle aus der Membran zu lösen wird nach der Eluation für 20 sek. umgepolt.

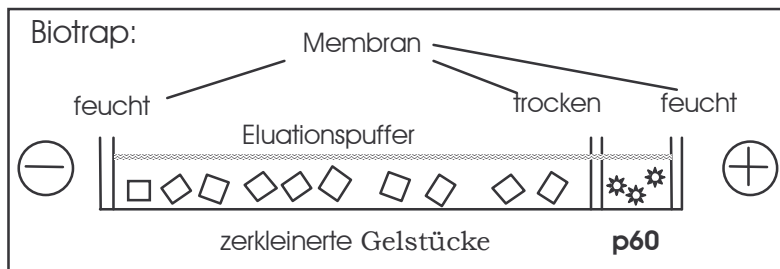


Abb. 10: Schematische Darstellung zum Aufbau und zur Funktionsweise der Biotrap-Kammer

Abschließend wird das Eluat nochmals mit dem gewünschten Puffer (in 50 mM Tris-Cl pH = 8,0 mit 0,025% Tween²⁰) in Centricons gewaschen. Die Kontrolle des Proteins erfolgt mit mono- bzw. polyklonalen Antikörpern im Western-Blot, während man zur Konzentrationsbestimmung ein SDS-Gel mit definierten Mengen an BSA als Referenz fährt. Durch den Vergleich der Intensitäten der Banden lässt sich so die enthaltene Menge an P60 abschätzen. Alternativ ist auch die Bestimmung nach Bradford entsprechend der Anleitung des BioRad-Kits möglich.

4.2.2. α -P60 Antikörper aus Hühnereiern

4.2.2.1. Immunisierung von Hühnern

Acht legereife Junghühner (21 Wochen alt) wurden im Tierstall der Physiologischen Chemie I in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. D. Palm artgerecht gehalten und *ad libitum* mit Wasser und Futter versorgt. Durch die Verwendung unterschiedlicher Rassekreuzungen, deren Eier sich anhand der Farbe (weiß, braun, grün) ihrer Schale differenzieren lassen, ist auch die Haltung von zwei bzw. drei Tieren gleichzeitig in einem großen Käfig möglich. Die Immunisierung erfolgte (nach Abnahme des Nullserums) eine Woche später mit dem Beginn der Eiablage durch intramuskuläre (i. m.) Injektion mit *L. monocytogenes*- (LM-P60) bzw. *L. innocua*-P60 (LI-P60) Peptiden mit Lysinbaum (TentaGel[®] PAP) in PBS (400 μ l) und Freudschem Adjuvans (600 μ l). Der ersten Boost erfolgt nach drei Wochen. vier Wochen später setzt man den zweiten Boost. Nach weiteren drei Wochen können die Eier auf Antikörper untersucht werden.

4.2.2.2. Extraktion und Reinigung der IgY

4.2.2.2.1. Präparation des Eigelbs

Der Dotter wird vom Eiklar getrennt, mit destilliertem Wasser gewaschen und auf einem weichen Papiertuch gerollt, um möglichst alles Eiklar zu entfernen. Die Dottermembran wird sodann mit einer Pinzette angestochen und der Dotter (9 - 20 ml) in einem Messzylinder aufgefangen.

4.2.2.2.2. Wasserextraktion der Immunglobuline

Das Hauptproblem bei der Extraktion der IgY aus dem Eigelb ist die Abtrennung der granulären Lipid- und Phosphoproteine (Lipovitellin und Phosvitin) (Burley et al. 1961). Hierzu werden verschiedene Methoden beschrieben (Jensenius et al. 1981; Bade et al. 1984; Burger et al. 1985; Vater et al. 1989; Somowiyarjo et al. 1990; Yang et al. 1990; Fischer et al. 1996; Hlinak et al. 1996; Sriram et al. 1999).

Die Hühnereantikörper werden nach der von E. M. Akita und S. Nakai beschriebenen WD- (Water Dilution) Methode aus dem Eigelb gewonnen (Akita et al. 1993). Bei dieser Methode können durch einfache Wasserextraktion die wasserlöslichen Plasmaproteine (inklusive der IgY) von den lipoidalen Granula getrennt werden, da diese, angezeigt durch die gelbe Farbe fettlöslicher Pigmente, bei niedriger Ionenstärke zu einem lockeren Sediment aggregieren.

Der Dotter wird dabei mit destilliertem Wasser (mit 1 N HCl auf pH 2,1 - 2,2 angesäuert) sechsfach verdünnt und durch Rühren homogenisiert. Der pH-Wert der Dottersuspension sollte 5,0-5,2 betragen. Nach Inkubieren über Nacht bei 4° C bildet sich ein lockeres gelbes Aggregat, das 30 - 80% des Volumens der Suspension einnimmt. Das lipoidale Aggregat lässt sich durch 25 Minuten Zentrifugieren bei 10 000 g bei 4° C von dem klaren Überstand abtrennen. Der Überstand wird durch Verbandsmull filtriert und mit 0,1 N NaOH auf pH 7,2 eingestellt.

4.2.2.2.3. Reinigung der IgY durch Ammoniumsulfat-Fällung

Der klare Überstand enthält die Antikörper, die durch Ammoniumsulfat-Fällung weiter von anderen Plasmaproteinen abgetrennt werden können. Dazu wird eine gesättigte Ammoniumsulfat-Lösung mit 1 N NaOH langsam auf pH 7,0 eingestellt und unter Rühren zu der IgY-Lösung getropft bis die Konzentration an Ammoniumsulfat 40% beträgt. Nach einer Inkubationszeit von mindestens einer Stunde wird mit 6000 g 20 Minuten zentrifugiert und das Sediment mit dem Dottervolumen an Puffer A resuspendiert. Nach einer Wiederholung der Fällung bei 40% Sättigung mit Ammoniumsulfat wird das Präzipitat mit dem halbem Dottervolumen in Puffer A aufgenommen.

Die Bestimmung des Proteingehalts erfolgt spektroskopisch bei 280 nm. Der Extinktionskoeffizient wurde mit Hilfe von γ -Globulin aus Hühnerserum, das IgY entspricht, ermittelt und beträgt $1,27 \text{ nm} \times \text{mg}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$. Die IgY-Lösung wird durch Zusatz von 0,02% Natriumazid konserviert und im Kühlschrank gelagert.

4.2.3. Peptid-Spot-Synthese

Die Dekapeptide werden auf Filterpapier (Whatman 540 /3 MM: 13 x 9 cm) mit Hilfe des Abimed ASP 222 Pipetierroboters synthetisiert (Frank 1992). Um Kontaminationen zu vermeiden, werden die Filter nur mit Handschuhen bzw. Pinzette berührt.

4.2.3.1. Synthese des Spacers

Zunächst wird der erste Teil des Spacers, ein β -Alanin, an das Papier gebunden, d.h. der gesamte Filter wird mit F-moc- α -Alanin derivatisiert. Je 2,5 ml Derivatisierungslösung gibt man auf das Papier, das mit einer Glasplatte abgedeckt und mind. drei Stunden stehen gelassen wird. Vor dem nächsten Derivatisierungsschritt wird drei Mal mit DMF gewaschen, die F-moc-Gruppen durch 20% Piperidin (20 Minuten) in DMF abgespalten (mit Glasplatte abdecken, im Abzug!). Falls nicht anders angegeben, wird jeder Waschschritt mit 14 ml Lösung zwei Minuten lang durchgeführt. Bevor man fortfährt, ist es unbedingt notwendig das Piperidin vollständig zu entfernen, da Piperidin die Kopplung der nächsten Aminosäure inhibieren würde. Dies geschieht durch fünf- bis siebenmaliges, sorgfältiges Waschen mit DMF und zwei Mal mit Ethanol. Das Ethanol wird zwischen zwei Filterpapieren erst mit einem Fön (Kaltluft), dann über Nacht im Exsiccator getrocknet. Als nächstes wird der Spacer vervollständigt (vgl. 4.2.3.3.).

Alternativ kann zur Generierung löslicher Peptide ein abspaltbarer Proline/Boc-Lysine Anker (statt β -Ala/ β -Ala) verwendet werden (Maeji et al. 1992). Um eine möglichst große Ausbeute (mmol-Maßstab) zu erreichen, verwendet man hierbei das grobe Raster mit 8 x 12 Spots (Datei SPOT8x12.XYZ) und stellt das pipettierte Volumen so ein, dass die SPOTS nicht in einander laufen und ein kleiner Abstand zum späteren ausschneiden frei bleibt (zwischen 1-1,3 μ l).

4.2.3.2. Programmierung des Pipettierroboters

Um die 484 Aminosäuren lange Sequenz (entspricht 473 Spots) des listeriellen P60-Proteins in nur einem Arbeitsschritt synthetisieren zu können, wurden (unter Berücksichtigung aller Sicherheitsaspekte) die Spezifikationen des Pipettierroboters optimiert. Durch folgende Änderungen in der Konfigurationsdatei STANDARD.XYZ im Ordner C:\SPOTXL\ wurden die Zahl der maximal möglichen Spots pro Membran von 384 (16 x 24) auf 486 (18 x 27) gesteigert („SPOT1827.XYZ“).

```
.CON
;configuration for 4 areas of 18x27 spots on 222 sampler XL-series
;reduce the Y0 offset by 350 (=35 mm) for A-series sampler
;use tray 1 and 2 for reagents, 3-8 for targets. Two more target areas possible
# OF TRAYS IS: 8
TRAY 1 2 3 4 5 6 7 8
XO 70 0 3850 1000 1000 2500 2500 0
XS 200 0 45 45 45 45 45 0
NX 4 0 2 27 27 27 27 0
YO 730 0 670 610 1710 610 1710 0
YS 200 0 45 45 45 45 45 0
NY 11 0 20 18 18 18 18 0
ZD 0 0 230 230 230 230 230 230
ZA 520 0 150 170 170 170 170 170
;ZD is needle height for dispensing, ZA for aspiration and movement between spots
;use only one set of heights for all target areas, always defined in tray 3
;aspire height in amino acid rack for 2 ml eppendorf tubes in centrifuge tubes
;data for the syringe follow. Please refer to the manual before making changes
SYR. VOL. IS: 5000,10
AIR VOLUME 0
ASPIRE SPEED 4
DISPENSE SPEED 6
```

```

RINSE SPEED      50
EXCESS VOLUME    50
DILUTOR_ID       0
SAMPLER_ID       10
RINSE_PORT_COORDINATE  140,350,500
WASTE_PORT_COORDINATE  0,350,300

```

Abb. 11: Spezifikationen der Konfigurationsdatei „SPOT1827.XYZ“ für 486 (18 x 27) Spots pro Membran.

Zunächst gibt man die Aminosäuresequenz ein („EGD.SEQ“ bzw. „INO.SEQ“) und lässt das Pipetierschema errechnen. Daraufhin generiert das Programm automatisch die Datei „NAME.REP“ die alle benötigten Aminosäuren und deren benötigte Menge enthält. Diese wird unter dem Dateinamen („NAME.PEP“) im Ordner C:\SPOTXL\ abgelegt. Hieraus errechnet man die Mengen für die anzusetzenden Aminosäuren. Unter Berücksichtigung des Totvolumens muss stets die doppelte Menge des errechneten Verbrauchs (entsprechend der Datei „NAME.REP“), mindestens jedoch 100 μ l angesetzt werden, da z.B. die Menge, welche in der Kanüle verbleibt (und beim Wechseln der Aminosäuren ausgespült wird) mit berücksichtigt werden muss (=0,3 bis 1 μ l). Die benötigten Aminosäuren werden als Stammlösungen angesetzt. Man setzt 0,3 M Lösungen der Aminosäuren im Aktivierungscocktail, bzw. deren Ester in 10 - 20% des Aktivierungscocktails an (61 mg/ml HOBt in NMP lösen und 56 μ l/ml DIC zugeben) und inkubiert sie eine Stunde. Die aktivierten Aminosäuren lassen sich in 100 μ l Aliquots bei - 20°C bis zu einem Monat lang lagern.

Die nun folgende Prozedur entspricht dem Synthesesyklus, der auch später bei der Peptidsynthese zwischen jedem Schritt durchgeführt wird:

4.2.3.3. Der Synthesesyklus

Eine zweite β -Alanin- bzw. Lysingruppe wird an den markierten Synthesespots aufgetragen.

Die Lösung für das Spotten des Grundmusters lässt man eine Stunde vorinkubieren, dann trägt man je 1 μ l pro Spot auf. Nach 20 Minuten wäscht man drei Mal mit DMF und acetyliert die nicht abreagierten Aminogruppen mit 2% Acetanhydrid in DMF (30 Minuten). Nach weiteren zwei Mal waschen mit DMF, erfolgt die F-moc-Abspaltung (20% Piperidin für fünf Minuten). Erneutes sorgfältiges Ausspülen mit DMF (5-7 Mal) soll sicherstellen, dass das Piperidin wieder vollständig entfernt wurde. Dazu sollte darauf geachtet werden, dass man die Pinzette nach Kontakt mit Piperidin säubert, und die Spitze des Absaugschlauches erneuert. Zur Kontrolle färbt man mit Bromphenolblau an. Die Stammlösung (60 mg in 60 ml DMF) wird als 1:3 bis 1:5 Verdünnung zugegeben. Sollte die gelbe Farbe nach Blau umschlagen, sind zwei weitere Waschschrte mit DMF nötig. Schließlich wird der Filter mit Ethanol (zwei Mal) gewaschen und vor dem Auftragen (1 μ l) der nächsten Aminosäure mit einem Kaltluftgebläse (Haartrockner) getrocknet. Es kann auch ein Vorrat an Filtern, in Folie eingeschweißt, bei -20°C aufbewahrt werden.

Die Aminosäuren werden vom C-terminalen Ende her (sozusagen in umgekehrter Reihenfolge) in 1 μ l-Mengen aufgetragen. Bromphenolblau hilft dabei den Verlauf der Kopplungsreaktion, nach dem Auftragen der einzelnen Aminosäuren, zu kontrollieren: das dunkle Blau der Spots geht über in Gelb, wenn die Peptidbindung ausgebildet worden ist. Gerade bei langsam reagierenden Aminosäuren und alten Lösungen wird die Gelbfärbung kaum erreicht, jedoch reicht hier wegen des großen Überschusses an

Aminosäuren bereits eine grüne Verfärbung des Spots aus. Abhängig von den vorhergehenden Aminosäuren, kann es auch bei sonst schnell reagierenden Aminosäuren zu einer Hemmung kommen, wenn z.B. nach einer Reihe hydrophiler Aminosäuren, eine hydrophobe, gespottet wird. Es ist daher unbedingt auf die Farbveränderung der Spots während der Inkubationsphase zu achten und blaue Spots nach 15 Minuten erneut mit der jeweiligen Aminosäure zu behandeln. So wiederbehandelte Bereiche binden ausreichend Aminosäuren, selbst wenn in den folgenden 15 Minuten Inkubationszeit die gelbe Farbe nicht erreicht wird. Dies liegt nicht zuletzt an der erneuten Zugabe des Aktivierungscocktails, der auch die Aminosäuren, die beim ersten Mal nicht gebunden wurden, in die Lage versetzt, eine Peptidbindung auszubilden.

Um eine maximale Genauigkeit zu erreichen, wurde auch der vollständige Syntheszyklus angewandt; bei schnellen Synthesen z.B. wenn es nur um einmalige Anwendungen geht, kann auch das verkürzte Protokoll (75 - 80 Minuten ohne Respotten und Acetylierung) und ein anderes Detektionssystem angewandt werden.

Syntheszyklus (ca. 90 Minuten) :

1. Spotten (0,7-0,9 μ l) der Aminosäure; 30 Minuten inkubieren; nach 15 min evtl. respotten (Thr u. Pro)
2. 2 Mal mit je 14 ml Acetanhydrid waschen (1 x 30 sek/ 1 x 3 - fünf Minuten)
3. 2 Mal mit je 14 ml DMF waschen (á 2 Minuten)
4. 20% Piperidin (14 ml für fünf Minuten) in DMF zur F-moc-Abspaltung
5. 5 - 7 x sorgfältig (so dass der Überstand noch gelb bleibt) mit DMF waschen
6. BPB-Färbung: 1:3 bis 1:5 Verdünnung
7. 2 Mal mit Ethanol waschen
8. Zwischen 3MM-Papier trockenföhen

Abb. 12: Syntheszyklus für die Synthese einer Aminosäure im Peptid-Spot-Verfahren

4.2.3.4. finale Acetylierung und Abspaltung

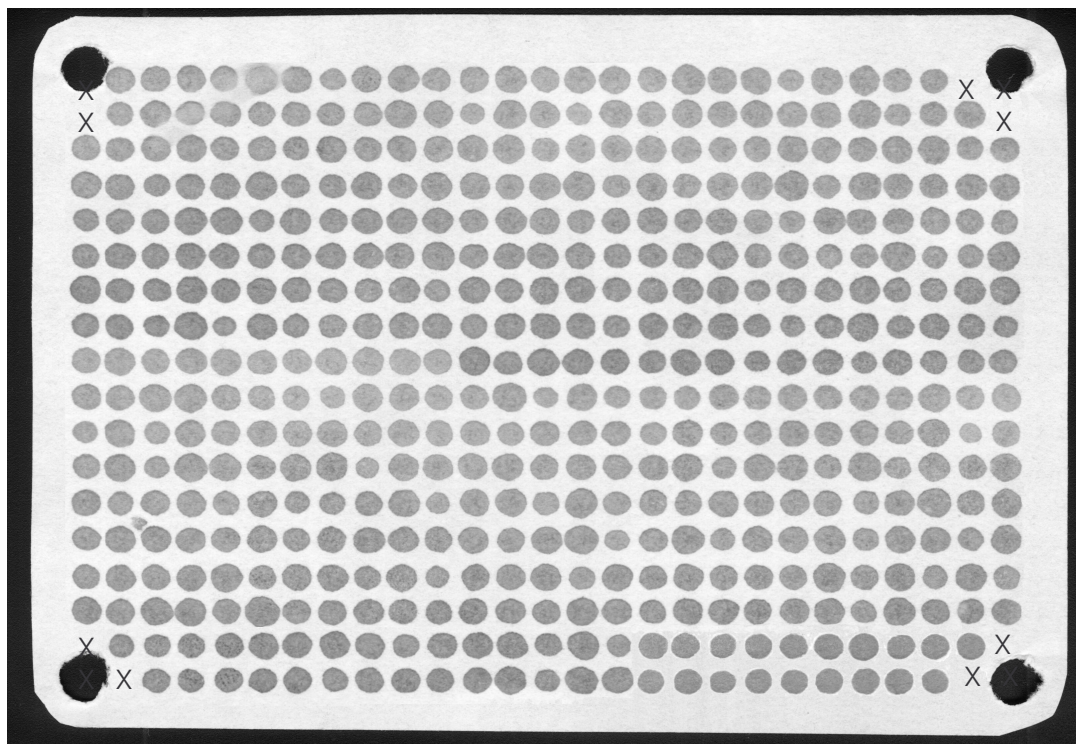


Abb. 13: Membran mit allen 473 Dekapeptiden des *L. monocytogenes* EGD P60 visualisiert mittels Bromphenolblaufärbung. Die elf Spotpositionen (X) in unmittelbarer Nähe der für das Fixieren der Filter auf dem Arbeitstisch benötigten vier Perforationen (jeweils an den Ecken) wurden ausgespart.

Nach der letzten BPB-Färbung werden die fertigen Peptide mit 2%-Acetanhydrid (20 Minuten bzw. bis zum Verschwinden der blauen Farbe) acetyliert, um eine Peptidbindung zu simulieren. Schließlich wäscht man je zwei Mal mit DMF und Ethanol und spaltet die Seitenketten-Schutzgruppen mit 2% Triisobutylsilan in 50% Trifluoressigsäure und 50% DCM (14 ml) ab. Dieses Gemisch sollte (unter dem Abzug !) und mit einer Glasscheibe bedeckt eine Stunde lang auf das Filterpapier einwirken. Vier Waschschritte mit DCM entfernen die Trifluoressigsäure aus dem Filter, der noch mit drei Waschschritten mit DMF und zwei weiteren mit Ethanol äquilibriert wird.

Zum Abspalten der Peptide werden die Filter 15 Minuten in Ultraschall mit 0,1% HCl in Methanol/Wasser (1:1) exponiert, um die Rückstände an Lösungsmitteln vollständig zu entfernen. Danach äquilibriert man fünf Stunden in 0,1 M Phosphat-Citrat Puffer pH = 3. Die einzelnen Spots werden der Reihe nach ausgeschnitten und zum Ablösen in entsprechend beschriftete Reaktionsgefäße bzw. den Vertiefungen einer Mikrotiterplatte (je nach Größe) mit 500 μ l bzw. 150 μ l 0,1 M Phosphatpuffer pH = 7,0 für drei Stunden inkubiert. Durch den Wechsel in neutralen pH kommt es unter Diketopiperazinbildung zur Abspaltung des Peptids.

Definierte Mengen an Peptiden deren Fähigkeit zur Induktion der T-Zell-Proliferation überprüft werden sollte, wurden zu Kontrollzwecken mit Hilfe von TentaGel® RAM Säulen an einem Zinsser Analytic SMPS 350 A Peptidsynthesizer erstellt und kontrolliert (Jung et al. 1995).

4.2.4. Antikörper-Assay:

Mit Hilfe der Filter können aus einem polyklonalen Antikörpergemisch diejenigen Antikörper herausselektiert werden, die hoch spezifisch mit größtmöglicher Intensität an das P60 binden (Kohler et al. 1990). Dadurch lassen sich Immunitätskarten des P60 Proteins für einzelne Individuen darstellen. Nach Art des Western-Blots wird dabei mit den Antikörpern die Immundetektion durchgeführt. Der sekundäre Antikörper besitzt z.B. Meerrettich-Peroxidase als Reporterenzym, wodurch der Immunokomplex mittels Chemolumineszenz nachgewiesen werden kann. Die Filter werden 3x mit TBS gewaschen und zum Blocken über Nacht in 3% BSA/0,05% Tween²⁰ geschwenkt. Am nächsten Morgen wäscht man mit T-TBS (pH = 7) und inkubiert zwei bis vier Stunden mit dem polyklonalen α -P60 Antikörpergemisch zur Epitopbestimmung oder zur Seroanalyse mit den entsprechenden Patienten- bzw. Mausseren (Serum 1:500 = 2,5-10 μ g/ml in Blockpuffer). Nicht bzw. unspezifisch gebundene Antikörper werden mit T-TBS weggespült (drei Mal waschen). Um die gebundenen Antikörper sichtbar zu machen, fügt man den sekundären, Peroxidasegekoppelten Antikörper (α -Kaninchen-, α -Mensch-, α -Maus-IgG- oder α -Huhn IgY-Fc γ ; 1:5 000) hinzu und lässt ihn ein bis zwei Stunden an den primären Antikörper binden. Nach vier Waschschriften mit TBS folgt die Lumineszenzdetektion. Die Luminollösung lässt man fünf Minuten im Dunkeln einwirken, legt den Filter auf ein saugfähiges Papier und wickelt beide in Plastikfolie ein. In einer Bleikassette wird für 10 - 60 sek ein Röntgenfilm aufgelegt und gleich entwickelt. Die Schwärzungen auf dem Filter lassen sich dann eindeutig bestimmten Spots und somit den entsprechenden Dekapeptiden zuordnen.

4.2.5. Strippen der Filter

Durch das sog. Stripping, kann der Filter mit den fest gekoppelten Peptiden nun von den Antikörpern befreit und für eine neue Untersuchung (mit einem anderen Serum) wiederverwendet werden. 45 Minuten (max. eine Stunde) bei 55 - 60°C im Stripping-Puffer reichen aus, um die Filterpapiere vollständig von den Antikörpern zu befreien. Da es dennoch zu "Verschleißerscheinungen" kommt, nimmt die Intensität sukzessive ab, so dass die Wiederverwendung auf ca. 20 Anwendungen beschränkt ist. Zwischenzeitlich können die getrockneten Filter für längere Zeit bei -20°C gelagert werden. Von allen stark immunogen reagierenden Epitopen werden zur Feststellung ihrer Spezifität die dazugehörigen Epitope von *L. innocua* untersucht. Falls es dabei zu keiner Kreuzreaktion kommt, vergleicht man auch die anderen Arten auf ihre Kreuzreaktivität. Nur Epitope die mit *L. monocytogenes* eine deutliche Reaktion zeigen, jedoch bei allen anderen Arten kein Signal geben, werden zur Immunisierung der Versuchstiere benutzt.

4.2.6. Untersuchungen zu den T-Zell-Klonen

Die Generierung und Charakterisierung der P60-spezifische T-Zellklone, sowie die Untersuchung ihrer protektiven Wirkung erfolgte durch Herrn Dr. G. Geginat und dessen Mitarbeiter am Institut für Med. Mikrobiologie und Hygiene an der Fakultät für Klinische Medizin Mannheim der Universität Heidelberg wie beschrieben (Geginat et al. 1998; 1999).

4.3. PrfA

4.3.1. Gewinnung von Proteinextrakten

4.3.1.1. Gewinnung der Proteinextrakte im großen Maßstab

Die RNA-Polymerase der *L. monocytogenes* Δ prfA Deletionsmutante (A42) wurde entweder nach Wachstum bei 37°C, 30 minütiger Inkubation bei 48°C bzw. in MEM (nach Sokolovic et al. 1993) mittels Ammoniumsulfat-Fällung und anschließender Heparin-Sepharose Affinitätschromatographie (3 g Heparin-Sepharose CL6-B von Pharmacia) aufgereinigt (Bockmann et al. 2000).

Der Stamm A42 wird in 9/10 Vol. auf 37°C vorgewärmten BHI Medium (450 ml bzw. 180 ml) angeimpft. Bei 180 KE wird entweder bei 37°C weiterinkubiert, ein Temperaturshift bei 48°C oder ein Shift in MEM-Medium für jeweils 30 Minuten induziert.

Die Zellen werden im vorgekühlten Rotor bei 8000 Upm/10 min abzentrifugiert und mit je 10 ml (2x) PBS in 50 ml Greinerröhrchen gewaschen (6000 Upm/10 min). Nachdem der PBS-Überstand abgenommen wurde, kann man das bakterienhaltige Pellet bei -80°C einfrieren. Zum Aufschluss der Zellen mittels French Press lässt man das Pellet in kaltem Wasser langsam auftauen, löst es in je 6 ml Puffer A (pro 11 Zellen => 20 ml ohne PMSF) und saugt die Zellen (max. 20 ml) durch in die mit Ethanol gereinigte und vorgekühlte Druckbombe. Nach dem Druckaufbau mittels einer Hydraulik, lässt man die Zellsuspension langsam (Druck 100(00) darf dabei nicht absinken) heraustropfen. Dieser Vorgang wird noch zweimal wiederholt, so dass durch die am Teflonbällchen (neues Teflonbällchen am Hahn einsetzen!) auftretenden Scherkräfte die Zellen lysiert werden.

Anschließend wird 0,1 M PMSF (0,5 μ l/ml) zugegeben, mit einer Spatelspitze Glasbeads bei 6-7 Watt drei Mal eine Minute mit je einer Minute Pause dazwischen auf Eis sonifiziert und eine Minute im Kühlraum gevortext. Man zentrifugiert (nach Entnahme eines 50 μ l Aliquot für das Gel) bei 14 000 g/4°C für 30 Minuten, füllt den Überstand mit Puffer A (ca. zwei Mal 13,5 ml) auf zwei Mal 20 ml auf und füllt mit 60% gemörsertem Ammoniumsulfat (7,22 g/20 ml (NH₄)₂SO₄) das man langsam spatelweise unter Rühren hinzu gibt (sollte ca. 15 Minuten dauern). Man lässt zur vollständigen Fällung 30 Minuten bei 4°C weiterrühren, bevor die Proteine bei 18 000 g (mindestens 30 Minuten/4°C) abzentrifugiert werden. Diese werden dann in 2 ml frischem TBA₅₀ gelöst und ebenso wie 2 ml Überstand (zur Kontrolle abnehmen, sowie ein 20 μ l Aliquot für das Gel entnehmen) ÜN in 100-facher Menge (3l) TBA₅₀-Puffer dialysiert. Ein DNase-Verdau konnte nicht durchgeführt werden, da DNA-Protein-Bindestudien als Nachweismethode dienen. Am nächsten Morgen wird in frischem Puffer für mindestens eine Stunde weiterdialysiert, während man in der Zwischenzeit die Heparinsäule vorbereitet. Dazu wird das Heparin zunächst mit Hilfe einer Nutsche und einer Wasserstrahlpumpe gewaschen. Heparin ist ein natürlich vorkommendes Glykosaminoglykan, das unter anderem zur Aufreinigung von DNA-bindenden Proteinen eingesetzt wird, da es neben einer hohen Affinität gegenüber Koagulationsfaktoren auch auf Grund seiner polyanionischen Struktur Analogien zur DNA besitzt. Zum Entfernen alter Proteine wird das Heparin mit einem Liter 1 M KCl gewaschen indem man die Flüssigkeit unter Rühren zugibt, wobei die Säule jedoch nicht trockenlaufen darf. Darauf-

hin wird mit zwei Litern H₂O deion. und 200 ml TBP₅₀ nachgespült bzw. äquilibriert. Das Heparin wird bei 500 Upm eine Minute lang abzentrifugiert und der Puffer im ÜS bis auf ca. 2-2,5 ml abgenommen (ca. 75% Gel/25% Puffer). Die Adsorption erfolgt für eine Stunde bei 4°C in einem 50 ml Greiner mit ca. 12,5 ml Heparin und 7,75 ml Proteinextrakt (100 µl abnehmen zur Kontrolle) das mit TBP₅₀ auf 30 ml aufgefüllt wurde. Die Säule wird mit dieser Suspension beladen, abgedichtet und mit 50 ml TBP₅₀, sowie 300 ml TWP₃₀₀ gewaschen (1,2 ml/min, DTT frisch zugeben). Nach ca. 250 ml wird die Absorption bei 280 nm gemessen. Sobald die OD₂₈₀ unter 0,01 gefallen ist kann mit der Eluation begonnen werden. Der Gradient liegt dabei zwischen 300 mM-1M (TWP₃₀₀-TEP₁₀₀₀ je 20 ml, Nachspülen mit 20 ml TEP₁₀₀₀). Je 32 Tropfen (ca. 1,5 ml) pro Fraktion werden mit Hilfe des Fraktionssammlers aufgefangen ÜN bei 4°C gelagert.

Das Umpuffern in Centricons erfolgt am darauffolgenden Tag. Diese werden zuvor mit 2 ml Puffer gewaschen, um vorhandenes Glycerin und Natriumazid (Konservierungsmittel) wegzuwaschen. Nachdem sie mit den RNA-Polymerase haltigen Fraktionen beladen wurden, wäscht man zwei Mal mit 1 ml TBP₅₀. Durch das Zentrifugieren für zwei Minuten der umgedrehten Centricons, kann der Proteinextrakt in neuen Eppendorfreaktionsgefäßen aufgefangen werden. Man bestimmt das Volumen und füllt mit TBP₅₀ ohne PMSF ad 450 µl auf und aliquotiert (20 µl für Bandshift, 20 µl für Silbergel und 100 µl für die „run off“-Assays) die Proteinextrakte. Die Proteinkonzentration wurde mit Hilfe des Bio-Rad Protein Mikroassays nach Bradford bestimmt.

4.3.1.2. Gewinnung der Proteinextrakte im kleinen Maßstab

Für Versuche die nur geringe Mengen an Proteinextrakt voraussetzen können diese alternativ durch Zermörsern gewonnen werden.

Wie oben beschrieben (4.3.1.1.) werden die Zellen aus 200 ml BHI-Medium gewonnen, tröpfchenweise in auf -80°C vorgekühlten Mörsern verteilt und bei -80°C ÜN eingefrorenen. Der Aufschluss am nächsten Tag erfolgt unter dem Abzug (Aerosole!) durch Zermörsern mit zwei Spatelspitzen/Mörser Aluminiumoxidpuder (ca. 15 Minuten). Um dabei die Temperatur konstant zu halten, wird immer wieder fl. N₂ nachgegossen, sobald die Zellen auftauen (weich werden).

Die so aufgeschlossenen Zellen werden in 750 µl Puffer A (mit PMSF) gelöst, in einer Wanne mit warmem Wasser geschmolzen (sofort wieder auf Eis) und erneut gemörsert. Beim Abfüllen in 12 ml Greiner Röhrchen wird der Mörser mit 250 µl Puffer A gespült. Die weitere Vorgehensweise entspricht dem oben beschriebenen Verfahren (4.3.1.1.) nach Aufschluss mittels French-Press.

4.3.2. Aufreinigung von PrfA

Das [His]₆-getaggte PrfA Protein (P2-7) wurde aus einem rekombinanten *E. coli* Stamm isoliert und in Anlehnung an die Anleitung von Qiagen über eine Ni-NTA Säule (Qiagen) wie bereits beschrieben (Bockmann et al. 1996) gereinigt. Die Reinheit wurde durch Coomassie® gefärbte SDS-Gele verifiziert.

Das *E. coli*-Bakterium besitzt ein Expressions-(pQE) Plasmid für die Expression des modifizierten PrfAs, das am N-Terminus zusätzlich mit der Sequenz MRGSHHHHHHGS versehen wurde, wodurch dessen Aktivität nicht beeinträchtigt wird. Zur Kontrolle der Expression befindet sich noch ein Repressorplasmid (pREP4) mit dem *lacI*-Gen, das für den Lac-Repressor codiert, in dem Bakterium. Zur Gewinnung des Phagenlysins wird *E. coli* erst als Übernachtskultur in LB (Amp)-Medium (ca. 20 ml) angezüchtet. Mit der Übernachtskultur inokuliert man, im Verhältnis 1:25 eine 500 ml Kultur (LB-Amp Medium) und lässt diese bei 37°C im Schüttler bis zu einer OD₆₀₀ von 0,7-0,9 (≈ 90 Klett) anwachsen. Zu diesem Zeitpunkt induziert man die Translation des Phagenlysins durch die Zugabe von 1,5 mM IPTG. Nach weiteren fünf Stunden Inkubation, folgt die Zellernte: Zentrifugation in einem JA- 20 Rotor (8 000 Upm/15 min).

Die Zellen werden dann noch einmal in Lysis-Puffer (gleiches Volumen: 500 ml) gewaschen. Um den Aufschluss der Zellen zu unterstützen, lässt man das trockene Pellet über Nacht bei -20°C im Eisschrank stehen. Am nächsten Morgen, nachdem es schonend in kaltem Wasser aufgetaut und in 10 ml Lysis-Puffer mit 0,1% Triton X (10 µl) aufgenommen (dabei gleich ein Aliquot für das Gel entnehmen) wurde, kann man mittels French-Press den Aufschluss vervollständigen (s.o. 4.3.1.1.).

Alternativ kann das Protein auch mittels Ultraschallbehandlung oder Chloroform freigesetzt werden. Die Zelltrümmer können nun bei 4°C/15 000 g/10 min abzentrifugiert werden. Der zellfreie Überstand wird unter sterilen Bedingungen durch eine 2 µm Membran filtriert und an der Ni-NTA-Säule fraktioniert. Die Aufreinigung mit Hilfe der Ni-NTA-Säule erfolgt nach der Anleitung von Qiagen (Qiagen 1992), mit folgenden Modifikationen:

- Da Lysin an Kohlenhydrate bindet, können Proteine unspezifisch, über ihre Lysinreste, an die Säulenmatrix gebunden werden. Daher verwendet man eine gegenüber dem ursprünglichen Protokoll von Qiagen erhöhte NaCl - Konzentration, um diese Proteine abzuwaschen. Der Lysis-Puffer (und auch der Waschpuffer) enthält somit 500 mM statt nur 300 mM NaCl.
- Als beste Elutionsmethode hat sich das Abwaschen mit einem Imidazolgradienten (40 - 250 mM) erwiesen.

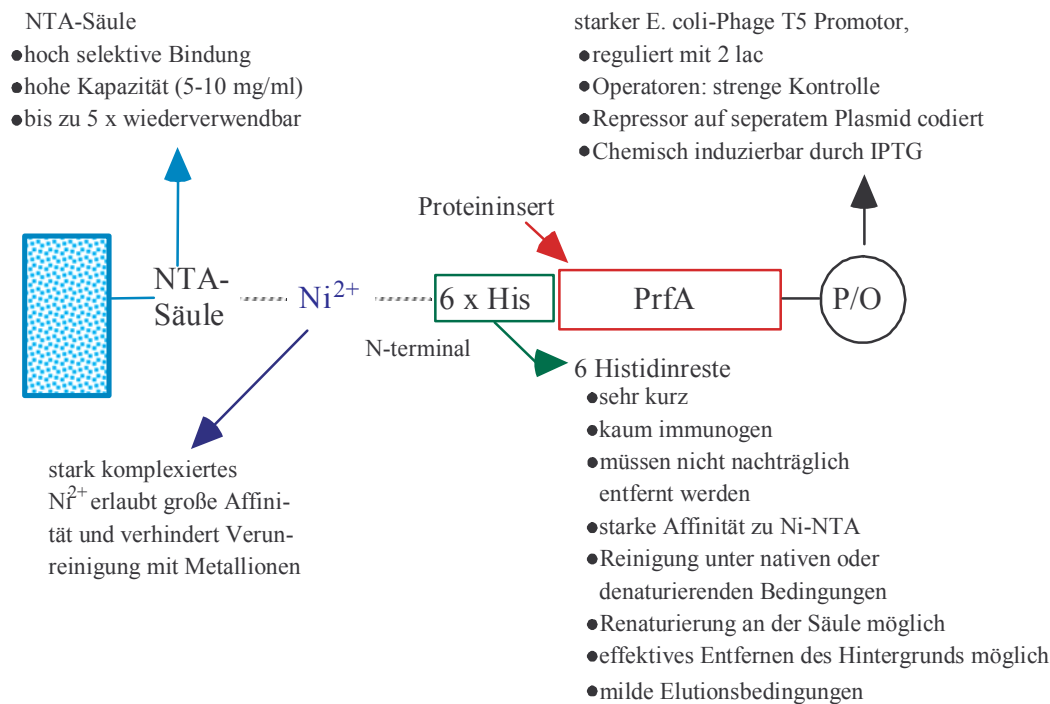


Abb. 14: Ni-NTA-Säule, für die affinitätschromatographische Reinigung von PrfA.

4.3.3. Konstruktion der Template-Plasmide

Die Konstruktion der Plasmide für die *in vitro*-Transkriptionsassays wurde wie beschrieben (Bockmann et al. 2000) durchgeführt.

Mit Hilfe der entsprechenden Primerpaare wurde jeweils die Promotorregion zusammen mit Teilen der benachbarten Sequenz amplifiziert, sowie eine *EcoRI*-Schnittstelle am 5' Ende und eine *XbaI*-Schnittstelle am 3'-Ende von *actA* bzw. *iap* eingefügt. Die gereinigte DNA wurde in den Vektor pUC19 hineingeklonet und mit *XbaI* linearisiert. Auf Grund der geringen Effizienz des Verdauens mit *XbaI*, wurden die anderen Promotoren von *hly*, *mpl*, *plcA* und *prfA1/2* entsprechend über eine *HaeIII*-Schnittstelle am 5' Ende und eine *HindIII*-Schnittstelle am 3'-Ende in pMB9 geklonet und mit *HindIII* linearisiert. Die linearisierte DNA diente dann als Matrize im „run-off“ *in vitro*-Transkriptionsassay mit Transkriptlängen von 132 Nukleotiden für P_{actA} , 93 für P_{iap} , 111 für P_{hly} , 120 für P_{mpl} , 109 für P_{plcA} und 221/137 für $P_{prfA1/2}$. Die Längen wurden durch den Vergleich mit einem radioaktiv markierten Marker definierter Länge (130 Nukleotide) verifiziert.

4.3.4. *In vitro*-Transkriptionsassay

Jeder Ansatz enthält linearisierte DNA, eine äquivalente Menge (ca. 0,5 μ g) einer der drei RNAP-Präparationen (RNAP_{BHJ}, RNAP₄₈, RNAP_{MEM}), PrfA im Sättigungsbereich und drei der vier dNTPs im Reaktionspuffer (Tatti et al. 1996; Bockmann et al. 2000). Abhängig von der Fragestellung (relative transkripti-

onale Aktivität jedes einzelnen innerhalb einer RNAP-Präparation einerseits und den unterschiedlichen Aktivitäten zwischen den drei RNAP-Präparationen andererseits) wurde entweder die RNAP oder der Promotor in dem frisch angesetzten Mastermix vorgelegt, gevortext und entweder mit der linearisierten DNA oder der RNAP versetzt. Nach zehn Minuten Inkubationszeit bei RT wird das vierte radioaktiv α - P^{32} -markierte NTP zur Initiation der Synthese zugegeben. Unspezifische Transkriptionsinitiation wurde durch die unmittelbar anschließende Beimengung von 6 μ g Heparin unterdrückt.

Die Transkription beginnt an dem zu untersuchenden Promotor auf der jeweiligen DNA, welche die PrfA Bindungsstelle, die -10 Box, die *in vivo* bestimmte Transkriptionsstartstelle, die Ribosomenbindungsstelle und (abhängig von Promotor) bis zu 221 der ersten Ribonukleotide des dazugehörigen Gens enthält. Am 3'-Ende (Schnittstelle) des linearisierten Plasmids „fällt“ der Transkriptionskomplex vom Matrizenstrang ab, daher auch der Name „run off“-Assay. Nach zehn Minuten werden die initiierten Transkripte mit 0,5 μ l des entsprechenden unmarkierten rNTPs aufgefüllt. Schließlich wird die Reaktion nach fünf Minuten durch die Zugabe von 20 μ l Stoppmix abgebrochen.

Nach Denaturierung bei 90°C (eine Minute) trennt man 16 μ l jeder Probe über ein denaturierendes 6%-iges Harnstoffgel elektrophoretisch auf. Das Gel wird auf zwei Whatmanpapieren zwischen zwei Frischhaltefolien, zusammen mit einem Röntgenfilm und Verstärkerfolie, in einer Bleikassette für 2- 24 Stunden exponiert und im Röntgenfilmentwickler entwickelt.

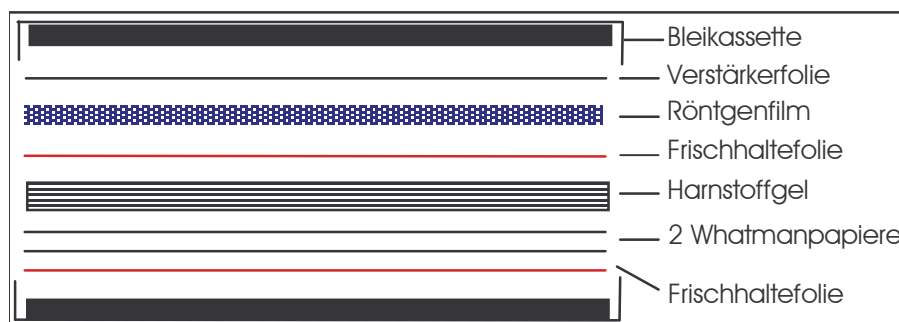


Abb. 15: Anordnung der einzelnen Lagen an Supportmaterial zur Exposition des radioaktiven Harnstoffgels auf dem Röntgenfilm.

4.3.5. Gelretardationsexperimente (Bandshift)

Die spezifische Bindung von gereinigtem PrfA-Protein und listeriellen Proteinextrakten an Promotoren der Virulenzgene lässt sich mit Hilfe von Gelretardationsexperimenten untersucht. Eine radioaktiv markierte *hly*-Sonde mit einer Proteinbindestelle kann nach elektrophoretischer Auftrennung in einem nativen Polyacrylamidgel den gebundenen DNA-Protein-Komplex visualisieren (Review: Lane et al. 1992).

4.3.5.1. Gießen der Gele

Das 5%-ige native Polyacrylamidgel wird am Abend zuvor luftblasenfrei zwischen zwei gut gereinigte Glasplatten (20 x 30 cm) gegossen, die Taschen, sowie die Laufstrecke (kurzes Fragment 12 cm (3 W)/langes Fragment 17 cm (4 1/2 W)) auf der großen Platte aufgezeichnet und, nachdem es zwei

Stunden auspolymerisieren konnte, über Nacht im Kühlraum aufbewahrt. Die beiden äußeren Taschen belädt man mit Blaupuffer.

4.3.5.2. Herstellung der P_{hly} - (bzw. P_{actA})-Sonde

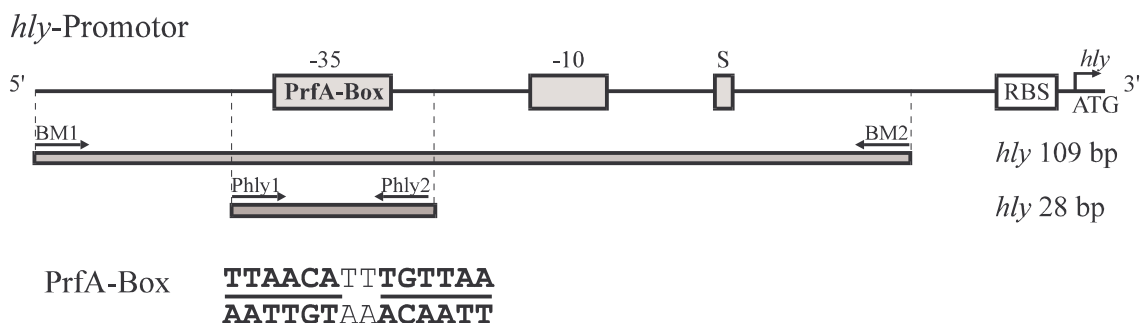


Abb. 16: Schematische Darstellung der als Sonden eingesetzten *hly*-Promotorsequenzen. Abgebildet ist die PrfA-Box, die -10-Box und der Transkriptionsstartpunkt (S) des PrfA-abhängigen P2 Promotors. Die Positionen der 109 bp und 28 bp langen *hly*-Sonden sind als graue Balken markiert. Die Pfeile geben die Lage und Orientierung der verwendeten Primer an. Unterhalb ist die palindromische Sequenz der PrfA-Box dargestellt.

Durch eine PCR (Annealingtemperatur 55°C bzw. 54°C für *actA*, 30 Mal je 45 sek.) mit den Primerpaaren BM1/BM2, bzw. CD1/CD2, erhält man die Sonden für die *hly*- bzw. *actA*-Promotorregion mit einer *Xba*I-Restriktionsschnittstelle für 5'-überhängende Enden. Nach der Kontrolle im Agarosegel (124 bp Produkt vor Restriktion), werden die 109 (*hly*) bzw. 97 (*actA*) bp langen PCR-Produkte gefället, mit *Xba*I verdaut und geleuiert. Nach der Konzentrationsbestimmung durch Messung der OD_{260} erfolgt die radioaktive Markierung von 0,5 μ g Sonde mit 10 μ Ci [α - 32 P]dATP bzw. [α - 32 P]dCTP durch Klenow Polymerase.

Der Markierungsansatz wird 30-45 Minuten bei 37°C inkubiert bevor die Reaktion mit 1 μ l 0,5 M EDTA abgestoppt wird. Nicht eingebaute Nukleotide entfernt man mit Hilfe der NucTrapTM-Säule (Stratagen) nach beiliegender Anleitung. Dazu wird die äquilibrierte Säule mit dem Markierungsansatz (ad 70 μ l mit 1x STE) beladen und mit 70 μ l 1x STE gespült. 1 μ l des radioaktiven Eluats werden zur Bestimmung der spezifischen Aktivität auf einen Glasfibrerfilter (GF/C-Filter, Whatman) pipettiert, kurz getrocknet und der Filter in ein Szintillationsröhrchen mit 3 ml Szintillationsflüssigkeit (Roth) gegeben. Die Einbaurrate (cpm/ μ l) kann dann in einem Szintillationszähler gemessen werden.

4.3.5.3. Bindungsreaktion

Die Bindungsreaktion erfolgt mit 2-15 μ l Proteinextrakt, 1 mg/ml BSA, 0,07 mg/ml poly(dI-dC) als unspezifischer Kompetitor-DNA und 200 ng gereinigtem PrfA Protein, ad 20 μ l mit 1x Tris-Bindungspuffer (TBP). Nach 15 Minuten bei RT gibt man 140 000 cpm. der [32 P]-markierten DNA-Sonde hinzu und inkubiert weitere drei Minuten bei 37°C, sowie 27 Minuten auf Eis. Die sich bildenden Protein-DNA-Komplexe

werden anschließend in einem nativen 5%-igem Polyacrylamidgel in 0,4 x TBE (oder 1xTANE) elektrophoretisch aufgetrennt, (wobei die beiden äußeren Taschen mit Blaupuffer beladen werden) bis die Blaufront die 17 cm Marke erreicht hat (ca. 3-5 h, 200-250 V, 15 mA/Vorlauf 1,5 h, bei RT, nach Vorlauf Puffer erneuern), für zehn Minuten mit Glasplatte in 10%-iger Essigsäure fixiert, vakuumgetrocknet (zehn Minuten vorheizen, bei 80°C drei Stunden trocknen, 30 Minuten unter Vakuum abkühlen lassen) und autoradiographisch (Exposition: 1-48h bei -20°C) ausgewertet.

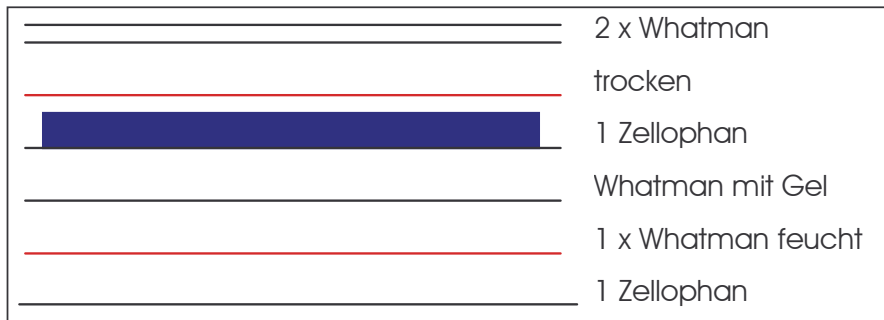


Abb. 17: Anordnung der einzelnen Lagen an Supportmaterial bei der Geltrocknung.

4.3.6. Densitometrische Analyse

Die densitometrische Analyse der Schwärzungen auf den Röntgenfilmen aus den *in vitro*-Transkriptionsassays wurde an einem Macintosh Computer unter Verwendung des öffentlichen, am U.S. National Institutes of Health entwickelten, Programms NIH Image V. 1.6.1. durchgeführt, wie in der beigefügten Anleitung beschrieben (erhältlich unter <http://rsb.info.nih.gov/nih-image/>).

4.4. Standardmethoden

4.4.1. molekularbiologische

4.4.1.1. Aufschluss von Listerien

Um die bakterielle DNA für die Amplifikation verfügbar zu machen, muss die dicke Mureinschicht der Listerien zunächst einmal permeabilisiert werden. Hierzu werden diese in PCR-Puffer resuspendiert, lysiert und denaturiert. Falls die mRNA für die RT-PCR erhalten bleiben soll, gibt man RNAGuard hinzu, um die RNAsen zu inaktivieren. Zusätzlich zur Temperatur-Druck-Behandlung können die Listerien enzymatisch vorbehandelt werden, indem man je 100 μl der in PCR-Puffer gelösten Bakterien mit 2 μl Lysozymlösung 15 Minuten lang bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 2 μl Proteinase K, folgen weitere 15 Minuten bei 56°C-60°C. Der Aufschluss kann durch Erhitzen der Proben im Heizblock auf 110°C für fünf Minuten erfolgen (Die Lyse von *E. coli.* dagegen benötigt lediglich (ohne enzymatische Behandlung) acht Minuten Kochen bei 110°C). Da Eppendorfgefäße mit verschraubbarem Verschluss benutzt werden, kann sich im Inneren ein erhöhter Druck aufbauen. Nach der angegebenen Zeit stellt man die Proben bis zur PCR auf Eis.

4.4.1.2. RT-PCR (Reverse Transkriptase abhängige Polymerase-Kettenreaktion)

Mit Hilfe der Reversen Transkriptase wird die mRNA (messenger RNA) in cDNA (copy DNA) umgeschrieben. Diese RNA-abhängige DNA-Polymerase wurde aus Retroviren (Avian Myeloblastosis Virus, AMV) isoliert. Ihre primerabhängige 5' \rightarrow 3' Polymeraseaktivität kann von einer RNA- oder DNA-Matrize ausgehend DNA (bzw. cDNA) synthetisieren. Überdies besitzt sie eine 3' \rightarrow 5' RNase H-Aktivität, d.h. sie degradiert den RNA-Anteil von RNA-DNA-Hybriden. Das Enzym besteht aus einer α -Untereinheit mit 62 kDa und einer β -Untereinheit mit 94 kDa. Gegenüber der M-MLV-RT (**M**oloney **M**urine **L**eukemia **V**irus **R**everse **T**ranscriptase) hat die AMV den Vorteil, dass sie eine geringere Halbwertszeit besitzt, bessere Prozessierung gewährleistet und im selben Puffer, wie Taq-DNA-Polymerase aktiv ist (Mallet et al. 1995). Dadurch kann die cDNA-Synthese und die DNA-Amplifikation miteinander gekoppelt werden. Somit werden Verunreinigungen durch einen zusätzlichen Pipettierschritt vermieden, weil das Reaktionsgefäß nicht mehr geöffnet werden muss. Um Kontaminationen mit RNAsen, die als Bestandteil der körpereigenen Immunabwehr auf der Hautoberfläche zu finden sind, zu verhindern, sollte man mit Handschuhen arbeiten und nur sterile Gefäße und Pipettenspitzen benutzen, die ebenfalls ausschließlich mit Handschuhen angefasst worden sind. Der Reaktionsansatz besteht aus:

- ungekoppelte RT-PCR

80 μl aufgeschlossenem Bakterienlysat in PCR-Puffer

+ 2 μl entsprechendem Puffer (10 x) und

+ 10 μl MgCl (falls erforderlich)

+ 1 μl RNase-Inhibitor

+ 1 μl 20 mM dNTPs

+ 0,5 μl Primer 1 (Syntheserichtung: stromabwärts; 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)

+ 0,5 μl Primer 2 (Syntheserichtung: stromaufwärts; 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)

+ 0,45 μl (10 Units) AMV-RT

ad 100 μl H₂O_{PCR}

- kontinuierliche RT-PCR

80 μ l aufgeschlossenem Bakterienlysat in PCR-Puffer

+ 2 μ l entsprechendem Puffer (10 x) und

+ 10 μ l MgCl (falls erforderlich)

+ 1 μ l RNase-Inhibitor

+ 1 μ l 20 mM dNTPs

+ 0,5 μ l Primer 1 (Syntheserichtung: stromabwärts; 1 μ g/ μ l)

+ 0,5 μ l Primer 2 (Syntheserichtung: stromaufwärts; 1 μ g/ μ l)

+ 0,45 μ l (10 Units) AMV-RT

+ 0,5 μ l (20 U/ μ l) *Taq*-DNA-Polymerase

ad 100 μ l H₂O_{PCR}

Im Gegensatz zur ungekoppelten Reaktion enthalten die Ansätze der kontinuierlichen RT-PCR bereits vorab zusätzlich 2,5 U *Taq*-DNA-Polymerase. Nach zehnmütiger Erwärmung auf 65°C zur RNA-Denaturierung und Primerhybridisierung (evtl. erst dann AMV-RT zugeben) wurde die Reverse Transkriptase-Reaktion durchgeführt. Zur Inaktivierung der AMV und Denaturierung der cDNA bzw. RNA folgt ein 95°C-Schritt. Erst jetzt gibt man zum ungekoppelten Ansatz 2,5 U *Taq*-DNA-Polymerase hinzu und führt die PCR, wie auch bei der kontinuierlichen Reaktion, durch.

4.4.1.3. Gelelektrophorese der DNA und Anfärbung

Nach kurzem Aufkochen von 0,7-1,5% Agarose in **0,5x TBE** (250 ml evtl. mit 25 μ l EtBr) wird die (auf ca. 50°C) abgekühlte Lösung in eine mit Kämmen versehene Gelelektrophoresekammer gegossen. Das Gel ist nach ca. eine Stunde vollständig polymerisiert und kann mit 0,5xTBE als Laufpuffer überschichtet werden. Durch Gelelektrophorese lässt sich die DNA wegen ihrer unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeit (abh. von Nettoladung, Größe etc. des Moleküls) im Gel auftrennen. Dazu werden 20 μ l der Proben mit 5 μ l Probenpuffer versetzt und auf das Agarosegel aufgetragen. Der Trennungsvorgang vollzieht sich bei 100 - 150 V. Die Banden werden sichtbar gemacht, indem man das Gel anschließend für zehn Minuten in ein Ethidiumbromid-Bad gibt. 3,8-Di-amino-5-ethyl-6-phenyl-phenanthridinium-bromid fluoresziert unter UV-Licht (250-310 nm). Die Fluoreszenzintensität wird durch das Einschleichen des Ethidiumbromids zwischen Basenpaare der DNA-Doppelhelix stark erhöht. Da diese Interkalation die Transkription stört, wirkt es mutagen (Handschuhe!). Ein an der Kamera angeschlossener Thermosublimationsdrucker kann sofort ein Abbild des Gels ausdrucken.

4.4.1.4. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Aufgetrennte DNA-Fragmente wurden mit Hilfe des GeneClean Kits (Bio 101 Inc.) gemäß Herstellerangaben aus der Agarose gelöst.

4.4.1.5. Isolierung von Plasmid-DNA mit kommerziellen Produkten

Zur Präparation von Plasmid-DNA im kleinen Maßstab (bis 20 μ g) wurde das Jetprep Miniprep Kit (Genomed) verwendet. Für die Isolation von Plasmid-DNA im Midi-Maßstab (bis 100 μ g) wurden das Nucleobond AX100-Kit (Macherey-Nagel) oder das Qiafilter Plasmid Midi Kit (Qiagen) entsprechend der beiliegenden Anleitung eingesetzt.

4.4.1.6. Isolierung chromosomaler DNA aus Listerien

10 ml einer Übernachtskultur in BHI werden bei 4500 g und 4°C 15 Minuten zentrifugiert und das Pellet mit 0,1xSSC gewaschen. Die Zellen werden in 1,0 ml Lysozymlösung resuspendiert und 30-45 Minuten bei 37°C geschüttelt. Da-

nach gibt man 9 ml Lysepuffer zu und inkubiert weitere 45 Minuten bei 37°C. Das Zellysate wird dann zwei Mal mit je 10 ml Phenol ausgeschüttelt. Den wässrigen Überstand extrahiert man mit je 10 ml Phenol/Chloroform (1:1, v/v), bis sich keine Proteine mehr in der Interphase befinden. Abschließend wird noch einmal mit 10 ml Chloroform/Isoamylalkohol (1:24, v/v) ausgeschüttelt. Die chromosomale DNA wird mit zwei Volumina Ethanol_{abs.} bei -20°C über Nacht gefällt und bei 8 000 g und 4°C 30 Minuten lang pelletiert. Das DNA-Pellet wird mit 70%-igem Ethanol gewaschen, im Speedvac-Konzentrator getrocknet und in 100-150 µl H₂O aufgenommen. Die gelöste chromosomale DNA kann bei 4°C aufbewahrt werden.

4.4.1.7. Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Zur analytischen Spaltung von Plasmid-DNA inkubiert man 1 µg DNA mit der Restriktionsendonuklease in einem Volumen von 10-20 µl eine Stunde mit entsprechenden Reaktionspuffern bei enzymespezifischer Temperatur. Die Reaktion wird durch Phenolextraktion des Restriktionsenzym oder durch Zugabe von DNA-Auftragspuffer beendet.

4.4.1.8. Transformation von Plasmid-DNA in Bakterien

50 ml Medium A werden 1:100 mit einer Übernachtskultur beimpft und bei 37°C bis zu einer OD_{600nm} von 0,4-0,6 angezchtet. Man kühlt die Kultur zehn Minuten bei 4°C, zentrifugiert zehn Minuten bei 4°C mit 1500 g und resuspendiert das Bakterienpellet in 0,5 ml vorgekühltem Medium A. Danach werden 2,5 ml eiskaltes Medium B zugegeben und vorsichtig gemischt. Die Zellen werden in Aliquots von 100 µl aufgeteilt und entweder direkt verwendet oder bei -70°C aufbewahrt. Zur Transformation mischt man die kompetenten Zellen mit 0,1-1,0 µg DNA, belässt den Transformationsansatz 30 Minuten auf Eis und erhitzt für 2 Minuten auf 42°C. Danach werden die Zellen in 1 ml 2xYT Medium für ein bis zwei Stunden bei 37°C ohne Selektion kultiviert, selektiv ausplattiert und über Nacht bei 37°C bebrütet.

4.4.2. proteinchemische Methoden

4.4.2.1. SDS-Page

Mit Hilfe der **S**odium**d**odecylsulfat-**P**olyacrylamid-**G**eleelektrophorese (SDS-PAGE) werden Proteine aufgetrennt und ihre Molmasse bestimmt. Dabei bewirkt Natriumdodecylsulfat (H₂₅C₁₂-O-SO₃Na, ein Detergens mit hoher Bindungsaffinität für Proteine - ca. 1,4 g pro g Protein), die Trennung nichtkovalenter Bindungen zwischen Untereinheiten oligomerer Proteine. Die Polypeptid-Ketten binden SDS und werden durch die Sulfonsäuregruppen des SDS stark negativ geladen. Die Ladung des nativen Proteins wird dadurch maskiert, und es ergibt sich ein relativ konstantes Verhältnis von Ladung zu Masse. Die Polypeptidketten zeigen daher ein einheitliches Wanderungsverhalten im elektrischen Feld, so dass sie während der diskontinuierlichen Geleelektrophorese (Disk-Elektrophorese) nach ihrer Molmasse aufgetrennt werden.

Die Bezeichnung "Diskontinuierliche Geleelektrophorese" gründet auf der Diskontinuität zwischen Porendurchmesser und pH-Wert von Sammel- und Trenngel. Die Gele werden durch Polymerisation einer Acrylamidlösung hergestellt. Das grobporige Sammelgel besitzt einen pH von 6,8 in dem die Proteinketten negativ geladen sind, weil bei diesem pH die endständige α-Aminogruppe ihre positive Ladung verliert (-NH₃⁺ ⇒ -NH₂ + H⁺/pK = 8,0), während die endständige α-Carboxylgruppe als Anion die negative Ladung stellt (nach -COOH ⇒ COO⁻ + H⁺/pK = 3,1) und das Glycin als Zwitterion (ungeladen, daher am langsamsten) vorliegt. Der Proteinbande geht eine Chlorid-Bande voraus, so dass zwischen dem Glycin und dem Chlorid ein Feldstärkegradient vorliegt der von oben nach unten zunimmt, wodurch die Proteine dazwischen konzentriert werden. Infolge der negativen Ladung der Chlorid-Ionen wer-

den die ebenfalls negativ geladenen Proteine abgestoßen und die anliegende Spannung zum Teil kompensiert, somit wird die Proteinbande abgebremst. Nachdem das Glycin das kleinporige Trenngel (immer 12%-ig) erreicht hat kann in dem vorherrschenden pH von 8,8 ein Proton vom Stickstoff abdissoziieren. Dadurch sind die Glycinmoleküle ebenfalls negativ geladen und überholen in Folge ihrer geringeren Größe die Proteine. Nun wird das Protein im Trenngel gemäß seiner Ladung und Größe aufgetrennt.

Die Proben werden zum Denaturieren fünf Minuten lang bei 95°C im Heizblock gekocht (Loch in Eppendorfreaktionsgefäße stechen, nicht vergessen !) und mit 5 µl Probenpuffer in die Geltaschen gefüllt. Bei 180 mV lässt man das Proteingemisch auftrennen, bis die Laufmittelfront den unteren Rand des Gels erreicht hat. Eine Markierung (z.B. die untere rechte Ecke abschneiden) hilft bei der späteren Festlegung der Orientierung des Gels. Das Gel kann nun entweder mit Coomassie® irreversibel angefärbt und mit Entfärbelösung entfärbt werden. Oder man überträgt die Proteine auf eine Nitrozellulosemembran, um ein Immunoblotting (Western-Blot) durchzuführen (Renneberg et al. 1990). Bei der Coomassie® Blau Färbung legt man das Gel mindestens 30 Minuten in Färbelösung, 30 Minuten in Fixierlösung und entfärbt es in Entfärbelösung.

4.4.2.2. Transfer auf Nitrozellulose

Nach dem SDS-PAGE wird das Gel vermessen und mindestens 15 Minuten in Transferlösung 3 aufbewahrt. Vor dem Zusammenbau der Blotting-Apparatur werden 18 Chromatographiepapiere und die Nitrozellulosemembran exakt auf Gelgröße zurechtgeschnitten. Der blasenfreie Zusammenbau wird wie folgt durchgeführt:

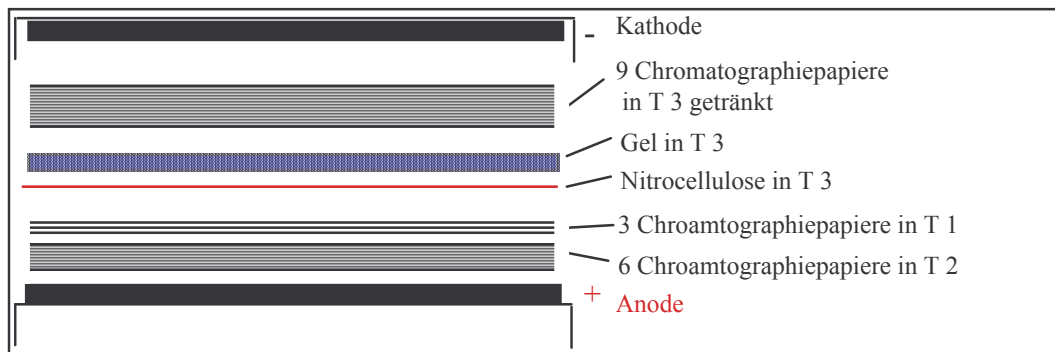


Abb. 18: Aufbau der Blotting Apparatur für den Western-Transfer.

Die Chromatographiepapiere müssen ausreichend feucht sein, jedoch dürfen die Lösungen nicht seitlich auslaufen. Der Transfer erfolgt zwei Stunden lang mit 0,8 mA/cm² (stromkonstant) bei RT.

4.4.2.3. Western-Blot

Die Proteine auf der Nitrozellulose lassen sich nun auch mit Ponceau S reversibel anfärben. Dazu schwenkt man die Nitrozellulose ca. eine Minute in der Ponceau S-Lösung und spült mit Basispuffer den unspezifisch gebundenen Farbstoff aus, bis die Banden sichtbar werden. Der Marker wird abgeschnitten und aufbewahrt. Die Nitrozellulose wird vor der Immundetektion über Nacht in Blockpuffer aufbewahrt.

Den ersten Antikörper gibt man in der Verdünnung 1:500 mit 15 ml Basispuffer zur Membran (evtl. blasenfrei in Frischhaltefolie einschweißen) und lässt eine Stunde unter Schwenken bei Raumtemperatur inkubieren. Um Hintergrund zu vermeiden muss sorgfältig drei Mal zehn Minuten in Basispuffer gewaschen werden.

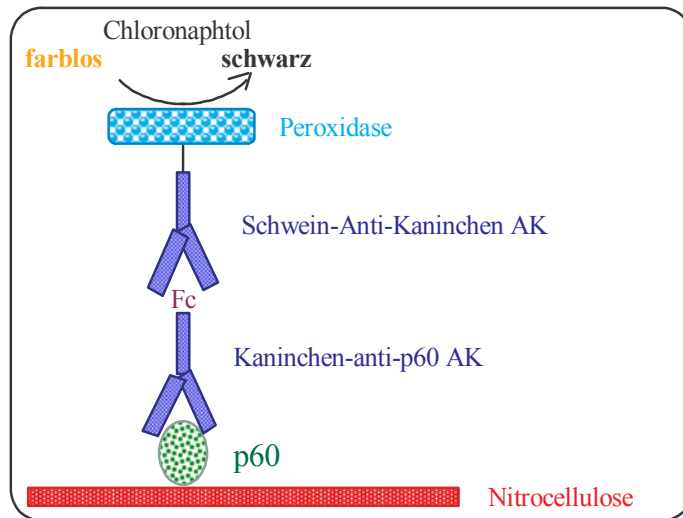


Abb. 19: Antikörperreaktion: Farbreaktion durch HRP

Nun kann der zweite Antikörper mit dem Reporterenzym (1:750) in 15 ml Puffer hinzugegeben werden. Nach 60 Minuten Inkubationszeit im Dunkeln wird je zehn Minuten zwei Mal mit Basispuffer und ein Mal mit TBS gewaschen. Mit Hilfe der Peroxidase lassen sich schließlich die an das P60 gebundenen Antikörper sichtbar machen. Als Substrat dient dabei Chloronaphthol, das sich bei der Enzymreaktion lila-schwarz färbt. Die Farbreaktion wird bei Erkennen einer deutlichen Verfärbung (max. 30 Minuten) mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ abgebrochen.

4.4.2.4. Antikörper-ELISA

Die ELISA-Platte wird mit $10 \mu\text{g/ml}$ Antigen ($100 \mu\text{l}$ pro Napf) in $200 \text{ mM Na}_2\text{CO}_3$ pH 9,6 bei 4°C über Nacht gecoatet. Gecoatete Platten sind im Kühlschrank bis zu vier Wochen haltbar.

Vor dem Einsatz wird jeder Napf mit Hilfe einer Multikanalpipette drei Mal mit PBS/0,05% Tween²⁰ gewaschen und 30 Minuten (die letzten zehn Minuten im Kühlraum) mit PBS/10% FCS geblockt. Je $100 \mu\text{l}$ des nach Bedarf in PBS/1% BSA verdünnten Serums (erster Antikörper, 1:2000) lässt man eine Stunde bei 4°C adsorbieren. Nach fünf Waschschritten mit PBS/0,05% Tween²⁰ appliziert man den sekundären Antikörper (1:5000) in PBS/1% BSA. Zur Schonung der Peroxidase erfolgt die Inkubation (45 Minuten bei Raumtemperatur) im Dunkeln. Nach Zugabe von je $100 \mu\text{l}$ SIGMA-Detektionslösung wird die ELISA-Platte nach ca. 15 Minuten (je nach Grad der Gelbfärbung) mit $30 \mu\text{l}$ $6\text{N H}_2\text{SO}_4$ fixiert und im ELISA-Reader bei 492nm ausgelesen. Wird die Farbreaktion nicht abgestoppt so muss unmittelbar nach Erreichen der optimalen Farbtintensität bei 450 nm ausgelesen werden.

4.4.2.5. Proteinquantifizierung nach Bradford

Die Proteinquantifizierung wurde mit einem Kit der Firma Bio-Rad durchgeführt. $2\text{-}5 \mu\text{l}$ der Proteinsuspension wurden hierzu in $800 \mu\text{l}$ H_2O verdünnt und mit $200 \mu\text{l}$ Färbereagenz versetzt (bzw. $400 \mu\text{l}$ Probe und $100 \mu\text{l}$ Reagenz). Nach 20-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte die Quantifizierung bei $\text{OD}_{595\text{nm}}$. Als Eichprotein wurde BSA verwendet.

4.4.3. sonstige

4.4.3.1. Rehydrierung gefriergetrockneter Bakterienstämme

Aus der institutseigenen Stammsammlung wurden gefriergetrocknete und in Glasampullen eingeschmolzene Stämme entnommen. Eine in ein Tuch eingewickelte Ampulle wird durch einen gezielten Schlag an dem oberen Ende aufgebrochen, so dass das innere Röhrchen mit dem Bakterienmaterial entnommen werden kann. Die Aktivierung erfolgt, indem man einige Körnchen in wenige Milliliter Nährmedium gibt und über Nacht bei 37°C inkubiert. Ausplattieren als Zwischenschritt, vor dem erneuten Animpfen einer Übernachtskultur gibt zusätzliche Sicherheit über

den Erfolg der Rehydrierung. Nach der positiven Identifikation des ausplattierten Stammes legt man jeweils zwei Glycerinkulturen an, auf die bei Bedarf zurückgegriffen werden kann (Anonymous 1997).

4.4.3.2. Anlegen von Glycerinkulturen

800 μ l Übernachtskultur werden mit 400 μ l Glycerin in ein Kryoröhrchen gegeben und bei -70°C weggefroren.

4.4.3.3. Präparation der Dialyseschläuche

Die in 10-20 cm lange Stücke geschnittenen Dialyseschläuche werden zehn Minuten in 2% Na-bicarbonat (=Na-Hydrogencarbonat)/1 mM EDTA pH 8,0 gekocht, mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ gespült und wiederum zehn Minuten in 1 mM EDTA pH 8,0 gekocht oder autoklaviert. Dabei dürfen die diese nur mit Handschuhen angefasst werden. Die Dialyseschläuche können bei $+4^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt werden.

5.

Ergebnisse

5.1. Molekularbiologischer Nachweis von *L. monocytogenes*

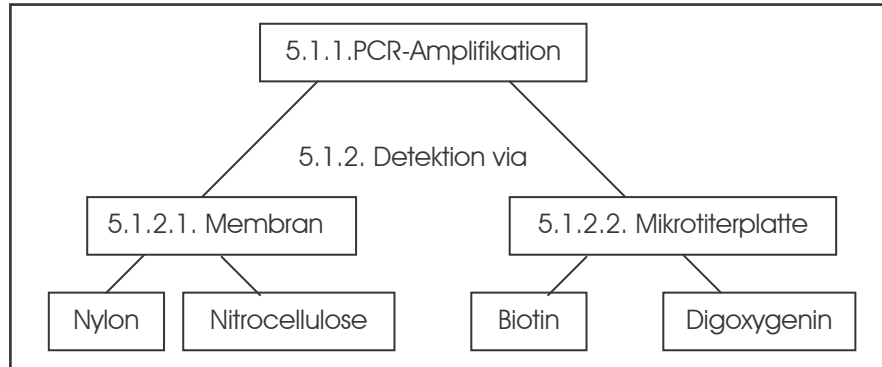


Abb. 20: Übersicht zur molekularbiologischen Detektion von *L. monocytogenes*.

5.1.1. PCR-Amplifikation

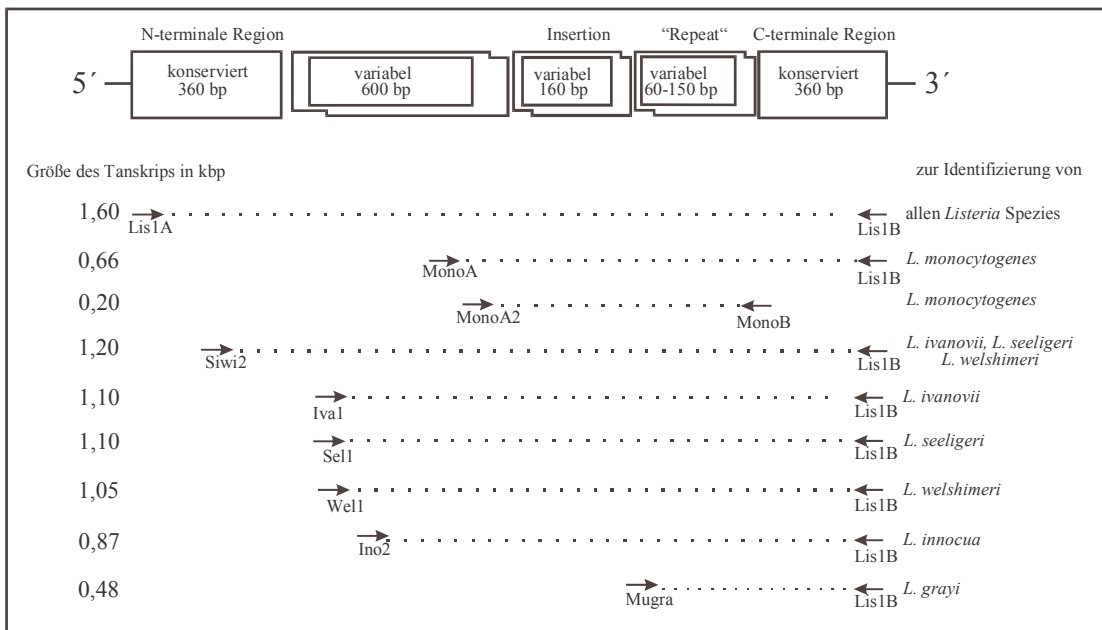
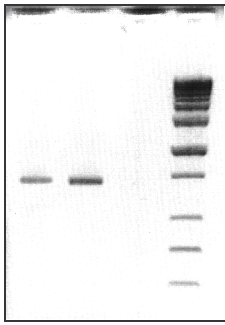


Abb. 21: Schematische Zusammenfassung der für die verschiedenen *Listeria* PCR- bzw. Multiplex-PCR-Nachweisreaktionen verwendeten Primerkombinationen.

Die mit den gattungs- und spezies-spezifischen Primern generierten PCR-Produkte (Lalic-Muelthaler 1996), sollen durch Hybridisierung mit nicht radioaktiv markierten Sonden nachgewiesen werden. Dazu werden die PCR-Produkte an Nitrozellulose-/Nylon-Membranen oder in Mikrotiterplatten immobilisiert und über den inkorporierten Marker detektiert.

Die *Listeria* gattungsspezifische PCR ergibt mit dem Primerpaar Unilis A und Lis 1B ein gut detektierbares spezifisches PCR-Produkt (Abb. 22).

Spuren: 1 2 3 4



- Spur 1.: Unilis A und Lis 1 B (Merck)
 Spur 2.: Unilis A und Lis 1 B (Pharmacia)
 Spur 3.: Negativkontrolle (nur Unilis A ohne Lis 1 B)
 Spur 4.: Marker (1 kb Ladder)

Abb. 22: Standard-PCR: 33 Zyklen 15 sek. 95°C; 30 sek. 56°C, 30 sek. 72°C. Der Abschluss erfolgte jeweils nach Proteinase K/Lysozym-Vorbehandlung.

5.1.2. Reverse-Dot-Blot zur Post-PCR-Detektion von *L. monocytogenes*

Durch den Einsatz des Reverse-Dot-Blot-Verfahrens sollte die Effizienz der Detektion von *L. monocytogenes* gesteigert werden, indem das PCR-Produkt - nach der Hybridisierung auf einer Membran oder in einer Mikrotiterplatte - colorimetrisch visualisiert wird.

5.1.2.1. Detektion auf Membranen:

Immobilisierung:

Zur Immobilisierung wurden drei verschiedene Membranen eingesetzt:

1. Hybondmembran von Amersham,
2. fliefaserverstärkte Nitrozellulose,
3. Nylonmembran von Nunc

Auf diese wurden mittels Vakuumfiltration (Absaugkammer Event 4160, nur Nylonmembran), Auftropfen oder Kolonieblothybridisierung die Sonden appliziert. Die Immobilisierung der Membranen erfolgte mit UV oder durch zwei Stunden backen bei 80°C. Die besten Resultate wurden mit der Hybondmembran von Amersham nach zwei Stunden backen bei 80°C erzielt. Die colorimetrische Detektion des *L. monocytogenes*-PCR-Produktes erfolgte mittels ABTS-Substratlösung.

Hybridisierung:

Verschiedene Hybridisierungstemperaturen zwischen 42°C und 68°C, sowie Hybridisierungszeiten zwischen zehn Minuten bis zu zwölf Stunden (ÜN) wurden untersucht. Die besten Ergebnisse konnten bei einer Temperatur von 68°C und einer Hybridisierungszeit von zwölf Stunden beobachtet werden.

Wegen der niedrigen Signalstärke, der umständlicheren Handhabung, des geringeren Probendurchsatzes und der langen Inkubationsperioden (zur Immobilisierung zwei Stunden bei 80°, Hybridisierung ÜN) der Membranen wurden alle weiteren Experimente in Mikrotiterplatten durchgeführt.

5.1.2.2. Detektion in Mikrotiterplatten

Es sollte geprüft werden, ob die Post-PCR Detektion im Mikrotiterplattenformat geeignet ist, geringe Mengen des *L. monocytogenes*-PCR-Produktes nachzuweisen. Während das 5'-Ende mit einem biotinyliertem Lis 1B-Primer markiert ist, wurde am 3'-Ende ein UnilisA-Primer eingesetzt. Damit wird das gesamte

iap-Gen einschließlich der internen Hybridisierungsstelle für MonoA amplifiziert. Das verdünnte ($1,6 \times 10^{-7}$) *L. monocytogenes*-PCR-Produkt wird zu der in einer Mikrotiterplatte immobilisierten *L. monocytogenes*-spezifischen Fangsonde (Mono A-poly T) gegeben. Die Intensität der vom Reporterenzym generierten Verfärbung kann im Mikrotiterplatten-Reader gemessen werden.

Beim Vergleich der vier verschiedenen Methoden zur Fixierung des Capture-Oligos an der Mikrotiterplattenoberfläche hat die Kopplung mit Hilfe von EDC (vgl. 4.1.2.2.2.) am besten abgeschnitten. Auch mit der einfacher und schneller durchzuführenden Immobilisierung mittels UV-Licht beobachtet man eine ausreichend gute Immobilisierungseffizienz.

Die Spezifität des Nachweises wird durch Zugabe des *L. monocytogenes*-PCR-Produktes zu Wells mit fehlenden Linkern bzw. fehlenden Capture-Oligos verifiziert:

Tab. 3: Extinktionswerte der Reverse-Dot-Blot-Detektion im Mikrotiterplattenformat von verdünntem ($1,6 \times 10^{-7}$) *L. monocytogenes*-PCR-Produkt, bei Messung 405 nm gegen 490 nm.

Probe	Extinktion	Fangsonde	spezifisch für	erwartetes Signal
1A	1,317	Mono A-poly T	<i>L. monocytogenes</i>	Positivwert
2A	-0,006	Ino 2-poly T	<i>L. innocua</i>	Negativkontrolle
1B	-0,010	Mono A ohne poly T	<i>L. monocytogenes</i>	Negativkontrolle
2B	-0,045	Ino 2 ohne poly T	<i>L. innocua</i>	Negativkontrolle
1C	0,002	ohne Fangsonde	-	Negativkontrolle
2C	-0,038	ohne Fangsonde	-	Negativkontrolle

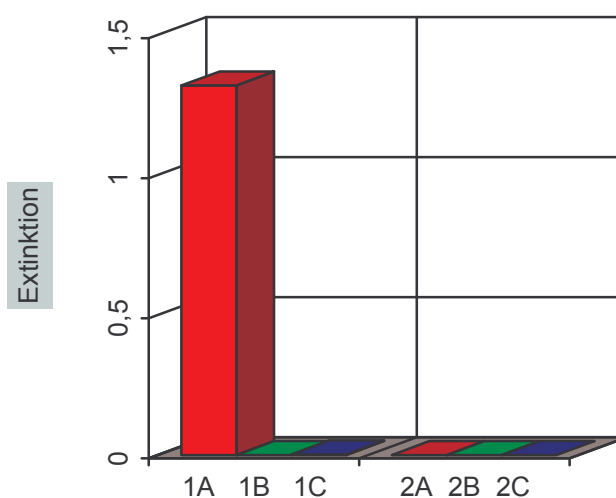


Abb. 23: Graphische Darstellung der Spezifität der Reverse Dot-Blot-Detektions-Methode im Mikrotiterplattenformat. Verdünntes *L. monocytogenes*-PCR-Produkt mit spezifischem (1A) und unspezifischem Capture (vgl. Tab. 3), Messung bei 405 nm gegen 490 nm.

Somit konnte gezeigt werden, dass *L. monocytogenes*-PCR-Produkte mittels des Reverse-Dot-Blot-Verfahrens im Mikrotiterplattenformat mit polyT verlängertem MonoA spezifisch detektiert werden können. Die Negativkontrolle mit Ino 2-polyT führte erwartungsgemäß nicht zu einer Hybridisierung. Ebenso wenig wie mit dem Mono A-Captureprimer ohne polyT₁₃-Spacer, da dieser für die optimale Präsentation sehr wichtig ist (Abb. 23).

Zur weiteren Optimierung wurde das Capture-Oligo modifiziert (Mono A/B, mit/ohne Biotin bzw. Spacer), die Hybridisierungszeit bzw. -temperatur variiert, der Einfluss eines Prähybridisierungsschrittes und eines zusätzlichen Denaturierungsschrittes untersucht: Es empfiehlt sich hierbei die Reinigung der Oligonukleotide mittels PAGE (nach Urdea et al. 1988) durchzuführen.

Da die Hybridisierung bei RT bei allen untersuchten Zeiten (15 Minuten, 30 Minuten, ein, zwei, vier, sechs Stunden bis ÜN) zu unspezifisch war (Daten nicht gezeigt), wurde die Hybridisierungstemperatur zunächst in 10°C-Schritten zwischen 40°C und 80°C, sowie anschließend zwischen 50°C, 55°C und 60°C variiert. Optimale Hybridisierungsergebnisse erhält man bei 55°C für 30 Minuten mit einem zusätzlichen Denaturierungsschritt mit 150 mM NaOH-haltiger Waschlösung. Eine vorangestellte 30-minütige Prähybridisierung reduziert dabei zusätzlich noch den unspezifischen Hintergrund. Im Vergleich verschieden langer Prähybridisierungszeiten von 15 Minuten, 30 Minuten, ein, zwei, vier, sechs Stunden bis hin zu ÜN, brachte eine längere Inkubationsdauer über 30 Minuten hinaus keine weitere Verbesserung des Signal/Hintergrund Verhältnisses.

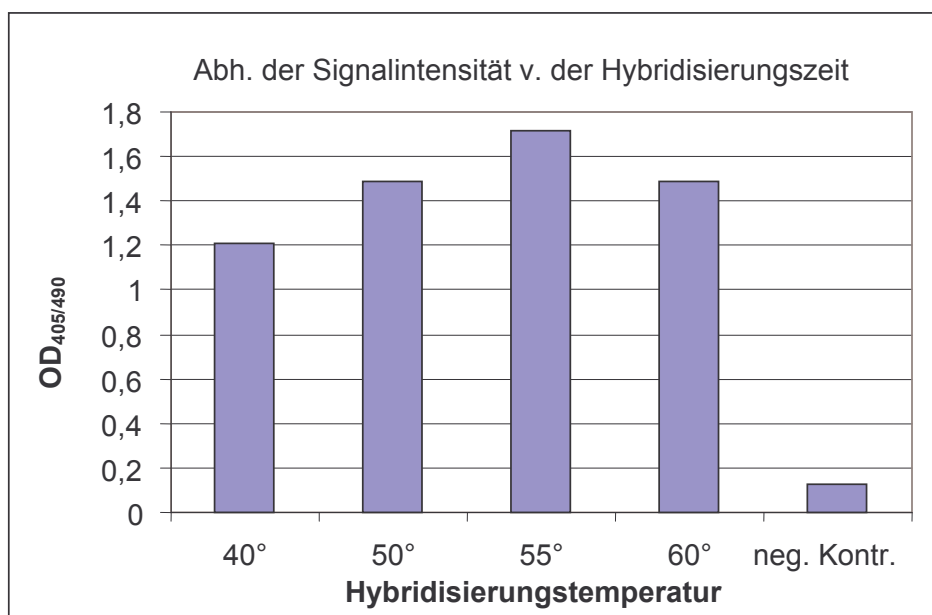


Abb. 24: Abhängigkeit des Detektionssignals von verdünntem *L. monocytogenes*-PCR-Produkt von der Hybridisierungstemperatur im Reverse Dot-Blot-Detektions-Verfahren nach 30-minütiger Prähybridisierung bei 55°C im Mikrotiterplattenformat. Messung bei 405 nm gegen 490 nm.

Zudem erzielte von den getesteten sieben Blockreagenzien (Heringssperma DNA, ELISA-Blockpuffer A, **Blockpuffer B mit Boeringerschem Blockreagenz**, Event Blockreagens, BSA, Casein aufgereinigte Fraktion, Blockpuffer mit Denhardt Lösung) der Blockpuffer B mit Boeringerschem Blockreagenz die beste Reduktion unspezifischer Signale. Des Weiteren war ein zusätzlicher Block mit Milchpulver oder 3% BSA vor der Zugabe des sekundären Antikörpers vorteilhaft.

Die Fangsonde und das PCR-Produkt wurden gegeneinander titriert (mit Verdünnungsreihen von unverdünnt bis 10^{-16} für das PCR-Produkt und von unverdünnt bis 10^{-8} für das Capture), um die optimalen Kon-

zentrationenverhältnisse und den dynamischen Bereich zu bestimmen. Jedoch konnten auf Grund der schwachen und unspezifischen Signale keine aussagekräftigen Ergebnisse erzielt werden. Dabei zeigte sich, dass das biotinmarkierte PCR-Produkt auch unverdünnt nur ein sehr schwaches Signal ergab. In einer weiteren Verdünnungsreihe mit dem PCR-Produkt aus Unilis A und Biolis 1B (Biotin-markiert), sowie gereinigtem Biolis 1B (als Positivkontrolle) bzw. Lis 1B (ohne Biotin, als Negativkontrolle) wurde dies daher genauer untersucht:

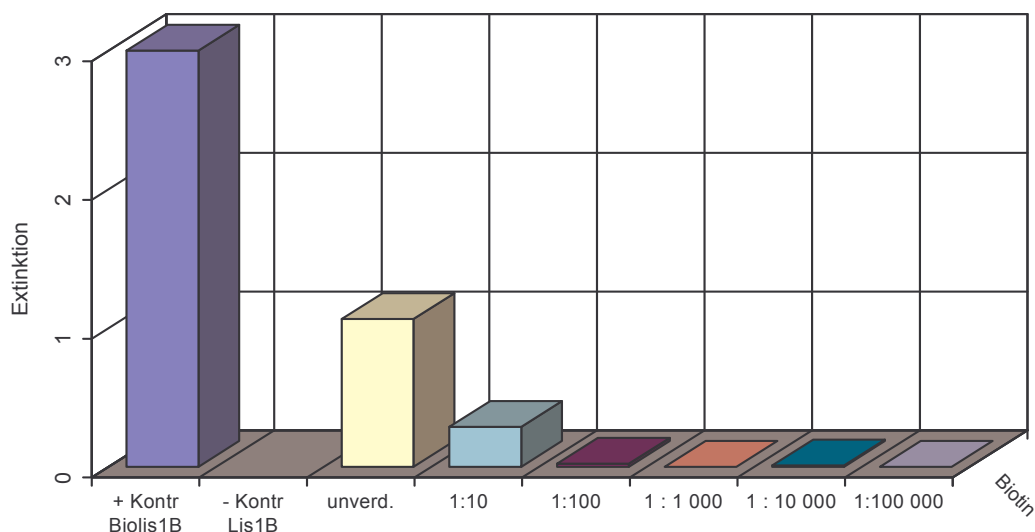


Abb. 25.: Extinktionswerte nach HRP-Substratreaktion mit Biolis 1B (Positivkontrolle) bzw. Lis 1B (ohne Biotin, Negativkontrolle), sowie einer Verdünnungsreihe mit gereinigtem PCR-Produkt (UnilisA, Biolis1B).

Das gereinigte PCR Produkt mit Biotin-markiertem Primer Biolis 1B und Unilis A (gattungsspezifische Reaktion) gibt immobilisiert nur ein sehr schwaches Signal, während der biotinylierte Primer Biolis 1B alleine (in gleicher Konzentration) dagegen ein sehr starkes Signal zeigt. Offenbar erfährt das Biotin während der PCR-Reaktion eine Veränderung (Ablösen des Biotins), oder aber es liegen zu viele nicht biotinylierte Primer vor, so dass die Markierung des PCR-Produkts nur unzureichend ausfällt. Dadurch kommt es zur verringerten Sensitivität des Tests, was man - wie Vorversuche zeigen konnten - mit Digoxigenin-markierten Primern vermeiden konnte.

Zum spezifischen Nachweis von *L. monocytogenes* mittels Digoxigenin-markierten Primern vgl. Rauch 1997.

5.2. Immunologie von *L. monocytogenes*

Da erste Hinweise existieren, dass möglicherweise ein häufiger Kontakt mit apathogenen Spezies (insbesondere *L. innocua*) vor einer Infektion mit *L. monocytogenes* schützen könnte, sollte die Immunantwort auf P60 von verschiedenen *Listeria* Spezies (insbesondere die Kreuzreaktivität) und der Einfluss von P60-stimulierten TH1-Zellklonen untersucht werden.

5.2.1. Aufreinigung des P60 Proteins

Zunächst wurden sowohl für die Immunisierung der Versuchstiere als auch die T-Zell Stimulierung größere Mengen an P60 benötigt. Daher wurde aus dem listeriellen Kulturüberstand P60 im großen Maßstab aufgereinigt. Die Reinheit konnte durch SDS-PAGE und den anschließenden Western-Blot mit polyklonalem α -P60-Serum bestätigt werden.

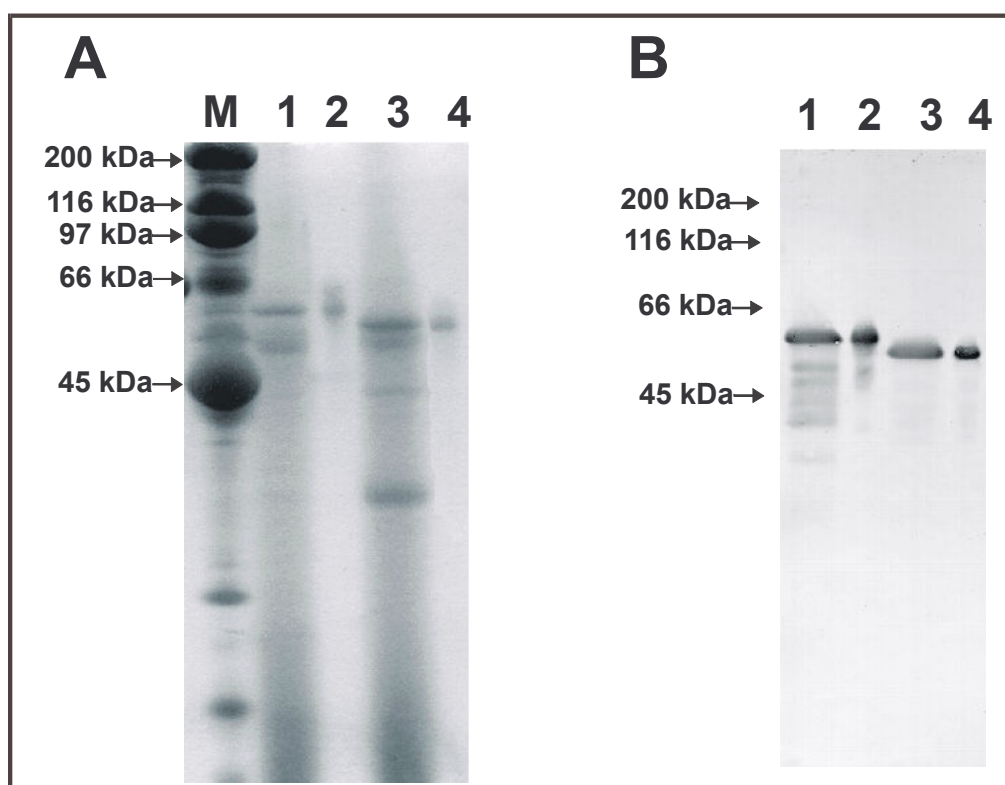


Abb. 26: Gereinigtes P60-Protein von *L. monocytogenes* und *L. innocua*. A: Coomassie gefärbtes SDS-Page Gel. B: Western-Blot (mit Köhlerschem polyklonalem α -P60-Serum, 1:10³). Spur "M" Molekulargewichtmarker (high range, Biorad); Spur 1: TCA gefälltes Überstandsprotein; Spur 2: P60 Protein nach Geleluation.

Bestimmung der P60 Proteinkonzentration aus *L. monocytogenes* EGD nach Bradford (Biorad)

Wie aus Abb. 27 ersichtlich ergibt sich aus der gemessenen $OD_{595} = 0,458$ eine Proteinkonzentration von ca. $7 \mu\text{g/ml} = 7 \text{ ng}/\mu\text{l}$. Multipliziert mit der Verdünnungsstufe (1:10) folgt eine Endkonzentration von $70 \mu\text{g/ml}$.

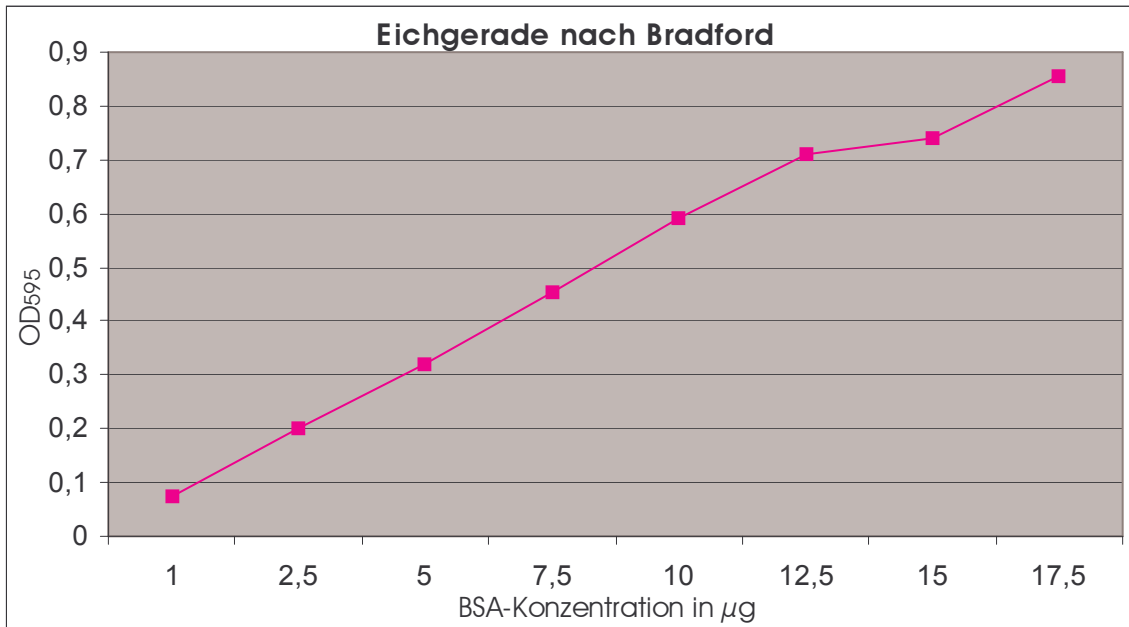


Abb. 27: Eichgerade (2 x) erstellt mit 1/2,5/5/10/12,5/15/17,5/20/22,5/25 mg BSA ad 500 μl nach Bradford.

5.2.2. Peptid-Spot-Synthese

Die Identifizierung spezifischer immunogener Epitope des P60-Proteins erforderte die Synthese von Deka- bzw. Dodekapeptiden auf einen Whatmanfilter, welche um jeweils eine Aminosäure versetzt die gesamte Aminosäuresequenz abdecken.

Damit die 484 Aminosäuren lange Sequenz des listeriellen P60-Proteins im synthetischen Maßstab in nur einem Arbeitsschritt auf die Membran gespottet werden konnten, musste durch Optimierung der Spezifikationen des Pipettierroboters, die maximal mögliche Anzahl von 384 auf 486 Spots pro Membran gesteigert werden.

Die entsprechend modifizierte Konfigurationsdatei „18x27.xyz“ für die Ansteuerung der Dispositions-nadel des Abimed ASP 222 Pipettierroboters wurde im Ordner „C:\Abimed\Daten\Mio“ abgespeichert und ist in 4.2.3.2. (Abb. 11) beschrieben.

5.2.3. Epitopmapping

An Hand der produzierten Filter können aus einem polyklonal Antikörpergemisch diejenigen Antikörper herausselektiert werden, die hochspezifisch mit größtmöglicher Intensität an das P60 binden (Kohler, et al. 1990). Am Beispiel von IgA aus humaner Muttermilch und IgY aus den Eiern von mit *L. monocytogenes* P60 immunisierten Hühnern wurde eine immunologische Landkarte des P60-Proteins generiert. Im Anhang findet sich eine Immunitätskarte mit der Zusammenfassung aller Ergebnisse aus Untersuchungen von z.B. IgG aus Humanseren, IgA aus humaner Muttermilch, IgY aus den Eiern von mit *L. monocytogenes* P60 immunisierten Hühnern, IgG aus *L. monocytogenes* P60 immunisierten Kaninchen, z.T. auch Ziegen und Antiserum aus *L. monocytogenes* infizierten Mäusen.

5.2.3.1. Seroanalyse mit humanen Antikörpern

Zum einen besitzen gesunde Menschen, die noch keine Listeriose durchgemacht hatten, Antikörper die mit konservierten bzw. variablen P60 Epitopen aller Listerienarten kreuzreagieren.

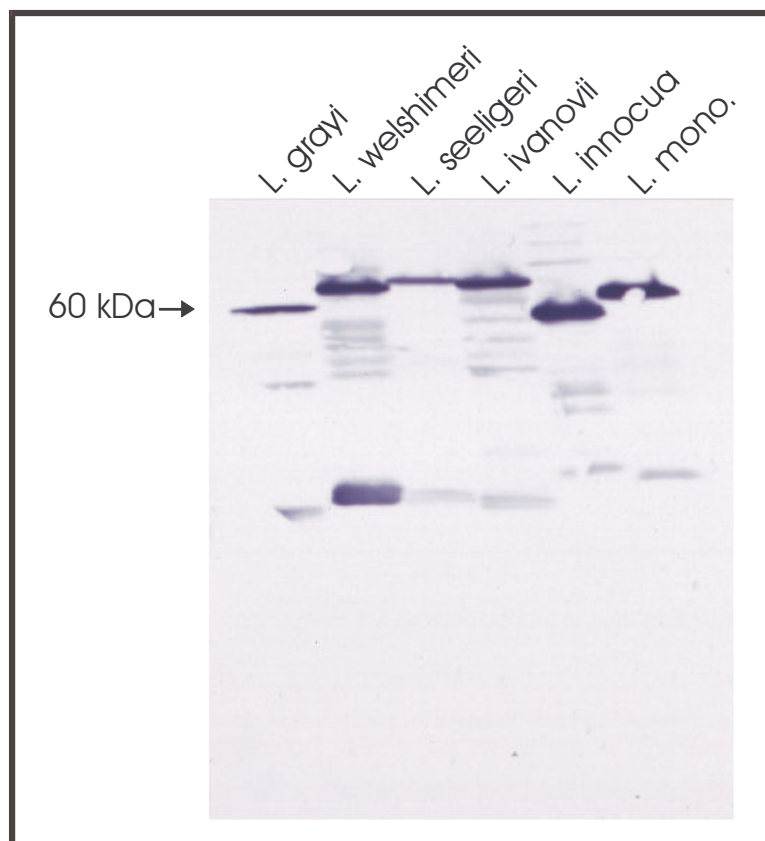


Abb. 28: Reaktivität der Seren gesunder Individuen gegen listerielle Überstandsproteine. Die Seren wurden 1:200 verdünnt; als sekundärer Antikörper diente α -human IgG (HRP-markiert; 1: 500).

Obwohl diese Individuen somit noch keine Gelegenheit hatten in Folge einer Infektion mit *L. monocytogenes* eine spezifische Immunantwort auf *L. monocytogenes* auszubilden, werden kreuzreaktive *L. monocytogenes*-P60-Epitope erkannt.

Zum anderen existieren weitere Epitope, die nur von α -*L. monocytogenes*-P60 Kaninchenserum, nicht jedoch von Seren gesunder Testpersonen erkannt werden. Obwohl es nicht zur Anbindung der Antikörper an diese *L. monocytogenes*-spezifischen Bereiche kommt, findet diese jedoch bei *L. innocua*-spezifischen Bereichen statt. Bei einem Infekt werden sowohl *L. mono-cytogenes*, als auch *L. innocua*-spezifische Antikörper induziert.

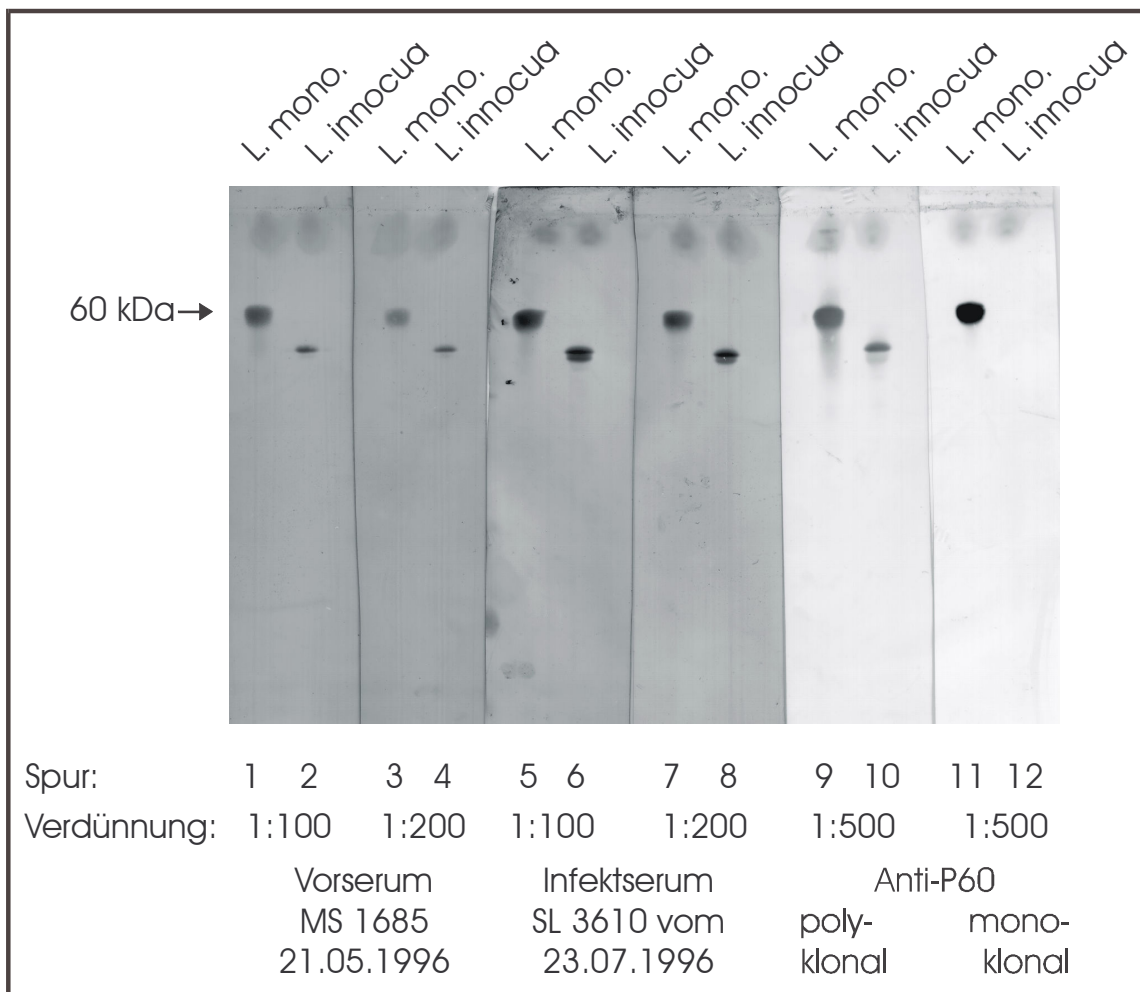


Abb. 29: Kreuzreaktivität eines Humanserums vor (Spur 1-4) und nach Infektion mit *L. monocytogenes* (Spur 5-8). Kontrolle: Spur 9 und 10: polyklonales α -P60-Serum; Spur 11 und 12 monoklonaler α -P60-Antikörper. Es wurden je 2 μ g P60 aus *L. monocytogenes* und *L. innocua* aufgetragen. Seren wurden in den Verdünnungsstufen 1:100 bzw. 1:200 und die Gattungs- bzw. Spezies-spezifischen Antikörper 1:500 eingesetzt. Die in der Kontrolle verwendeten Antikörper wurden von MERCK Darmstadt KGaA als Gattungs- bzw. Spezies-Nachweis-ELISA „PATHALERT“ auf den Markt gebracht.

Indem Filter, die das gesamte P60 von *L. monocytogenes* bzw. *L. innocua* als um jeweils eine Aminosäure versetzte Dekapeptide enthalten, vor jeder erneuten Inkubation mit einem weiteren Serum gestrippt wurden, konnte folgende Immunitätslandkarte generiert werden:

Immunitätskarte mit humaner Muttermilch

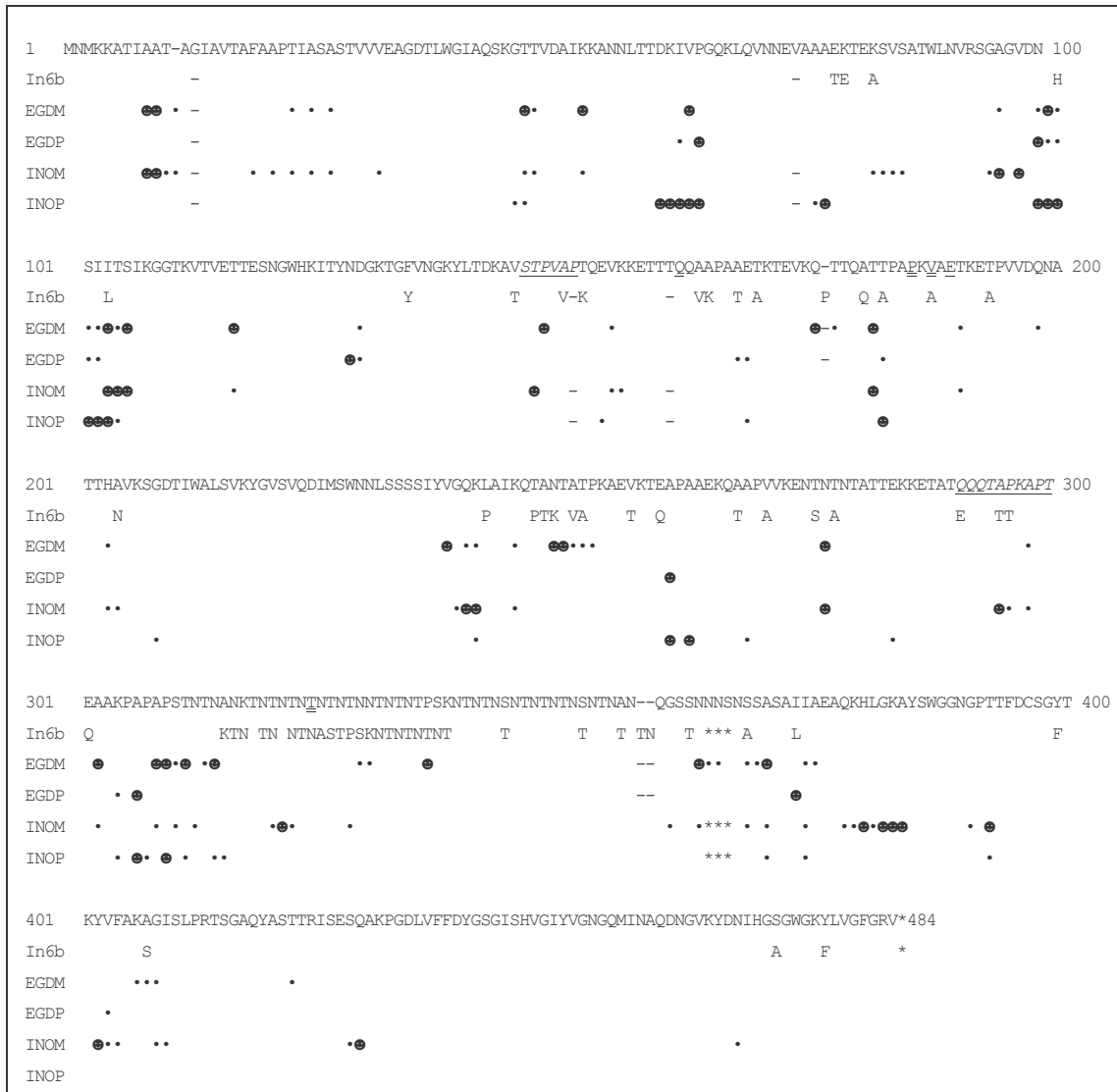


Abb. 30: Mittels Epitopmapping identifizierte Epitope des LM-P60 und LI-P60, die von IgA aus humaner Muttermilch erkannt werden.

5.2.3.2. Seroanalyse mit Hühnereierantikörpern IgY

Auch wurden eine Epitopkarte mit Antikörpern erstellt, die aus Eidottern von Hühnern gewonnen wurden, welche zuvor mit *L. monocytogenes* Gesamt-P60 immunisiert und zwei Mal geboostet worden waren:

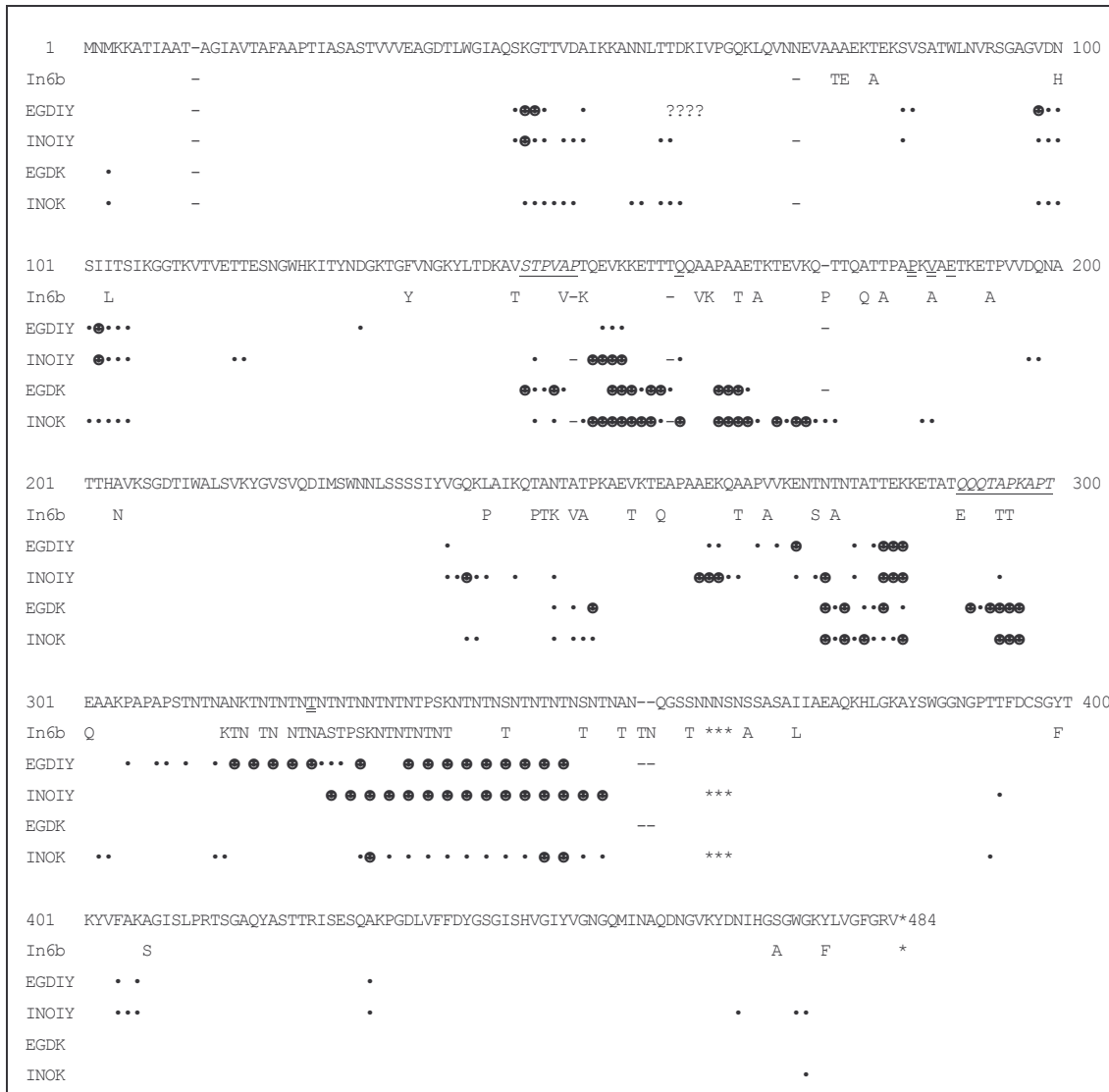


Abb. 31: Mittels Epitopmapping identifizierte Epitope des LM-P60 und LI-P60 die von IgY aus dem Eidotter von *L. monocytogenes*-P60 immunisierten Hühner erkannt werden.

Hieraus ließen sich spezifische Sequenzen ableiten, die zur Induktion spezifischer IgY-Antikörper dienen könnten, mit denen das *L. monocytogenes* P60 gegenüber dem *L. innocua* P60 diskriminiert werden sollte.

5.2.4. Antikörperisolierung aus Hühnereiern

Die in Folge gewonnenen IgY-Fractionen, wurden im Western-Blot auf ihre Spezifität gegenüber *L. monocytogenes* (EGD) bzw. *L. innocua* Überstandsprotein untersucht.

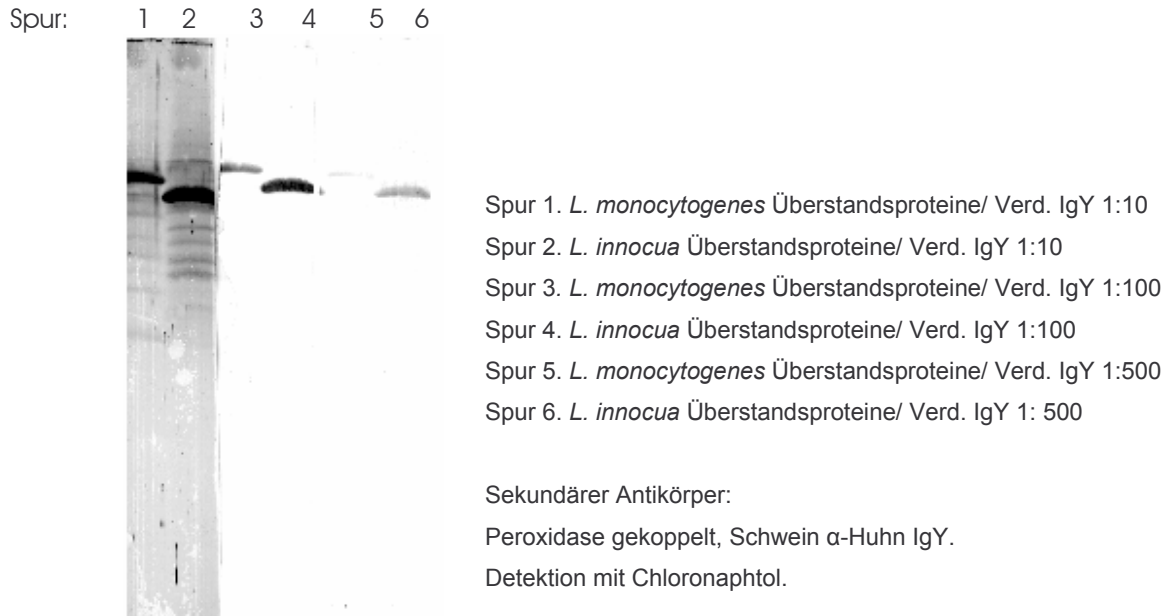


Abb. 32: Western-Blot der Ino A IgY-Dotterantikörper gegen das Peptid Ino A aus *L. innocua* P60.

Da der Antikörper InoA stärker mit *L. innocua*-, als mit *L. monocytogenes*-Überstandprotein reagiert (Spur 1/2 bzw. 3/4) kann durch Variieren der Verdünnung ein Bereich gewählt werden, bei dem nur mehr *L. innocua*- nicht jedoch *L. monocytogenes*-Überstandsprotein erkannt wird (vgl. Spur 5/6). Dies ist Voraussetzung für die Entwicklung eines *L. innocua* -spezifischen Antikörperrnachweises.

5.2.5. Suche nach CD4 T-Zellen im Mausmodell und deren Charakterisierung

In Zusammenarbeit mit Dr. Gernot Geginat vom Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene an der Fakultät für Klinische Medizin Mannheim der Universität Heidelberg wurden P60-spezifische T-Zellklone erzeugt und charakterisiert, sowie auf ihre protektive Wirkung hin untersucht (Geginat et al. 1998, 1999).

5.2.5.1. Gewinnung und Charakterisierung P60-spezifischer T-Zell Klone

Zunächst wurden Milzzellen aus BALB/c Mäusen, die i.p. mit 5×10^3 CFU *L. monocytogenes* infiziert und zwei Wochen später mit 1×10^6 CFU immunisiert wurden, nach einer weiteren Woche gewonnen. In einem IL-2-Assay konnte die konzentrationsabhängige Aktivierung (zwischen $25 \mu\text{g/ml}$ und $0,2 \mu\text{g/ml}$) durch die Zugabe von P60 aus *L. monocytogenes* oder *L. innocua* bzw. HKL gezeigt werden. Dabei fiel die P60-spezifische Immunantwort bei $25 \mu\text{g/ml}$ vergleichbar stark wie mit HKL aus.

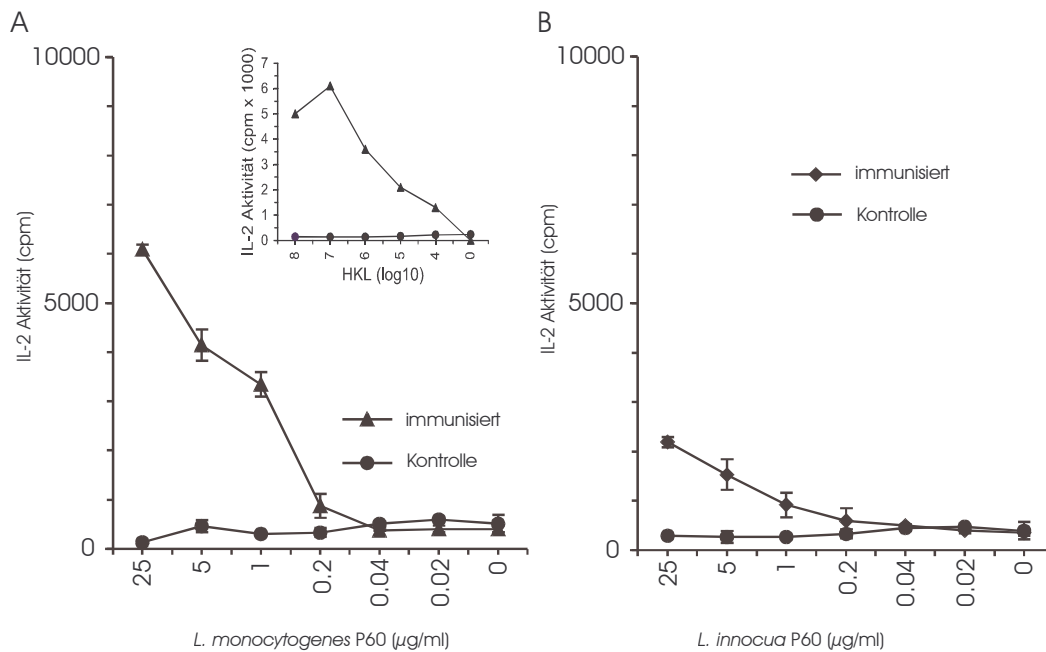


Abb. 33: Milzzellen aus mit *L. monocytogenes* immunisierten (Dreiecke) oder unbehandelten (Kreise) BALB/c Mäusen wurden mit P60 von (A) *L. monocytogenes* bzw. (B) *L. innocua* bzw. HKL (eingesetzt in (A)) aktiviert. Die relative IL-2-Aktivität im Kulturüberstand wurde mittels Messung des [³H]-Thymidin-Einbaus in IL-2 abhängigen HT-2 Zellen bestimmt. Die Ergebnisse geben den Mittelwert cpm ± SD von je drei Versuchen wieder.

Im Weiteren wurden einzelne T-Zellklone durch Verdünnung und spezifische Stimulation mit gereinigtem P60 in Gegenwart von inaktivierten Helfer-Zellen selektiv angezüchtet. Ihre Proliferation in Abhängigkeit von der P60-Konzentration wurde mittels [³H]-Thymidineinbau detektiert.

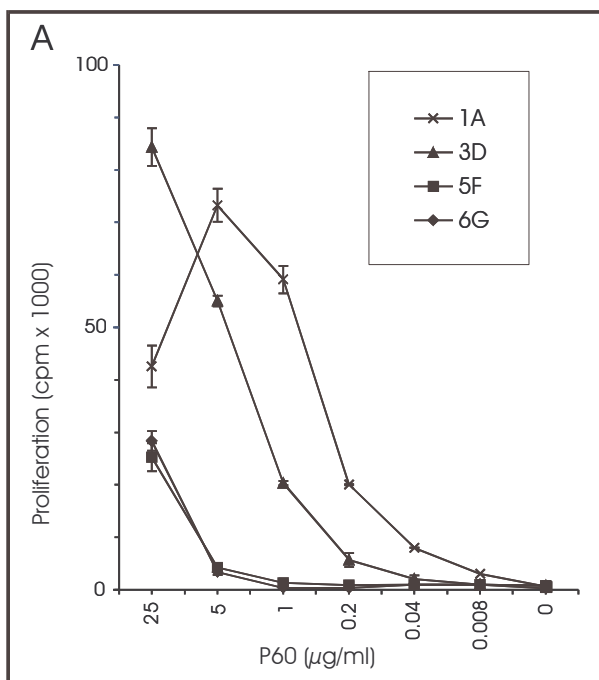


Abb. 34: Induktion der Proliferation von T-Zellen nach Zugabe verschiedener Mengen an gereinigtem P60.

Die höchste P60-Sensitivität hatte Klon 1A, der bereits bei einer Konzentration von 0,04 µg/ml P60 einen signifikanten Anstieg zeigte, während Klon 3D eine 5-fach höhere Menge an P60 benötigte. Bei den Klo-

nen 5F und 6G war bei 5 $\mu\text{g/ml}$ P60 eine signifikante Proliferation zu beobachten. Die Sensitivität für P60 konnte durch die Zugabe von 20 U rmlL-2 nicht weiter erhöht werden (Daten nicht gezeigt). Mit Hilfe von syngenen BALB/c (H-2^d) bzw. allogenen C57Bl/6 (H-2^b) oder C3H (H-2^k) Milzzellen in Gegenwart oder Abwesenheit von P60 konnte die MHC-Klassen-Zugehörigkeit bestimmt werden (Abb. 36 B). Betrachtet man den Stimulationsindex (SI= das Verhältnis aus dem [³H]-Thymidineinbau mit und ohne P60), wurden in Gegenwart syngener Milzzellen alle Klone deutlich induziert (1A 30-fach und 6G 120-fach), während mit allogenen Milzzellen die Induktion minimal ausfiel (nur Faktor 1,5 bis 4).

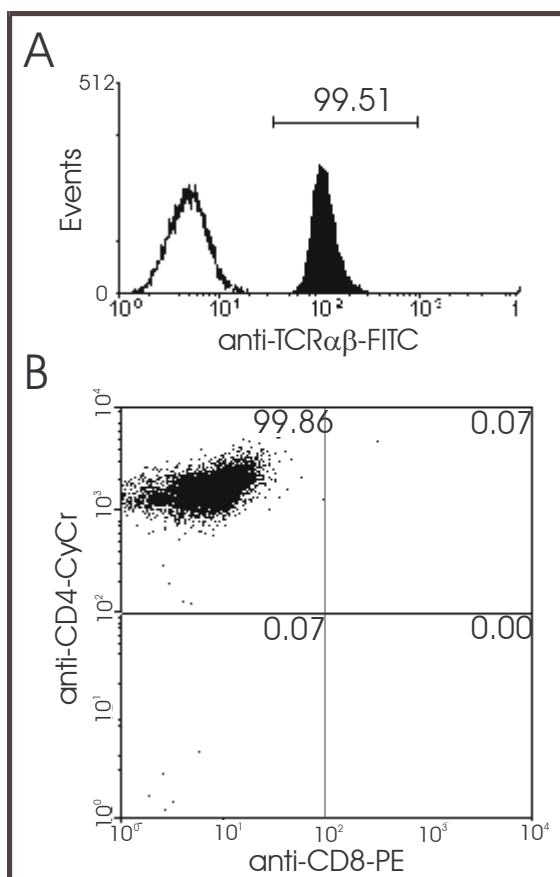


Abb. 35:

FACS-Analyse des P60-spezifischen T-Zell-Klons 1A nach Markierung mit entsprechend markierten monoklonalen Antikörpern TCR (FITC), CD4 (CyCr) und CD8 (PE). A: Übereinandergelagerte Histogramme mit spezifischer (schwarz ausgefüllt) TCR-, CD4- und CD8-Markierung bzw. unspezifischer Isotopen-Kontrollmarkierung (weißes Histogramm). B: Untersuchung der TCR-positiven Zellen auf Expression von CD4 und CD8 (TCR+, CD4+, CD8-)

Die FACS-Analyse von Klon 1A mit $\alpha\text{-TCR}\alpha\beta\text{-FITC}$, $\alpha\text{-CD4PE}$ und $\alpha\text{-CD8CyCr}$ ergab einen strikten $\text{TCR}\alpha\beta^+$ $\text{CD4}^+\text{CD8}^-$ Phänotyp. Während mit der FITC-gelabelten Kontrolle keine unspezifische Markierung nachzuweisen war (Abb. 35 A, weißes Histogramm), zeigten über 99% aller Zellen den $\text{TCR}\alpha\beta^+$ -Phänotyp (Abb. 35 A, schwarzes Histogramm). Von diesen sortierten $\text{TCR}\alpha\beta^+$ -Zellen waren fast 100% $\text{CD4}^+\text{CD8}^-$ (Abb. 35 B). Auch die andere T-Zell-Klone 3D, 5F und 6G zeigten zu über 98% den $\text{TCR}\alpha\beta^+$ $\text{CD4}^+\text{CD8}^-$ Phänotyp.

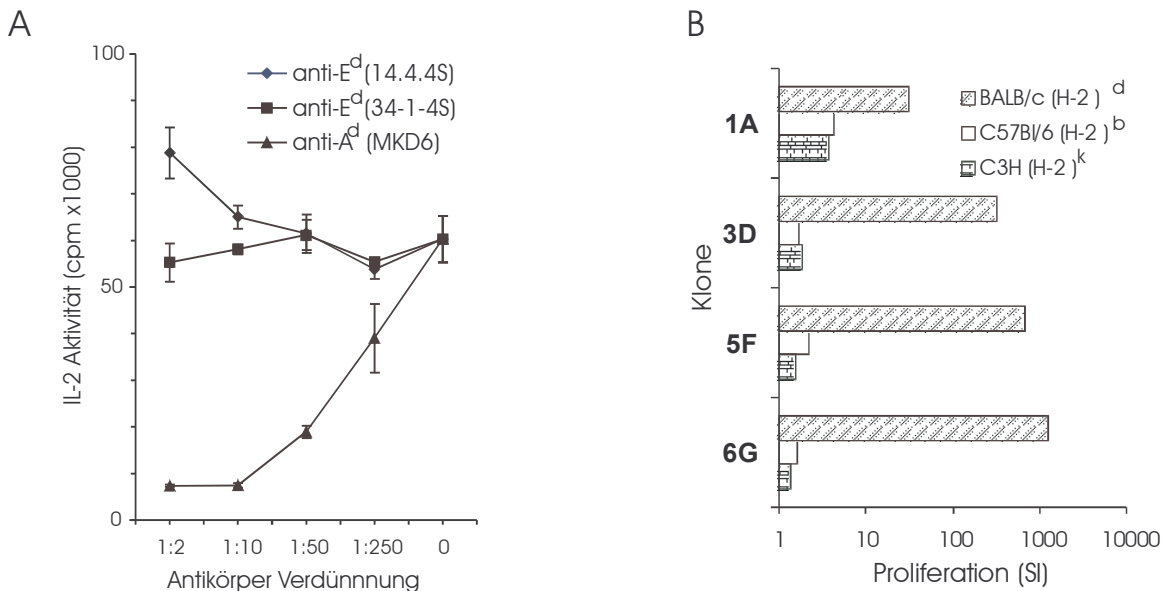


Abb. 36: A: MHC Restriktion: Die Proliferation des TH1-Klons A1 wurde durch Zugabe verschiedener Verdünnungsstufen α -A^d spezifischer (Klon MKD6) oder α -E^d spezifischer (Klon 14.4.4S oder Klon 34-1-4S) monoklonaler Antikörper geblockt. Die akzessorischen Zellen wurden zuvor ÜN mit 5 μ g/ml gereinigtem P60 stimuliert. Sechs Stunden nach Induktion wurde die IL-2-Aktivität im Überstand bestimmt. Die Ergebnisse geben den Mittelwert cpm \pm SD von drei Versuchen wieder.
 B: Die verschiedenen T-Zellklone wurden mit 25 μ g/ml gereinigtem P60 und akzessorischen Milzzellen aus syngenem BALB/c (H-2^d) oder allogenen C57Bl/6 (H-2^b) bzw. C3H (H-2^k) Mäusen (nach Mitomyzine C-Inaktivierung) stimuliert.

Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass eine *L. monocytogenes*-Infektion bei BALB/c Mäusen P60-spezifische, H-2^d-resstringierte TCR $\alpha\beta$ ⁺ CD4⁺ CD8⁻ Zellen induziert, die nicht mit HKL kreuzreagieren.

5.2.5.2. Zytokinproduktion P60-spezifischer T-Zell Klone

Tab. 4: Die Interleukinproduktion der P60-spezifischer T-Zellklone 1A, 3D, 5F und 6G

Klone	Stimulation ¹	Interleukinproduktion (pg/ml) ²			
		IFN- γ	IL-2	IL-4	IL-10
1A	+P60	25200 \pm 3248	6436 \pm 393	116 \pm 12	188 \pm 17
	Kontrolle	3320 \pm 392	<40	<40	80 \pm 6
3D	+P60	18124 \pm 480	5876 \pm 420	<40	5768 \pm 336
	Kontrolle	604 \pm 60	<40	<40	89 \pm 12
5F	+P60	19200 \pm 2120	320 \pm 49	82 \pm 20	432 \pm 93
	Kontrolle	348 \pm 40	<40	<40	100 \pm 8
6G	+P60	18896 \pm 1204	78 \pm 9	<40	204 \pm 24
	Kontrolle	172 \pm 20	<40	<40	112 \pm 16
neg. Kontr.	+P60	<40	<40	<40	<40

¹Geklonete CD4⁺ T-Zellen (0,1x10⁶ Zellen/Well) inkubierte man mit 0,4x10⁶ inaktivierten akzessorischen Zellen und 25 μ g/ml gereinigtem P60 (+P60) oder ohne P60 (Kontrolle).

²Nach 24 Stunden wurde die Zytokin-Konzentration im Überstand mit Hilfe von IFN- γ , IL-2, IL-4 und IL-10 spezifischen ELISAs bestimmt. Die Werte wurden unter Berücksichtigung der Verdünnungsstufe aus Zweieransätzen gemittelt und mit SD angegeben. CD4-T-Zellen lassen sich anhand der von Ihnen produzierten Zytokine in TH1 und TH2 unterteilen (Mosmann und Coffman 1989). Durch die Bestimmung des Gehalts an INF- γ , IL-2, IL-4 und IL-10 im Zell-

kulturüberstand mit Hilfe eines Sandwich-ELISAs konnten die P60-spezifischen CD4⁺ T-Zellklone genauer typisiert werden (Tab. 4).

In Abhängigkeit ihrer Interleukinproduktion ließen sich folgende Gruppierungen festhalten:

IFN- γ , 1A > (5F > 6G > 3D); IL-2, (1A > 3D) > (5F > 6G); IL-4, (1A > 5F); IL-10, 3D > (5F > 6G > 1A)

Somit zeigen alle Klone das für TH1-Zellen typische Interleukinmuster: sehr viel IFN- γ und nur sehr wenig oder kein IL-4.

5.2.5.3. P60-spezifische TH1-Klone lysieren *L. monocytogenes*-infizierte Makrophagen

Zur Untersuchung der zytolytischen Aktivität der CD4⁺ T-Zellklone wurden P60-spezifische CD4⁺ T-Zellen in einem vierstündigen ⁵¹Cr-Freisetzungstest mit *L. monocytogenes*-infizierten Knochenmarksmakrophagen untersucht.

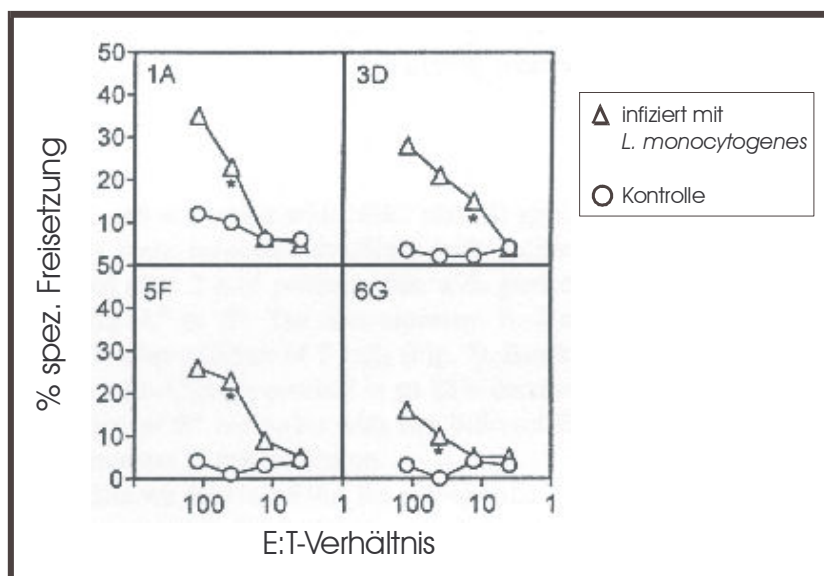


Abb. 37: P60-spezifische TH1-Klone lysieren *L. monocytogenes*-infizierte Mausemakrophagen. *L. monocytogenes*-infizierte (Dreiecke) oder nicht infizierte (Kreise) Knochenmarksmakrophagen dienten als Zielzellen in einem vierstündigen Standard ⁵¹Cr Freisetzungstest mit den Klonen 1A, 3D, 5F und 6G als Effektorzellen (im Effektor/Target (E:T)-Verhältnis 120:1, 40:1, 12:1 und 4:1). Die spezifische Lyse ist als Mittelwert dreier Versuche (in%) dargestellt, nach Abzug der spontanen Freisetzung i.H.v. 23%. Die Sterne zeigen das niedrigste E:T-Verhältnis an, bei dem es zu einer signifikanten Lyse der Zielzellen kam ($p < 0,05$ nach dem Neuman-Keuls-Vergleichstest).

Wie in Abb. 37 gezeigt, waren alle P60-spezifischen TH1-Klone in der Lage, spezifisch *L. monocytogenes*-infizierte syngene Zielzellen zu lysieren, wobei der E:T-Quotient zwischen 120:1 und 4:1 lag. Eine Lyse uninfizierter Makrophagen konnte nicht beobachtet werden.

5.2.5.4. TH1-Klon 1A erkennt MHC-Klasse II H-2A^d-restringiert P60₃₀₁₋₃₁₂

CD4 T-Zellen erkennen kurze – in der Regel 12-14 Aminosäuren lange – Peptidbruchstücke, die an MHC-Klasse II-Molekülen auf der Oberfläche von antigenpräsentierenden Zellen exponiert werden.

Mittels einer durch Epitopmapping generierten Peptidbibliothek aus 94, einander um je fünf Aminosäuren überlappenden 20mer-Peptiden, die den gesamten Bereich des P60-Proteins abdecken, wurden zunächst in einem IL-2-Aktivitäts-Assay der spezifische Bereich für Klon 1A bestimmt. In Gegenwart von akzessorischen Zellen und HT-2 Zellen induzierte das 20-mer P60₂₉₆₋₃₁₅ (PKAPTEAAKPAPAPSTNTNA) als Einziges von allen 94 Fraktionen eine hohe IL-2-Aktivität und starke T-Zell-Proliferation.

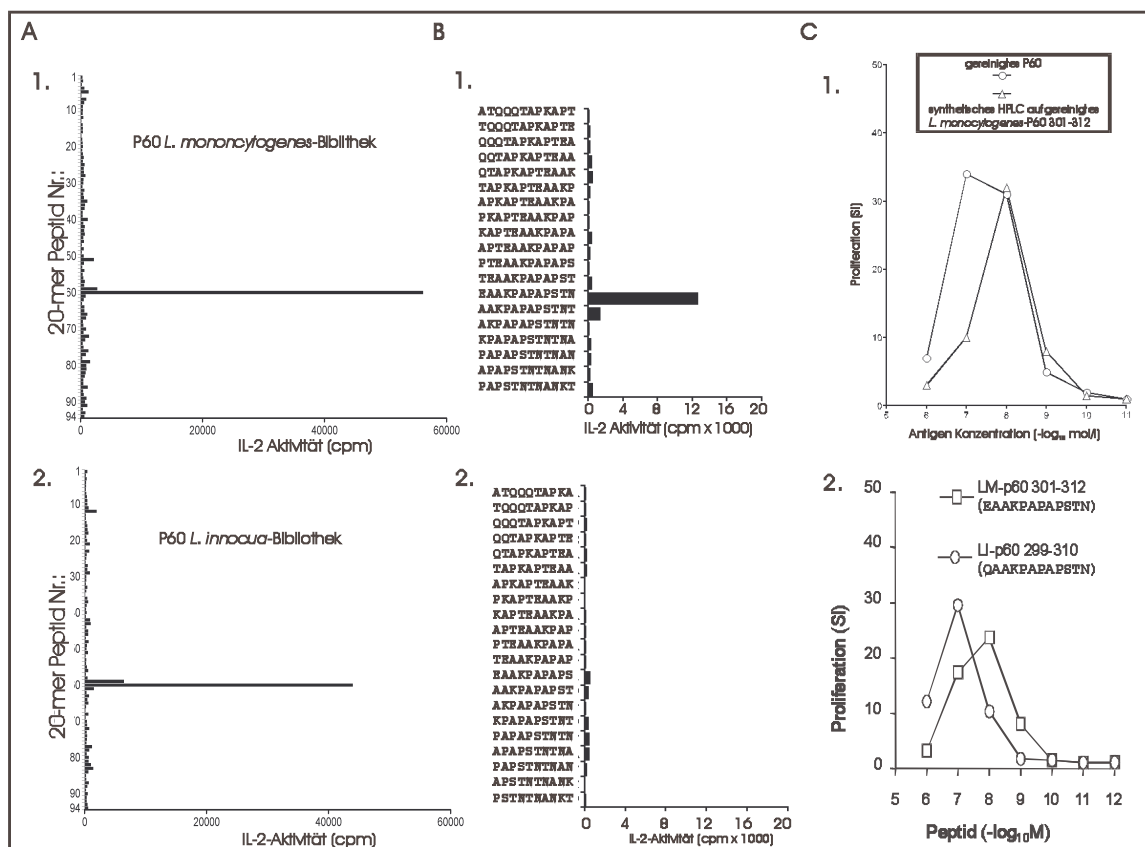


Abb. 38: EPITOP-SPOT-Mapping des P60-spezifischen Klons 1A.

A. Zunächst wurde der Bereich mit einer Bibliothek aus 94 überlappenden (um fünf AS versetzt, d.h. #1: p60 1-20, #2 p60 16-35 ...) 20mer-Peptiden, welche die gesamte Sequenz des (1.) LM- bzw. (2.) LI-P60 abdeckten, durch Bestimmung der IL-2-Aktivität eingegrenzt.

B. Der identifizierte Bereich PKAPTEAAKPAPAPSTNTNA (P60₂₉₆₋₃₁₅) wurde entsprechend mit einer (1.) Dodekamer- bzw. (2.) Dekamer-Bibliothek mit je einer Aminosäure Versatz genauer untersucht.

C. Das so identifizierte Epitop P60₃₀₁₋₃₁₂ wurde mit Hilfe eines HPLC aufgereinigten neu synthetisierten Peptides (1.) des LM-P60₃₀₁₋₃₁₂ bzw. (2.) des LI-P60₂₉₉₋₃₁₀ bestätigt. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte von jeweils drei Versuchen.

Interessanter Weise zeigte sich auch mit dem entsprechenden 20mer von *L. innocua* eine deutliche, wenn auch schwächere IL-2-Aktivität (Abb. 38 A2, vgl. auch Abb. 33, Abb. 38 C2 und 5.2.5.6.). Mit Hilfe von Dodekamer- und Dekamerbibliotheken, die den Bereich des P60 von 289 bis 318 umfassten, konnte das Peptid EAAKPAPAPSTN (P60₃₀₁₋₃₁₂) aus der Dodekamerbibliothek als alleiniges biologisch aktives Epitop identifiziert werden (Abb. 38 B1).

Keines der Dekamerpeptide, die, um jeweils eine Aminosäure versetzt, ebenfalls diesen Bereich abdecken, konnte IL-2 induzieren (Abb. 38 B2). Die Spezifität von Klon 1A für dieses Epitop konnte mit Hilfe eines neu synthetisierten HPLC-gereinigten Peptids (mit der zuvor bestimmten Sequenz P60₃₀₁₋₃₁₂) verifiziert werden. Bereits 1×10^{-9} mol/l dieses Peptides oder aufgereinigtes P60-Gesamtprotein waren für die Aktivierung von Klon 1A ausreichend, während keiner der anderen Klone auf das Peptid P60₃₀₁₋₃₁₂ reagierte (Daten nicht gezeigt).

MHC-Klasse II positive BALB/c Zellen können sowohl A^d als auch E^d Moleküle exprimieren. Die MHC-Klassen-Restriktion von Klon 1A wurde durch die Hemmung der T-Zell-Aktivierung mittels MHC-Klasse II-spezifischer, monoklonaler Antikörper bestimmt. Dazu wurden die T-Zellen zwei Stunden mit unterschiedlichen Dosen der monoklonalen Antikörper gegen A^d oder E^d vorinkubiert und zu akzessorischen Zellen gegeben, die ÜN mit gereinigtem P60 vorbehandelt worden waren. In Abb. 36 A ist die IL-2-Aktivität im ÜS der T-Zellen nach sechs Stunden dargestellt. Während das Blocken der A^d-Antikörper mit monoklonalen α -A^d-Antikörpern zu einem 88%-igem Rückgang der IL-2-Aktivität führte, zeigte das Blocken der E^d-Moleküle mit zwei verschiedenen E^d-spezifischen monoklonalen Antikörpern keinen Einfluss. Daraus lässt sich ableiten, dass der P60-spezifische T-Zellklon 1A H-2^d-restringiert ist und ein Peptid mit der Sequenz P60₃₀₁₋₃₁₂ erkennt.

5.2.5.5. P60-spezifische TH1-Klone sind protektiv *in vivo*

Bisher galten zytolytische CD8 T-Zellen, die spezifisch bakterielle Überstandsproteine erkennen können, als hauptverantwortlich für die erworbene Immunität gegen *L. monocytogenes*. Durch den Transfer P60-spezifischer CD4 T-Zellklone sollte daher das protektive Potential P60-spezifischer TH1 Zellen untersucht werden. Nach Injektion i.v. von 1×10^7 P60-spezifischer CD4-Zellen wurden die Mäuse mit 1×10^4 CFU *L. monocytogenes* i.v. infiziert. 72 Stunden nach Infektion wurde der Gehalt an Listerien (als CFU) in der Milz und der Leber bestimmt (Abb. 39). Die protektive Wirkung in der Milz war bei allen T-Zellklonen zu beobachten: der Unterschied in der log₁₀ CFU betrug 2,32 (Klon 1A), 0,73 (Klon 3D), 2,09 (Klon 5F) bzw. 1,74 (Klon 6G). Die Zahl der Bakterien in der Leber, wurde - im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle - nur bei

Klon 1A ($0,65$, $p < 0,05$) und Klon 5F ($1,33$, $p < 0,05$) signifikant reduziert, während bei Klon 3D ($p = 0,07$) und Klon 6G ($p = 0,08$) keine signifikante Reduktion zu beobachten war.

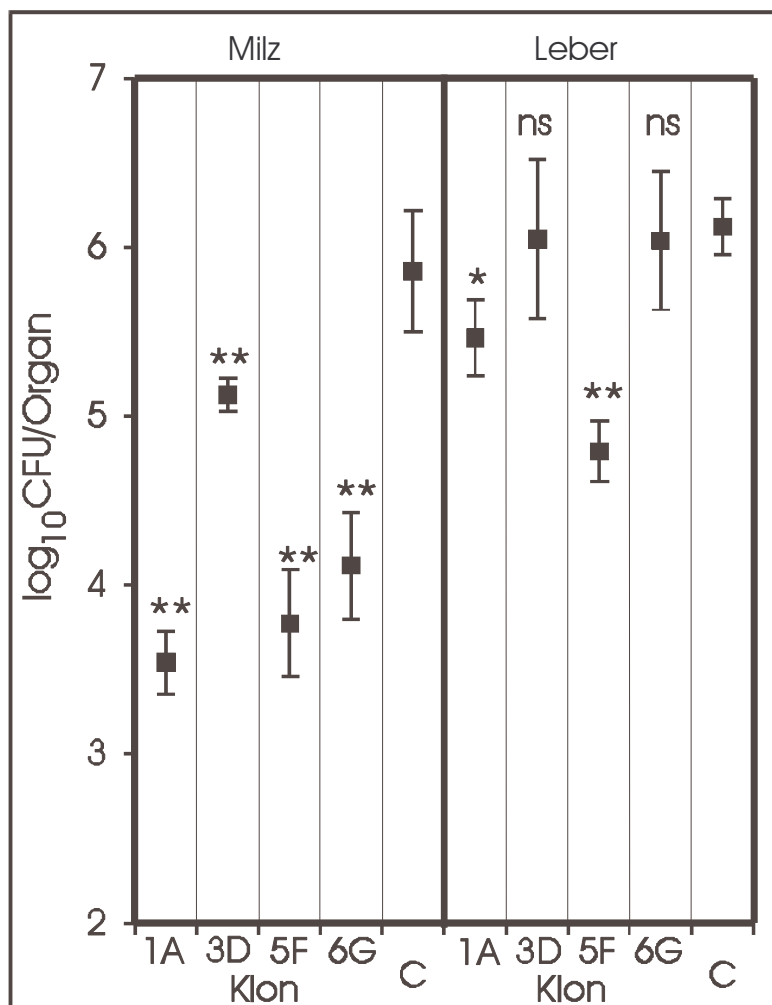


Abb. 39: Darstellung der Reduktion der *L. monocytogenes* Keimzahl in Milz und Leber von *L. monocytogenes* infizierten BALB/C Mäusen. Die BALB/C Mäuse erhielten i.v. 1×10^7 P60-spezifischen CD4-T-Zellen, bevor sie i.v. mit 1×10^4 CFU mit *L. monocytogenes* infiziert wurden, während die Kontrollgruppe (C) unbehandelt blieb. Nach 72 Stunden wurde die Keimzahl in Milz und Leber bestimmt. Während in der Milz alle P60-spezifischen T-Zellklone die Keimzahl signifikant (**) reduzieren konnten, war in der Leber nur Klon 5F in der Lage eine adaptive Immunität gegen Infektionen mit *L. monocytogenes* zu vermitteln.

Dadurch konnte gezeigt werden, dass individuelle TH1-Zelllinien mit Spezifität gegen das P60-Überstandsprotein oder definierte P60-Epitope zu einem signifikanten Schutz gegen *L. monocytogenes* *in vivo* beitragen können.

5.2.5.6. Kreuzreaktivität LM-P60-spezifischer T-Zellklone mit LI-P60

Auf Grund der über 90%-igen Homologie zwischen dem LM-P60 und LI-P60 (Bubert et al. 1992) sollte kontrolliert werden, ob *L. monocytogenes*-spezifische CD4 mit LI-P60 kreuzreagieren. Dazu wurden verschiedener T-Zellklone mit inaktivierten Milzzellen in Gegenwart von unterschiedlichen Mengen an gereinigtem LM-P60 und LI-P60 kultiviert.

Alle Klone zeigten eine *L. monocytogenes*-spezifische Proliferation (Abb. 40, weiße Balken), während nur die Klone 1A und 3D von LI-P60 induziert wurden. Am stärksten reagierte Klon 1A auf das LI-P60. Die von Klon 1A erkannte Sequenz LM-P60₃₀₁₋₃₁₂ EAAKPAPAPSTN war zwischen den beiden Spezies stark konserviert. Daher wurde auch eine Dekamer- und eine Dodekamer- Peptidbibliothek der entsprechenden LI-P60-Region generiert. Die auf einer Filtermembran synthetisierten Peptide umfassten den LI-P60-Bereich von 289-318 mit einer Überlappung von jeweils einer Aminosäure.

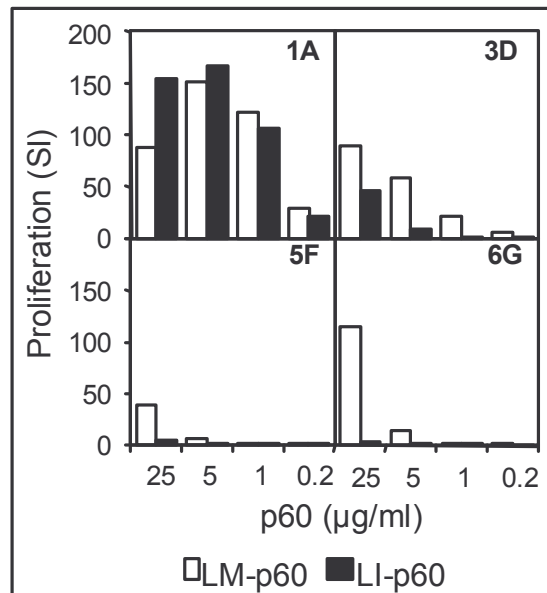


Abb. 40: Die T-Zellaktivierung wurde mittels H^3 -Thymidineinbau gemessen und als SI (stimulation index) dargestellt.

Mit Hilfe des abspaltbaren Ankers wurden die Peptide abgelöst und isoliert zu den LM-P60-spezifischen T-Zellen gegeben. Lediglich das Peptid QAAKPAPAPSTN (LI-P60₂₉₉₋₃₁₀) aus der Dodekamerbibliothek war biologisch aktiv (Abb. 38 B2.). Keines der Dekamere führte zu einer Aktivierung. Dieses Ergebnis wurde durch ein neu synthetisiertes, HPLC-gereinigtes LI-P60-Peptid mit der Sequenz 299-310 in einem Proliferations-Assay mit Klon 1A verifiziert. Interessanter Weise fiel die Erkennung des LI-P60₂₉₉₋₃₁₀ etwa 5-10-fach schwächer aus, als die von LM-P60₃₀₁₋₃₁₂, obwohl das Gesamt-P60 beider Spezies eine ähnlich starke Wirkung zeigte (Abb. 40 bzw. Abb. 38 C). Dies führt zu der Annahme, dass einige LM-P60 spezifische CD4-T-Zellklone mit dem, aus der nicht pathogenen Spezies *L. innocua* stammenden LI-P60 kreuzreagieren können. Insbesondere das von Klon 1A erkannte Epitop ist im P60 der beiden Spezies funktionell konserviert (LM-P60₃₀₁₋₃₁₂: EAAKPAPAPSTN / LI-P60₂₉₉₋₃₁₀: QAAKPAPAPSTN).

5.2.5.7. Unterschiede in der P60-Antikörperpräsentation von *L. monocytogenes* und *L. innocua* infizierten Makrophagen

Die Induktion von T-Helferzellen oder zytotoxischen T-Zellen ist abhängig von dem Zugang der Antigene zu den entsprechenden Antigenpräsentationswegen (Germain 1994). Nach der bisher allgemein vertretenen Ansicht erfolgt die Immunreaktion, auf Grund der LLO-vermittelten Flucht von *L. monocytogenes* aus dem Phagolysosom in das Zytosol, in erster Linie über MHC-Klasse I Moleküle (Portnoy und Jones

1994). Unterschiede in der Antigenpräsentation zwischen *L. monocytogenes*- und *L. innocua*-infizierten Zellen sollten über die genauen Abläufe näher Aufschluss geben.

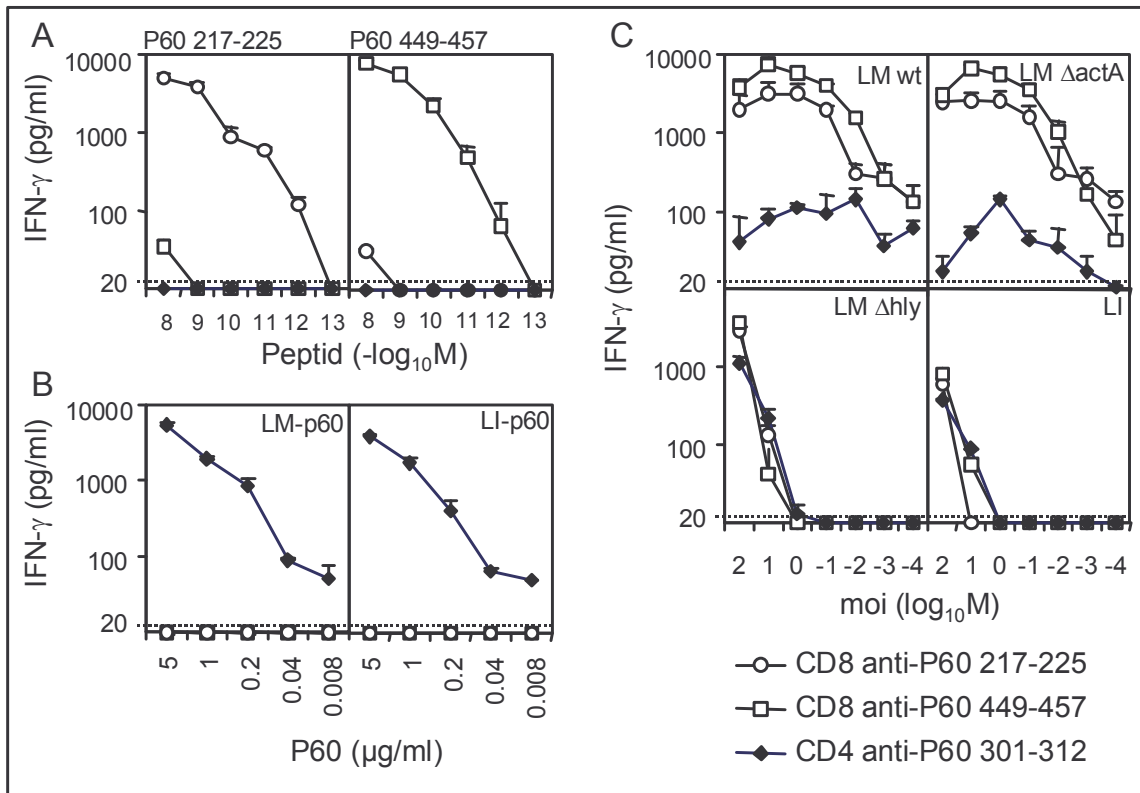


Abb. 41: P60-AG-Präsentation von P388D₁-Zellen nach Infektion mit *L. monocytogenes* oder *L. innocua*. P60₃₀₁₋₃₁₂ spezifische CD4-T-Zellklone (Rauten), P60₂₁₇₋₂₂₅ spezifische CD8-T-Zellklone (Kreise) bzw. P60₄₄₉₋₄₅₇ spezifische CD8-T-Zellklone (Quadrate) wurden mit P388D₁-Zellen inkubiert. Die APZ wurden zunächst A: mit P60₂₁₇₋₂₂₅ bzw. P60₄₄₉₋₄₅₇ oder B: mit LM-P60 bzw. LI-P60 inkubiert, oder C: mit dem *L. monocytogenes*-Wildtyp (LMwt), der $\Delta actA$ - bzw. Δhly -Deletionsmutante (LM $\Delta actA$ bzw. LM Δhly) oder mit *L. innocua* (LI) infiziert. Die Antigenprozessierung wurde sechs Stunden später durch Fixieren mit 1% Paraformaldehyd abgestoppt. Schließlich wurden die APZ zu den T-Zellklonen gegeben und deren Aktivierung durch Messung der INF- γ Konzentration (pg/ml) im Überstand bestimmt. Die Ergebnisse und die SD stammen aus drei unabhängigen Versuchen. Die gepunktete Linie bei 20 pg/ml repräsentiert die Nachweisgrenze des INF- γ -ELISAs.

Die Interaktion *Listeria*-infizierter Makrophagen-ähnlicher P388D₁-Zellen mit LM-P60₃₀₁₋₃₁₂-spezifischen CD4- (Geginat et al. 1998) und LM-P60₂₁₇₋₂₂₅- bzw. LM-P60₄₄₉₋₄₅₇-spezifischen CD8-T-Zellen (Sijts et al. 1996) wurde an Hand der INF- γ Sekretion in den Kulturüberständen untersucht.

Mit LM-P60₂₁₇₋₂₂₅ bzw. LM-P60₄₄₉₋₄₅₇ vorinkubierte P388D₁-Zellen wurden konzentrationsabhängig von den entsprechenden peptidspezifischen CD8 T-Zellen erkannt; jedoch überhaupt nicht von den P60-spezifischen CD4 T-Zellklonen (Abb. 41 A). Mit LM-P60 oder LI-P60 beladene Antigen-präsentierende Zellen wurden vergleichbar gut von dem P60₃₀₁₋₃₁₂-spezifischen T-Zellklon erkannt, nicht jedoch von den P60-spezifischen CD8 T-Zellen (Abb. 41 B). Dies ist ein Hinweis darauf, dass die über MHC-Klasse I-

Moleküle präsentierten P60-Peptide nicht aus exogenem P60 prozessiert wurden. Während *L. monocytogenes*-infizierte P388D₁-APZ vor allem von den P60-spezifischen CD8 T-Zellen erkannt wurden, war die Interaktion mit den P60-spezifischen CD4 T-Zellen nur sehr schwach, wie an der geringen INF- γ -Produktion in Abb. 41 C, links oben zu erkennen ist. Im Gegensatz zu den *L. monocytogenes*-infizierten Zellen, bei denen bereits 0,01 bis 0,001 CFU/Zelle für die Erkennung ausreichten, waren bei *L. innocua*-infizierten APZ mindestens zehn Bakterien/Zelle notwendig. Interessanter Weise erfolgte bei den *L. innocua*-infizierten Zellen die Präsentation von P60 gleichermaßen über MHC-Klasse I und MHC-Klasse II-Moleküle (Abb. 41 C rechts unten).

Um sekundäre Infektionen in Folge der Ausbreitung von Zelle zu Zelle mittels Pseudopodienbildung zu vermeiden (Hiltbold et al. 1996), war der Versuchsablauf hierbei so modifiziert, dass die Prozessierung und Präsentation des Antigens auf max. sechs Stunden nach der Infektion beschränkt blieb. Der Einfluss der Aktinschweif-vermittelten Expansion von *L. monocytogenes* in umliegende Zellen auf die Antigen-Präsentation, wurde mittels einer ActA-Deletionsmutante (Domann et al. 1992) untersucht. Unter den angegebenen Versuchsbedingungen war die Erkennung der mit der $\Delta actA$ -Mutante-infizierten Zellen durch P60-spezifische CD4- und CD8-T-Zellen vergleichbar mit der *L. monocytogenes*-WT-infizierter Zellen (Abb. 41 C oben rechts). Dem zu Folge kann postuliert werden, dass in den ersten sechs Stunden nach Infektion keine nennenswerte Ausbreitung auf Grund induzierter Phagozytose der in den Pseudopodien befindlichen Listerien erfolgt. Mit Hilfe einer *hly*-Deletionsmutante sollte die Rolle von LLO bei der Hemmung der MHC-Klasse II-Präsentation erforscht werden. Da die Erkennung der mit der Δhly -Mutante infizierten APZ ähnlich gut mit den P60-spezifischen CD4- und CD8-T-Zellen erfolgte, kann davon ausgegangen werden, dass LLO für die unterschiedlichen Präferenzen bei der Antigenpräsentation *L. monocytogenes*- bzw. *L. innocua*-infizierter APZ verantwortlich ist (Abb. 41 C links unten). Während die starke P60-Präsentation bei *L. monocytogenes*-infizierten Makrophagen-ähnlichen Zellen hauptsächlich auf MHC Klasse I-Moleküle beschränkt ist, erfolgt die Präsentation bei *L. innocua*-infizierten Zellen schwächer und im Zusammenhang mit Molekülen sowohl der MHC Klasse I, als auch Klasse II.

5.2.5.8. Eine *L. innocua*-Infektion kann *in vivo* keine P60-spezifische T-Zell-Antwort induzieren

Die Auswirkung der unterschiedlichen Antigenpräsentation *L. monocytogenes*- bzw. *L. innocua*-infizierter Zellen *in vitro* auf die Häufigkeit P60-spezifischer CD4- und CD8-T-Zellen *in vivo* sollte mittels ELISPOT-Assay bestimmt werden. Sie errechnet sich aus der Zahl der IFN- γ Spots je 1×10^5 Milzzellen nach Zugabe der entsprechenden synthetischen Peptide zu den P60₂₁₇₋₂₂₅- oder P60₄₄₉₋₄₅₇-spezifischen CD8 T-Zellen bzw. gereinigtem LM-P60 oder LI-P60 nach Standardprotokoll (Mosmann und Coffman 1989). 14 Tage nach Infektion mit *L. monocytogenes* oder *L. innocua* erfolgte der Boost. Als Kontrolle dienten Mäuse die nicht infiziert wurden. Zehn Tage später wurden die Milzzellen für den ELISPOT-Test entnommen.

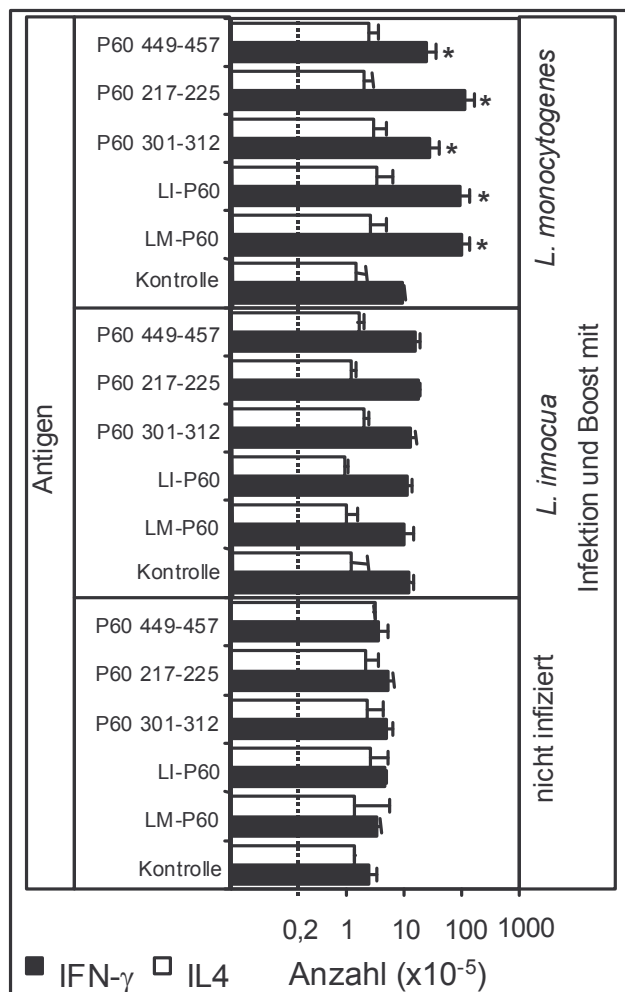


Abb. 42: Häufigkeit AG-spezifischer T-Zellen in der Milz von *L. monocytogenes*- und *L. innocua*-infizierten BALB/c Mäusen bestimmt mittels ELISPOT-Assay. Dargestellt ist pro 1×10^5 Milzzellen die Anzahl der Zellen, die auf P60₄₄₉₋₄₅₇, P60₂₁₇₋₂₂₅, P60₃₀₁₋₃₁₂ und LI-P60 bzw. LM-P60 mit IFN- γ - (weiß) bzw. IL-4-Produktion (schwarze Balken) reagieren. Die Kontrolle enthält kein AG. Die gepunktete Linie bei $0,2 \times 10^5$ repräsentiert die Nachweisgrenze des ELISPOT-Assays. Die SD beziehen sich auf jeweils drei Versuche, während die Sternchen (*) Werte markieren die sich signifikant ($p < 0,05$) von der Kontrolle unterscheiden.

L. monocytogenes-infizierte Mäuse zeigten gegenüber der Kontrolle eine signifikante (* = $p < 0,05$) Zunahme der INF- γ -produzierenden Zellen (Abb. 42 oberes Drittel) nach Stimulation mit P60₂₁₇₋₂₂₅ (115×10^5), P60₄₄₉₋₄₅₇ (24×10^5), LM-P60 (101×10^5), LI-P60 (93×10^5) bzw. P60₃₀₁₋₃₁₂ (28×10^5). Eine signifikante Steigerung der IL4-Produktion konnte nicht beobachtet werden, was auf eine P60-spezifische T-Zellantwort des Typs TH1 schließen lässt.

Dagegen führt die Infektion mit *L. innocua* nicht zu einer signifikanten Zunahme P60-reaktiver T-Zellen (Abb. 42 Mitte). Da - wie bei der uninfizierten Kontrolle (Abb. 42 unten) - weder IFN- γ noch IL-4 induziert wurden, kann man davon ausgehen, dass durch *L. innocua* keine T-Zellantwort des Typs 2 ausgelöst wird.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass eine Infektion mit *L. innocua* nicht ausreichend ist, um eine P60-spezifische CD4- oder CD8-T-Zell-Immunantwort auszulösen, wogegen eine *L. monocytogenes*-Infektion eine starke CD4- und CD8-T-Zellantwort bewirkt.

5.2.5.9. *L. innocua* verstärkt die T-Zellerinnerung nach einer *L. monocytogenes*-Infektion

LI-P60 wird zwar von Makrophagen präsentiert, dies führt aber nicht zu einer Immunantwort gegen *L. monocytogenes*. Es gibt experimentelle Hinweise darauf, dass zur Induktion einer primären Immunantwort ein anderer Reiz nötig ist, als für die Aktivierung gereifter T-Zellen (Mosmann und Coffman 1989). Daher sollte getestet werden, ob *L. innocua* in der Lage ist, eine bestehende Immunität auf Grund einer vorherigen Infektion mit *L. monocytogenes* aufzufrischen.

Die steril gehaltenen, specific pathogen free (SPF) Mäuse wurden zunächst mit 1×10^2 CFU (niedrige Dosis) bzw. 5×10^3 CFU (hohe Dosis) *L. monocytogenes* infiziert. Nach ein, zwei und drei Monaten wurde mit 1×10^6 CFU *L. innocua* geboostet. Die Zahl der Gedächtnis-T-Zellen wurde erst einen weiteren Monat später bestimmt, da man in früheren Experimenten die Erfahrung gemacht hatte, dass bei einer Infektion mit *L. monocytogenes* die T-Zellen zunächst expandieren, jedoch innerhalb von drei Wochen wieder absterben (Vijh und Pamer 1997; Busch et al. 1998). Der ELISPOT wurde in Gegenwart von LM-P60, LI-P60, P60₃₀₁₋₃₁₂, P60₂₁₇₋₂₂₅ bzw. P60₄₄₉₋₄₅₇ oder ohne Antigen (neg. Kontrolle) durchgeführt.

Die Negativkontrolle spontan INF- γ -produzierender Zellen (ohne Antigen) war immer kleiner als $0,2 \times 10^{-5}$.

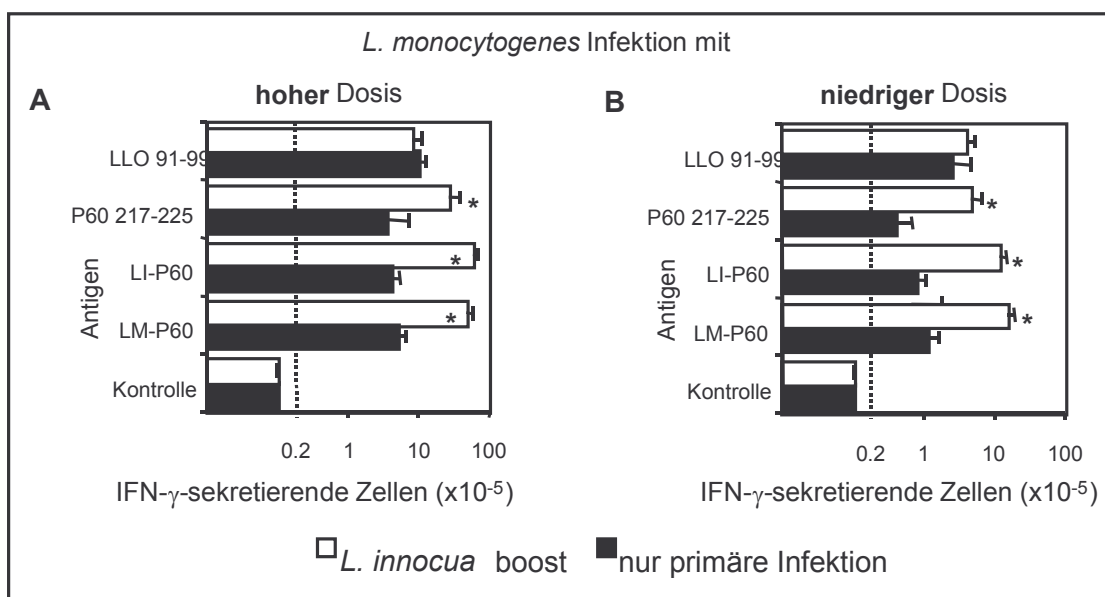


Abb. 43: Anzahl INF- γ -sezernierender Zellen nach *L. monocytogenes*-Infektion in Abhängigkeit von Infektionsdosis und Antigen. *L. innocua* verstärkt eine bereits vorhandene LM-P60-spezifische T-Zellantwort. Nach

der Immunisierung A. mit 5×10^3 CFU (hohe Dosis) bzw. B. mit 1×10^2 CFU (niedrige Dosis) *L. monocytogenes* wurde vier Monate nach der primären Infektion mit *L. monocytogenes* (schwarze Balken) oder einen Monat nach der ersten Infektion mit *L. monocytogenes* und Restimulation mit 1×10^6 CFU *L. innocua* nach ein, zwei und drei Monaten, wurde die Anzahl AG-spezifischer, INF- γ -produzierender Zellen im ELISPOT bestimmt. Dargestellt ist pro 1×10^5 Milzzellen die Anzahl INF- γ -sezernierender Zellen, die auf LLO₉₁₋₉₉, P60₂₁₇₋₂₂₅, LM-P60 bzw. LI-P60 reagieren. Die Kontrolle enthält kein AG. Die gepunktete Linie bei $0,2 \times 10^5$ repräsentiert die Nachweisgrenze des ELISPOT-Assays. Die SD beziehen sich auf jeweils drei Versuche, während die Sternchen (*) Werte markieren bei denen sich die Boostergruppe signifikant ($p < 0,05$) von der Kontrollgruppe (nur die primäre Infektion) unterscheiden.

Wiederholte Infektion mit *L. innocua* erhöhte signifikant ($p < 0,005$) die Zahl der P60-spezifischen T-Zellen. Die mit einer hohen Dosis an *L. monocytogenes* infizierten Mäuse zeigten eine 9- bzw. 14-fache Zunahme an LM-P60- bzw. LI-P60 spezifischen TH1-Zellen und entsprechend eine 8-fache Zunahme der P60₂₁₇₋₂₂₅ spezifischen Zellen (Abb. 43 A). In der mit geringer Dosis infizierten Gruppe war bei den LM-P60- bzw. LI-P60-spezifischen TH1-Zellen eine 13- bzw. 15-fache und bei den P60₂₁₇₋₂₂₅-spezifischen Zellen eine 11-fache Steigerung zu beobachten. Bei beiden Gruppen hat sich die Zahl der LLO₉₁₋₉₉-spezifischen Zellen nach den *L. innocua*-Boosts nicht signifikant verändert. Deshalb kann angenommen werden, dass die Expansion der P60-spezifischen T-Zellen in Folge der *L. innocua*-Infektion Antigen-abhängig erfolgte. Wenn die primäre Infektion nicht mit *L. monocytogenes*, sondern mit *L. innocua* durchgeführt wurde, konnte keine P60- oder LLO-spezifische Induktion der Immunantwort beobachtet werden. Somit lässt sich festhalten, dass eine Infektion mit apathogenen *L. innocua* zwar nicht ausreicht, um *in vivo* eine primäre P60-spezifische T-Zellantwort zu induzieren, jedoch hinreichend ist, um die Expansion P60-spezifischer T-Zellen, die bei einer vorherigen *L. monocytogenes*-Infektion induziert wurden, zu gewährleisten.

5.2.5.10. Limitierte protektive Effizienz von *L. innocua*-Infektionen

Durch den wiederholten Kontakt mit *L. innocua* im Essen (Harvey und Gilmour 1993; Wilson 1995; Pinto und Reali 1996; Wilson 1996; Capita et al. 2001; Cordano und Rocourt 2001; de Valk et al. 2001; Hassan et al. 2001; Meier und Lopez 2001; Soriano et al. 2001; Johannessen et al. 2002) könnte *L. innocua* *L. monocytogenes*-kreuzreaktive T-Zellen stimulieren und somit einen wichtigen Beitrag zur Aufrechterhaltung des Immunschutzes gegen *L. monocytogenes* leisten. Die oben beschriebenen Mäuse wurden vier Monate nach der primären Infektion erneut mit *L. monocytogenes* infiziert und auf ihren *L. monocytogenes*-Gehalt in der Leber und der Milz hin untersucht.

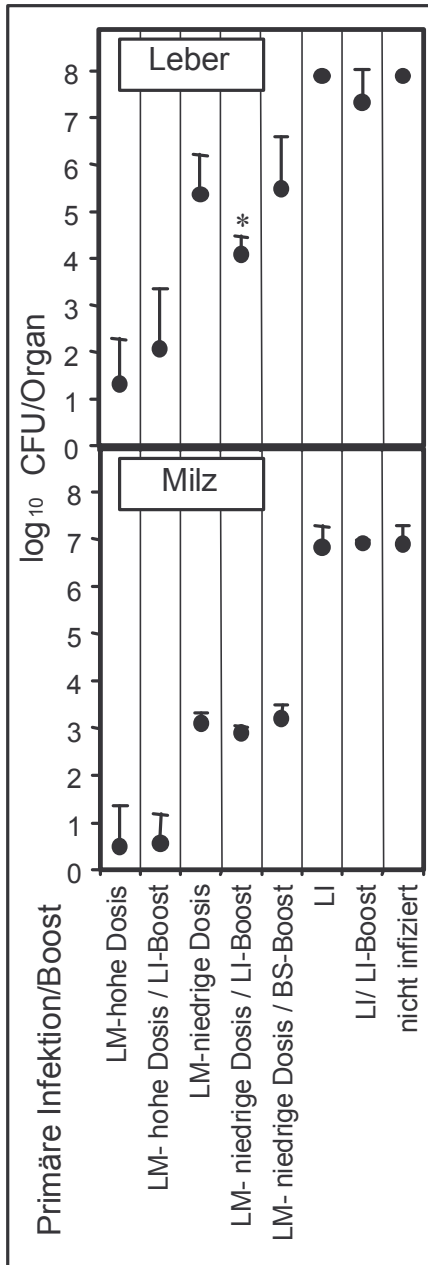


Abb. 44:

Die eingeschränkte protektive Wirkung einer *L. innocua*-Infektion. Nach der primären Infektion mit einer niedrigen (LM-niedrige Dosis) bzw. hohen Dosis (LM-hohe Dosis) an *L. monocytogenes* oder entsprechend mit *L. innocua* (LI), wurden diese drei Gruppen wiederholt mit *L. innocua* (LI) oder *B. subtilis* (BS) nach jeweils ein, zwei bzw. drei Monaten geboostet. Nach der Infektion mit *L. monocytogenes* einen Monat später wurde nach 72 Stunden die Keimzahl in Leber und Milz bestimmt. Die log₁₀ CFU ± SD beziehen sich jeweils auf fünf Tiere je Gruppe, während die Sternchen (*) Werte markieren, bei denen die Boostergruppe eine signifikante ($p < 0,05$) Protektion zeigt.

Bereits nach der primären Infektion mit hohen Dosen an *L. monocytogenes* war in Leber und Milz eine optimale Protektion (>6) zu beobachten, die auch durch *L. innocua*-boosts nicht verstärkt werden konnte. Nach Infektion mit niedriger Dosis *L. monocytogenes* fiel die Protektion zunächst geringer aus (2,9 in der Leber und 3,8 in der Milz); konnte jedoch nach Boost mit *L. innocua* zumindest in der Leber signifikant erhöht werden (auf 3,9), während in der Milz nur eine geringe Zunahme zu beobachten war (auf 4,0). Da in der Negativkontrolle mit *B. subtilis* statt *L. innocua* keine Zunahme der protektiven Wirkung beobachtet werden konnte, scheint eine unspezifische Reaktion unwahrscheinlich. Somit waren wiederholte Boosts mit *L. innocua* unzureichend, um einen vollständigen Immunschutz gegen eine Infektion mit *L. monocytogenes* zu erreichen. Jedoch verstärkten diese den protektiven Schutz gegen *L. monocytogenes* in der Leber bei suboptimaler antilisterieller Immunität.

5.3. In vitro-Transkription PrfA-abhängiger und -unabhängiger Gene von *L. monocytogenes*

5.3.1. PrfA-Abhängigkeit der in vitro-Transkription von *actA*, *plcA*, *hly*, *mpl*, *prfA1+2*, *iap*

Mit Hilfe des *in vitro*-Transkriptions-Systems, unter Einsatz von partiell aufgereinigter RNA-Polymerase von in MEM-Medium inkubierten *L. monocytogenes*, konnte gezeigt werden, dass mit dieser RNA-Polymerase (RNAP_{MEM}) die Transkription von *actA* streng PrfA-abhängig erfolgt (Bockmann et al. 2000). Unter Einsatz von gereinigtem PrfA mit His-Tag (Bockmann et al. 1996), erfolgte die Transkription abhängig von der verwendeten PrfA-Menge und erreichte bei einer Konzentration von 25 ng PrfA den Sättigungsbereich (Bockmann et al. 2000). Der Assay (Tatti und Moran, 1996) führte zu einem einzigen Transkript, dessen Größe die Annahme erlaubt, dass der Startpunkt bei der *in vitro*-Transkription von *actA*, mit dem *in vivo* durch Northernblot bestimmten, übereinstimmt.

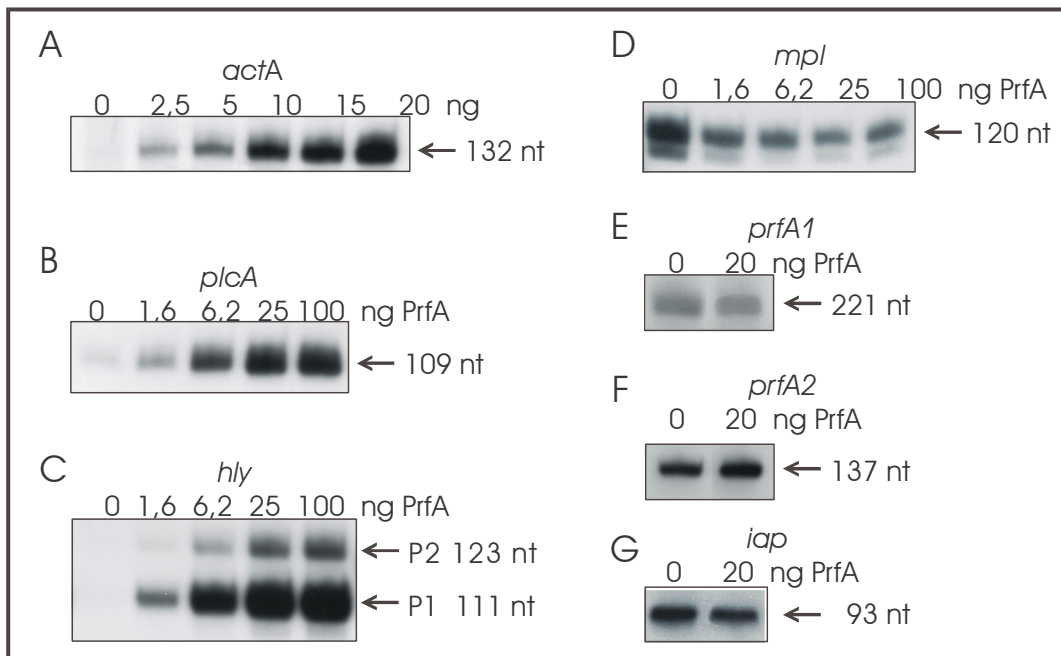


Abb. 45: *In vitro*-Transkriptions-Assays mit DNA die die Promotoren P_{*actA*} (A), P_{*plcA*} (B), P_{*hly*} (C), P_{*mpl*} (D), P_{*prfA1*} (E), P_{*prfA2*} (F) und P_{*iap*} (G) enthält (mit zunehmenden Mengen PrfA). Der *in vitro*-Transkriptions-Assay wurde mit gleicher Konzentration (0,5 µg) an RNA-Polymerase (RNAP) aus Fraktion 16 der RNAP_{MEM} wie in 4.3. beschrieben durchgeführt. "nt" bezeichnet die Transkriptlänge in Ribonukleotiden.

Das selbe *in vitro*-System wurde dazu eingesetzt um die Transkription von den Promotoren der Gene *plcA* (P_{*plcA*}), *hly* (P_{*hly*}), *mpl* (P_{*mpl*}), *prfA* (P_{*prfA1*} und P_{*prfA2*}) und *iap* (P_{*iap*}) zu untersuchen. Frühere *in vivo*-Daten zeigten, dass die ersten drei Promotoren durch PrfA positiv reguliert werden, während andere Indizien für eine negative Autoregulation der beiden Promotoren P1 und P2 des PrfA-Gens durch PrfA sprachen (Freitag et al. 1993; Freitag und Portnoy 1994). Da die Expression von *iap* unabhängig von PrfA ist (Bubert et al. 1997), wurde der *iap*-Promotor als Kontrolle für die Transkription von PrfA-unabhängigen Promotoren benutzt. In Abb. 45 ist die PrfA-abhängige *in vitro*-Transkription von P_{*actA*}, P_{*plcA*} und P_{*hly*} mit RNAP_{MEM} deutlich zu erkennen. In Abwesenheit von PrfA ist bei P_{*plcA*} eine geringe Hintergrund-Transkription zu erkennen, wäh-

rend P_{hly} keinerlei PrfA-unabhängige Aktivität zeigt. Diese Promotoren benötigen für ihre Transkription in etwa die gleiche Menge an PrfA, wobei ca. 10 ng PrfA für eine deutliche Transkription ausreichen. Wie auch P_{actA} führt P_{plcA} ebenfalls zu einem einzigen Transkript, wogegen man bei P_{hly} zwei Transkripte erhält. Deren Länge erlaubt die Annahme, dass die Startpunkte der *in vitro*-Transkription mit den zuvor *in vivo* bestimmten Sites übereinstimmen (Mengaud et al. 1989; Dickneite et al. 1998). Der *in vitro*-Transkriptions-Startpunkt von P_{plcA} ist ebenfalls mit dem *in vivo* identifizierten (Mengaud et al. 1991) identisch. Erwartungsgemäß erfolgte die Transkription von P_{iap} unabhängig von PrfA (Abb. 45 G). Jedoch erwies sich die *in vitro*-Transkription von P_{mpl} überraschender Weise ebenfalls als PrfA-unabhängig (Abb. 45 D). Dies steht im Gegensatz zu den Ergebnissen aus früheren *in vivo* Untersuchungen (Mengaud et al. 1991). Die Zugabe steigender Mengen an PrfA schien sogar die P_{mpl} -Transkription zu hemmen. Auch in diesem Fall stimmte, laut Transkriptgröße, der Transkriptions-Startpunkt *in vitro* mit dem *in vivo* überein. Die Transkription von P_{prfA1} und P_{prfA2} ist ebenfalls unabhängig von PrfA (Abb. 45 E, F). Selbst hohe PrfA-Konzentrationen zeigten keine hemmende Wirkung.

Dadurch konnte gezeigt werden, dass die *in vitro*-Transkription von *actA*, *hly* und *plcA* erwartungsgemäß PrfA benötigt, wogegen die *in vitro*-Transkription von P_{mpl} , P_{prfA1} , P_{prfA2} und P_{iap} nicht von PrfA beeinflusst wird.

5.3.2. *In vitro* ist die Transkriptions-Initiation bei allen Promotoren abhängig von der Verfügbarkeit der ersten drei rNTPs und hohen Konzentrationen an ATP

Bei der Durchführung der *in vitro*-Transkriptionsversuche mit den oben beschriebenen Promotoren war die Abhängigkeit der Transkriptionseffizienz von der Verfügbarkeit der vier Ribonukleotidtriphosphate (rNTPs) auffällig. Dabei wurde das radioaktiv markierte rNTP immer in 50-fach geringerer Konzentration als die anderen drei rNTPs (3 μ M) im „run-off“ Experiment eingesetzt. Es ließ sich beobachten, dass alle getesteten listeriellen Promotoren - außer P_{prfA2} - hohe Konzentrationen an ATP und UTP (100-150 μ M) zur Initiation der *in vitro*-Transkription benötigten.

Die selektive *in vitro*-Transkription an P_{prfA1} und P_{prfA2} wurde in Gegenwart von PrfA mit Hilfe eines DNA-Fragments bestimmt, das beide Promotoren enthielt (Abb. 46 B). Die Transkriptions-Initiation kann gesteuert werden durch die Applikation des entsprechenden radioaktiv markierten Ribonukleotidtriphosphats (rNTP), das für die Transkriptionsinitiation vom jeweiligen Promotor optimal und für jeden der Promotoren unterschiedlich ist (CTP für P_{prfA1} und UTP für P_{prfA2} ; vgl. Abb. 46 A). Für die Initiation der Transkription von P_{prfA} (insbesondere von P_{prfA2}) wurden hohe Konzentrationen an GTP benötigt. Da hingegen alle anderen Promotoren lediglich sehr wenig GTP benötigten, wurde radioaktiv markiertes GTP (bzw. CTP) für die Markierung dieser Promotoren eingesetzt. Die jeweils für eine optimale *in vitro*-Transkription von den getesteten

Promotoren benötigten rNTPs sind in Tab. 5 zusammengefasst. Diese enthält auch die ersten drei Ribonukleotide des entsprechenden Transkripts, die Anzahl der vier Ribonukleotide innerhalb der ersten zehn rNTPs des „run-off“-Transkripts, die PrfA-Abhängigkeit und die Transkriptlänge.

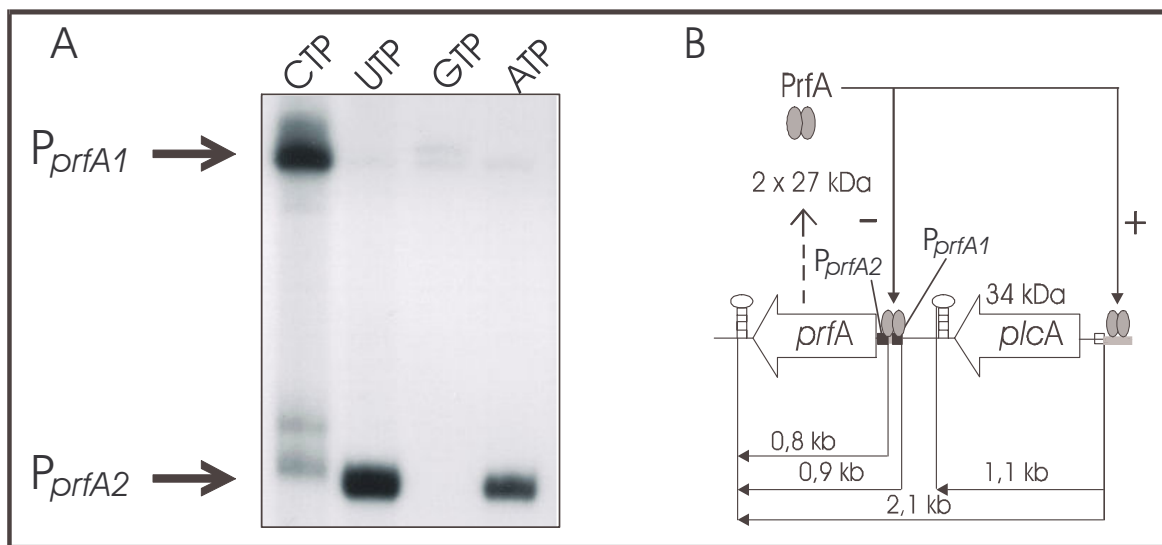


Abb. 46: (A) Selektive Transkriptions-Initiation an jeweils einem der beiden *prfA* Promotoren P_{prfA1} bzw. P_{prfA2} mit RNAP_{MEM} (Fraktion 16; 0,5 µg) durch Variation des zugegeben gelabelten rNTPs (entspricht dem rNTP, das jeweils in der geringsten Konzentration vorliegt). (B) Model der *prfA*-Transkription *in vivo* der beiden PrfA Promotoren P_{prfA1} und P_{prfA2}. Die Zahlen geben die Größe der initiierten Transskripte in kb an (modifiziert nach Portnoy et al. 1994).

Tab. 5: rNTP- und PrfA- Abhängigkeit der *in vitro*-Transkription für die getesteten Promotoren

Promotor	am besten	am 2. besten	erste 3 rNTPs	die ersten 10 Ribonukleotide (nt)	PrfA abhängig	Transkriptgröße in nt	Transkriptionseffizienz mit rNTP in geringer Konz. (= markiertes rNTP)			
	für die Markierung geeignetes rNTP						ATP	UTP	CTP	GTP
P _{lap}	G	U/C	UCA	6 A, 3 U, 1 C, 0 G	-	93	-	+	+	++
P _{plcA}	G	C	AUA	5 A, 3 U, 2 C, 0 G	+	109	-	-	+	++
P _{mpl}	G	C	CAU	4 A, 4 C, 2 U, 0 G	-	120	-	+/-	+	++
P _{nly}	G	C	UAU	6 A, 2 U, 1 C, 1 G	+	111/100/58	-	+/-	+	++
P _{actA}	C	G	UAA	4 A, 4 U, 1 C, 1 G	+	132	-	+/-	++	+
P _{prfA1}	C	-	GUA	7 A, 1 U, 1 C, 1 G	-	221	+/-	+/-	++	+/-
P _{prfA2}	U	A	AAG	4 A, 1 U, 1 C, 4 G	-	137	+	++	+/-	-

Effizienz der Transkription: ++ sehr stark, + stark, +/- schwach, +/- sehr schwach, - keine.

Auffällig war dabei, dass das rNTP, das jeweils nur in niedriger Konzentration vorhanden sein musste (in 50-fach geringerer, als die drei anderen rNTPs), niemals in den ersten drei initiiierenden rNTPs enthalten war.

Erhöht man die Menge an hinzugefügtem ATP, so wirkt dies induzierend auf die *in vitro*-Transkription aller PrfA-abhängiger Promotoren, sowie auch der von P_{iap} und P_{mpl} . Adenin ist in den ersten drei Ribonukleotiden aller Transkripte enthalten. Durch die Zugabe von Didesoxy-Adenosintriphosphat (ddATP), das lediglich als Energiequelle dient, konnte der Bedarf an hohen ATP-Konzentrationen nicht kompensiert werden (Daten nicht gezeigt).

5.3.3. Effizienz der *in vitro*-Transkription von RNA-Polymerasen, die unter verschiedenen Wachstumsbedingungen gewonnen wurden

Vorhergehende Untersuchungen der PrfA-abhängigen Gene *hly*, *plcA* und *actA* deuteten darauf hin, dass deren Transkription reduziert ist, wenn die Bakterien in BHI-Medium gezüchtet wurden, jedoch deutlich zunahm, wenn ein „Shift“ in Minimalmedium (MEM) oder hin zu höheren Temperaturen (48°C) durchgeführt wurde (Sokolovic et al. 1993). Daher sollte mit Hilfe des *in vitro*-Systems geklärt werden, ob die beobachtete Induktion der Transkription in Zusammenhang mit quantitativen oder qualitativen Veränderungen der RNA-Polymerase steht.

Dazu wurde RNAP aus *L. monocytogenes*-Kulturen, die für 30 Minuten entweder in BHI inkubiert ($RNAP_{BHI}$), nach 48°C ($RNAP_{48}$) oder nach MEM ($RNAP_{MEM}$) transferiert wurden, über eine Heparinsäule affinitätschromatographisch aufgereinigt (Abb. 47). Die RNAP-Aktivität wurde durch „run-off“-Assays mit P_{actA} und in Gegenwart von ausreichend PrfA bestimmt.

Wie in Abb. 47 A-C dargestellt, eluierte die $RNAP_{BHI}$ -Aktivität in einem ziemlich engen Bereich (Fraktionen 13-17, Hauptfraktion 16), während die Aktivität von $RNAP_{48}$ und $RNAP_{MEM}$ ein breiteres Elutionsprofil, bis hin zu Fraktion 21 ($RNAP_{48}$) bzw. Fraktion 22 ($RNAP_{MEM}$), aufwies. Die Konzentrationen an RNAP in den einzelnen Fraktionen wurden mittels Antikörper-ELISA bestimmt. Der hierbei eingesetzte Antikörper war gegen die β -Untereinheit der *E. coli* RNAP gerichtet.

Die dabei erhaltenen Daten stimmten mit den zuvor gewonnenen Ergebnissen aus Immuno-Dot-Blots und Silberfärbungen der gelelektrophoretisch aufgetrennten $\beta\beta'$ -Banden der RNAP überein. Die Intensitäten der $\beta\beta'$ -Banden wurden mit denen der, als Referenz verwendeten, silbergefärbten Banden, definierter Mengen an BSA verglichen. Dadurch konnte die Konzentration an RNAP in Fraktion 16 von $RNAP_{MEM}$ mit $0,5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ bestimmt werden.

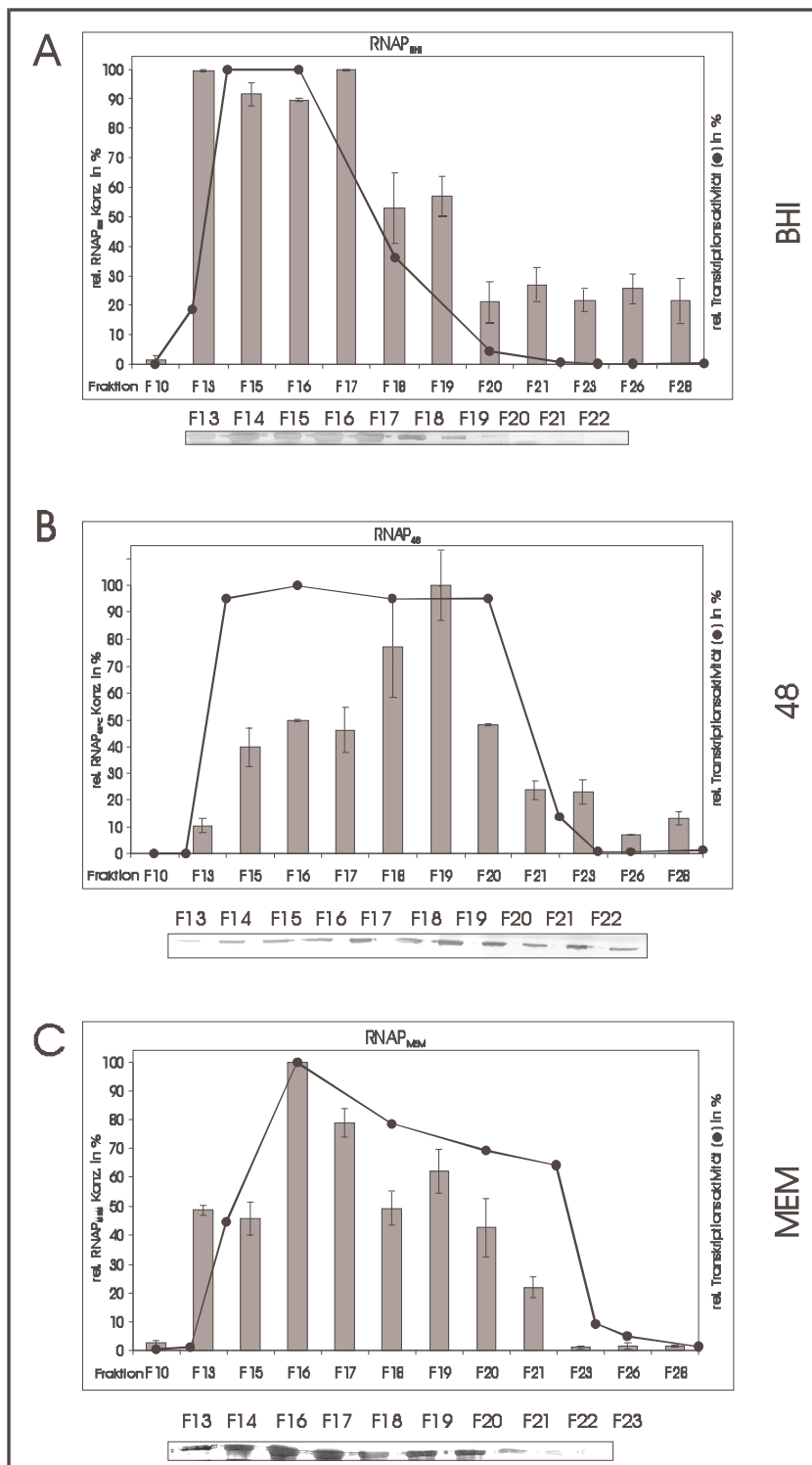


Abb. 47: Relative Konzentrationen und Profile der über eine Heparinsäule aufgereinigten und fraktionierten RNA-Polymerase-Präparationen (RNAP) aus unter verschiedenen Wachstumsbedingungen gezüchteten *L. monocytogenes*-Kulturen: A. RNAP_{BHI}, B. 48°C (RNAP₄₈) und C. RNAP_{MEM}. Die relativen RNAP-Konzentrationen der einzelnen Fraktionen wurden in einem ELISA mit Antikörpern (1:2000) gegen die β -UE (der *E. coli* RNAP) und HRP-konjugierten Maus- α -Ziege IgG sekundären Antikörpern (1:5000) bestimmt. Die höchste RNAP-Konzentration wurde gleich 100% gesetzt und in Bezug zu den anderen Werten gesetzt. Die SD wurde aus jeweils drei Versuchen ermittelt. Die Linie repräsentiert die im *in vitro*-

Transkriptionsassay bestimmten Aktivitätsprofile der RNAP, unter Verwendung eines Templates mit P_{actA} und gleichen Mengen RNAP der entsprechenden Fraktionen (●).

Da die Hauptaktivität aller drei RNAP-Aufbereitungen in Fraktion 16 beobachtet wurde, setzten wir für alle weiteren Tests RNAP dieser Fraktion und von Fraktion 20 (als Repräsentanten einer später eluierenden Fraktion) ein.

Unter Verwendung gleicher Mengen an RNAP (jeweils 0,5 μg pro Ansatz) wurde die spezifische RNAP-Aktivität in den beiden Fraktionen der drei RNAP-Präparationen (RNAP_{BHI}, RNAP₄₈ und RNAP_{MEM}) mit DNA-Matrizen, welche die oben beschriebenen Promotoren (P_{actA} , P_{prfA1} , P_{prfA2} , P_{iap} , P_{hly} und P_{mpl}) enthielten, anhand von *in vitro*-Transkriptionsassays bestimmt. Die optimalen Konzentrationen an PrfA und rNTPs wurden in allen Versuchsansätzen sichergestellt (vgl. Abb. 45 und Tab. 5).

Repräsentative Ergebnisse dieser Assays wurden in Abb. 48 dargestellt, wogegen Abb. 49 alle Daten dieser Experimente zusammenfasst. Um die RNAP-Aktivitäten der Fraktionen 16 und 20 mit den verschiedenen Promotoren vergleichen zu können, wurde die RNAP-Aktivität von Fraktion 16 mit der P_{iap} -enthaltenden Matrize für jede der drei RNAP-Präparationen gleich 100% gesetzt. Die Aktivitäten der anderen Promotoren wurden dementsprechend dazu in Relation gesetzt (, wobei wiederum jeweils die gleiche Konzentration an RNAP der Fraktionen 16 und 20 verwendet wurde).

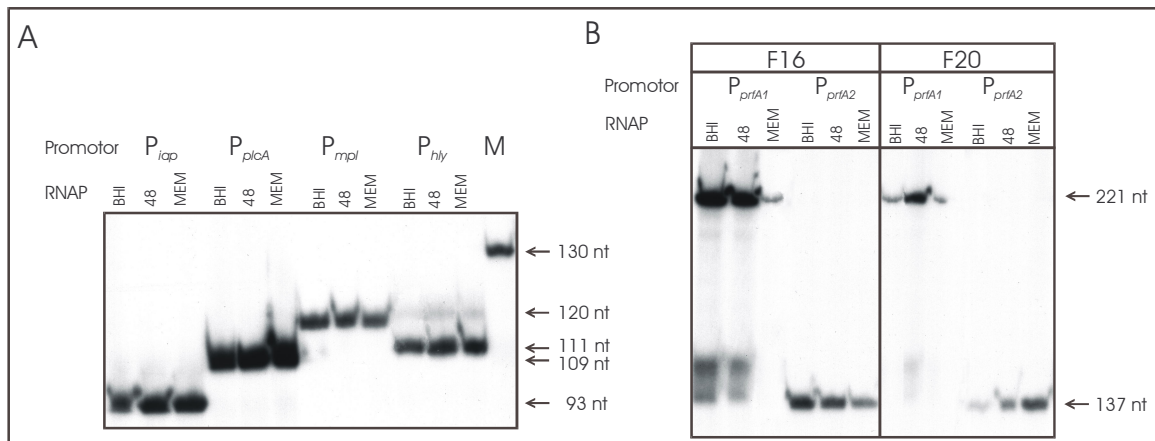


Abb. 48: *In vitro*-Transkription mit DNA-Matrizen mit den Promotoren (A) P_{iap} , P_{plcA} , P_{mpl} oder P_{hly} und RNAP (0,5 μg) aus Fraktion 16 der RNAP_{BHI}, RNAP₄₈ oder RNAP_{MEM} bzw. (B) den Promotoren P_{prfA1} und P_{prfA2} mit der selben Menge RNAP_{BHI}, RNAP₄₈ oder RNAP_{MEM} der Fraktionen 16 und 20.

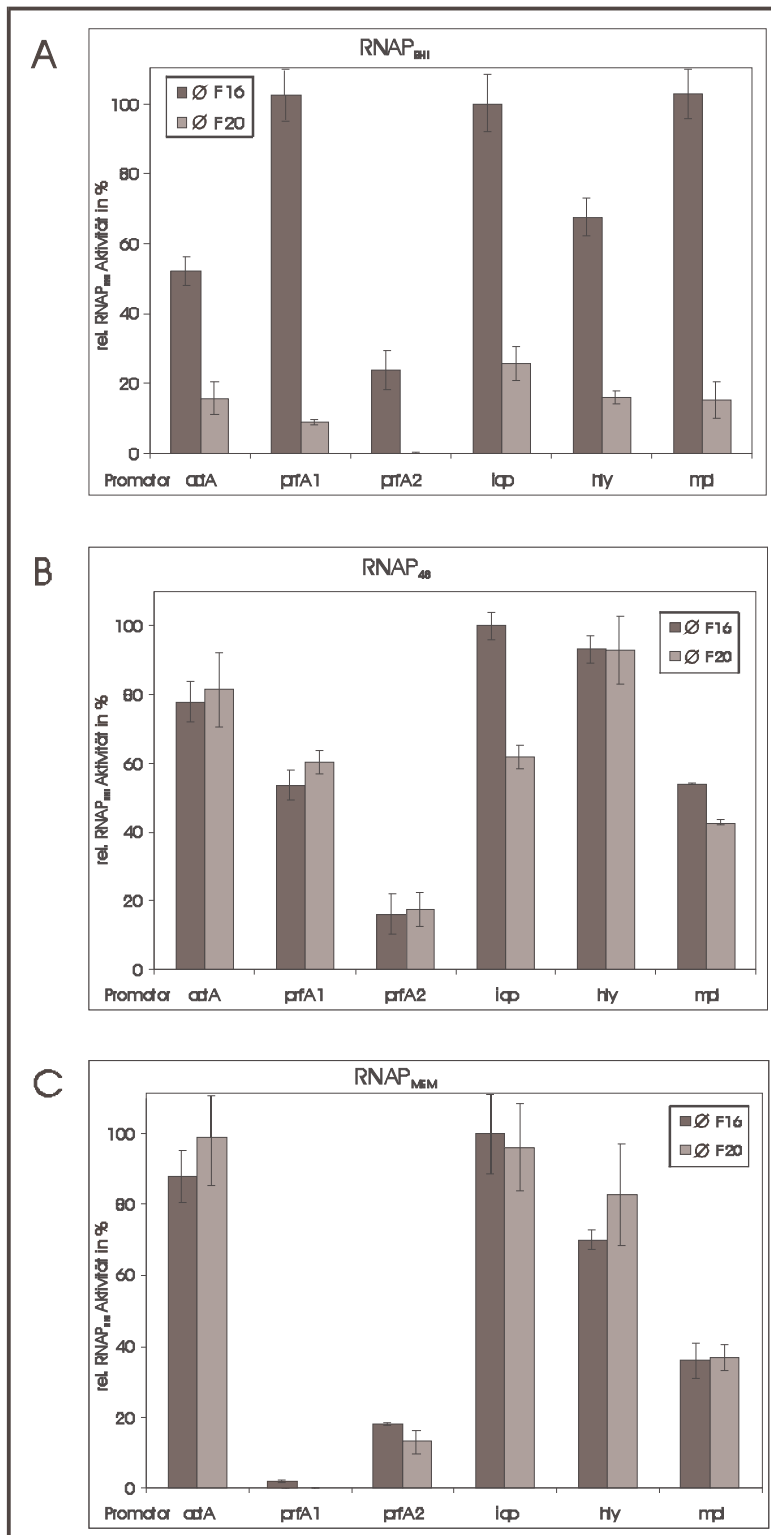


Abb. 49: Relative RNAP-Aktivitäten der Fraktionen 16 und 20 von (A) RNAP_{BHI} (B) RNAP₄₈ und (C) RNAP_{MEM}. Jeweils mit DNA-Matrizen, welche die Promotoren P_{actA} , P_{prfA1} , P_{prfA2} , P_{lcp} , P_{hly} und P_{mpl} enthielten, mit PrfA-Überschuß (20 ng) und gleichen Mengen an RNAP (0,5 µg). Die Ergebnisse repräsentieren die Mittelwerte \pm SD aus vier unabhängigen Experimenten. Die Aktivitäten wurden ins Verhältnis zur stärksten RNAP-Aktivität mit dem Promotor P_{lcp} (=100%) gesetzt.

Abb. 49 A zeigt, dass Fraktion 16 von RNAP_{BHI} mit den PrfA-unabhängigen Promotoren P_{iap} , P_{mpl} und P_{prfA1} die höchste transkriptionelle Aktivität aufweist, wogegen die der PrfA-unabhängigen Promotoren P_{hly} und P_{actA} , sowie die von P_{prfA2} (selbst bei sättigender PrfA-Konzentration) deutlich niedriger war. Mit Fraktion 20 von RNAP_{BHI} war bei allen sechs untersuchten Promotoren nur eine geringe Aktivität zu beobachten.

Bei Fraktion 16 von RNAP₄₈ (Abb. 49 B) war die transkriptionelle Aktivität mit den DNA-Matrizen, welche die PrfA-abhängigen Promotoren P_{actA} und P_{hly} enthielten, höher als jene mit den PrfA-unabhängigen Promotoren. Dieser Unterschied war besonders stark mit Fraktion 20 von RNAP₄₈, wo P_{hly} die höchste Aktivität aufwies. Interessanter Weise war auch die Transkription von P_{prfA1} in dieser Fraktion sehr hoch.

Bei den Fraktion 16 und 20 war die höchste transkriptionelle Aktivität mit den DNA-Matrizen der PrfA-abhängigen Promotoren P_{actA} und P_{hly} festzustellen. Annähernd keine Aktivität war bei P_{prfA1} mit RNAP_{MEM} zu beobachten (Abb. 49 C).

Die in Abb. 49 zusammengefassten relativen transkriptionellen Aktivitäten, wurden alle in Relation zur spezifischen Aktivität, die mit dem P_{iap} -enthaltenden linearisierten Plasmid erhalten und gleich 100% gesetzt wurde, dargestellt.

6.1. Optimierung der Listeria Diagnostik

Als wichtiges Housekeeping-Gen kommt P60 bei allen Listeria-Spezies vor (Wuenschel et al. 1993). Seine konservierten und variablen Bereiche innerhalb der verschiedenen Spezies sind bereits genau kartographiert (Bubert et al. 1992). Es stellt daher ein hervorragendes Target für den Gattungs- und Spezies-spezifischen Nachweis von Listerien dar. Dabei ist insbesondere die Probenaufbereitung und Anreicherung auf Grund der komplexen Zusammensetzung verschiedener Proben eine große Herausforderung. Ein Lösungsweg ist der Verzicht auf langwierige Anreicherungsverfahren, um die Nachweiszeiten (in Folge langer Anzuchtzeiten) zu verkürzen und Kontaminationsmöglichkeiten auszuschließen. Dies setzt jedoch die Steigerung der Sensitivität eines Tests voraus. In der vorliegenden Arbeit sollte daher durch die spezifische Amplifikation des listeriellen *iap*-Gens und die Optimierung der Post-PCR-Detektion der Nachweis von Listerien verbessert werden.

6.1.1. Molekularbiologische Detektion von *L. monocytogenes*

Es stellte sich heraus, dass die Benutzung von ELISA-Platten aussichtsreicher war, als das PCR-Produkt auf Membranen zu immobilisieren. In den 96er Well-ELISA-Platten konnte mit geringen Volumina gearbeitet werden, wodurch auch die Hybridisierungszeiten um ein Vielfaches kürzer (30 Minuten) ausfielen. Daher wurden die darauffolgenden Untersuchungen v.a. auf Mikrotiterplatten optimiert. Weitere Verbesserungen lassen sich mit NUNC-NucleoLink®-Strips realisieren: Mit Hilfe eines immobilisierten Capture-Oligos konnte die PCR in den selben Reaktionsgefäßen wie Hybridisierungs- und Detektionsreaktion durchgeführt werden. Hierbei war sowohl der Materialverlust minimiert, wie auch die Handhabung vereinfacht. DIG-dUTP-markierte Oligonukleotide erwiesen sich als zuverlässiger als biotinylierte Oligonukleotide, da durch den hohen Anteil an nicht biotinylierten Primern (bzw. dem Ablösen des Biotins während der PCR) das PCR-Produkt nur ungenügend markiert werden konnte. Daher erschien es angebracht, die zusätzlich notwendige Terminale Transferase-Reaktion für die DIG-dUTP-Markierung in Kauf zu nehmen, um die Effizienz des Detektionssystem zu erhöhen. Eine weitere Verbesserung der Detektionsgrenze erwarteten wir auf Grund der höheren Sensitivität durch die Anwendung luminometrischer Verfahren.

Das unter 4.2. beschriebene Primersystem sollte somit ermöglichen, in einer einzigen Multiplex-PCR innerhalb von fünf Stunden nachzuweisen, ob Listerien in der untersuchten Probe enthalten sind, und um welche Spezies es sich dabei genau handelt. Selbst mehrere Arten, die nebeneinander in derselben Probe vorkommen, sollten sich damit, auf Grund der unterschiedlich langen PCR-Produkte, in einem Ansatz differenzieren lassen. Erst kürzlich gelang mittels denaturierender Gradient-Gelelektrophorese

(DGGE) die Differenzierung des *iap*-PCR-Produktes fünf verschiedener *Listeria*-Spezies direkt aus Lebensmittelproben (Cocolin et al. 2002).

Da nicht ausgeschlossen werden kann, dass es zu einer spontanen Bildung einzelner Mutanten kommt, welche dann von einem Test mit einem zu einseitig ausgerichteten Detektionstarget nicht erfaßt würden, empfiehlt sich die Verwendung mehrerer relevanter Zielgene. So wurden in Milchprodukten aemälytische *L. monocytogenes* identifiziert, die zwar für Menschen apathogen waren (Allerberger et al. 1997), aber deutlich zeigten, dass man auf Veränderungen eines Organismus mit kurzen Generationszeiten kurzfristig eingestellt sein muss. Demzufolge bietet sich z.B. eine Kombination jeweils mehrerer konservierter Bruchstücke von *ImaA*, *iap*, *hly* und *prfA* an.

Wegen IP-Streitigkeiten bzw. Lizenzgebühren im Zusammenhang mit PCR wurde nach Alternativen gesucht. Zum einen wird beispielsweise die Entwicklung automatisierter Schnelltests, wie z.B. Stäbchen oder Schwämmchen forciert, welche durch einfaches Eintauchen in flüssiges Medium Listerien detektieren. Das darin enthaltene Esculin bewirkt eine, durch die listerielle Hydrolyse bedingte Schwarzfärbung, welche instrumentell über eine Semi-Flüssigkeitsschicht detektiert wird. Dabei handelt es sich jedoch lediglich um einen Gattungsnachweis, der zudem 26 Stunden in Anspruch nimmt (Firstenberg-Eden et al. 2000). Zum anderen macht man sich zu Nutze, dass Listerien die Leitfähigkeit des Flüssigmediums innerhalb von 30 h um über 30% verändern können (Capell et al. 1995).

6.1.2. Immunologische Detektion von *L. monocytogenes*

Auch das P60-Protein stellt nicht zuletzt aus patentrechtlichen Gründen, vor allem aber wegen seines Vorkommens bei allen Listerien und seiner konservierten und variablen Bereiche ein wichtiges Target für die Detektion mittels ELISA dar.

Zwar sind bereits wichtige Epitope des P60 bekannt und haben auch zur Entwicklung spezifischer Nachweissysteme wie z.B. des „Pathalert Listeria“ von Merck geführt (Bubert et al. 1994). Dennoch besteht die Notwendigkeit, nach weiteren Epitopen zu suchen, um Antikörper generieren zu können, mit deren Hilfe die Sensitivität und Zuverlässigkeit bestehender Tests weiter verbessert, bzw. andere Spezies (v.a. *L. innocua*) detektiert werden können. Ein weiteres Manko der konventionellen Antikörperproduktion ist die Qualitätssicherung. Um Chargenvarianz in Folge der individuellen Antigenmuster, die ein immunisiertes Tier (z.B. Ziege) als Reaktion auf die Immunisierung zeigt, zu reduzieren, kann die Antikörperproduktion auf Antikörper aus Hühnereidotter umgestellt werden. Dadurch wird die langfristige Lieferung großer Mengen an Antikörpern mit gleicher Spezifikation sichergestellt. Hierbei muss das Tier nicht getötet werden und produziert mit jedem gelegten Ei kontinuierlich identische Antikörper. Neben der leichteren Haltung sind Hühner in Bezug auf Anschaffungskosten, den geringeren Aufwand für neue Immunisierungen, sowie der Möglichkeit, gleich mehrere Immunisierungen parallel laufen zu lassen, wesentlich günstiger,

Der spezifische Nachweis von LM-P60 konnte erfolgreich mit IgY aus Hühnereiern gezeigt werden, ohne dass Unterschiede zu Immunglobulinen aus anderen Quellen (z.B. Kanninchen, Mäusen oder humanen Ursprungs) zu beobachten gewesen wären. Der eventuelle Einwand, die Antikörperproduktion könnte unspezifisch durch das Trägermaterial bewirkt worden sein, lässt sich durch den Hinweis auf die Verwendung des Lysinbaumes (TentaGel® PAP) widerlegen. Im Gegensatz zu anderen Peptidcarriern (z.B. KLH oder BSA) werden mit dem Polymer nur peptidspezifische Antikörper induziert (TentaGel® J Merkblatt). Durch Verwendung des Lysinbaums als Träger während der Peptidsynthese kann außerdem auch anschließend auf die Abspaltung, Wiedergewinnung und erneute Kopplung verzichtet werden. Auch Löslichkeitsprobleme lassen sich so vermieden.

Somit stellen IgY aus Hühnereiern, wie erst kürzlich z.B. bei der Identifizierung neuer Zielproteine für die Medikamentenentwicklung gezeigt werden konnte (Zhang 2003) eine vielversprechende Alternative für die Herstellung kontinuierlicher Chargen an großen Mengen spezifischer Antikörper dar.

6.2. Immunologie des P60-Proteins von *L. monocytogenes* bzw. *L. innocua*

Als das stärkste bekannte listerielle B-Zell- und T-Zell-Antigen, induziert P60 - auch bei gesunden Personen - einen hohen Titer an α -P60 Antikörpern (Gentschev et al. 1992; Pamer 1994; Harty und Pamer 1995; Kolb-Maurer et al. 2001). Frühere Daten, wonach Listeriolysin O das Hauptantigen sei, sind möglicherweise auf das nahezu identische Molekulargewicht beider Proteine im SDS-Gel zurückzuführen. So konnte durch direkte Extraktion der MHC Klasse I gebundenen Epitope gezeigt werden, dass pro infizierte Zelle ein P60 Epitop (217-225) 3000 Mal präsentiert wird, während von LLO₉₁₋₉₉ selbst nach neun Stunden nur 800 Epitope nachgewiesen werden konnten (Pamer 1994).

Um den Einfluss des apathogenen Umweltkeims *L. innocua* auf die Ausbildung und den Erhalt einer *L. monocytogenes*-spezifischen Immunantwort zu untersuchen, wurde zunächst die protektive Wirkung P60-spezifischer TH1-Klone, die *L. monocytogenes*-P60-spezifische Epitope erkennen, demonstriert. Diese sekretierten P60-Peptide sind wichtige CD4 T-Zellantigene. Ein exakt definiertes Peptid wies – bis auf einen Aminosäureaustausch – völlige Übereinstimmung zwischen *L. innocua* und *L. monocytogenes* auf. Daher wurde als nächstes untersucht, inwieweit diese Homologie von *L. innocua* zum Immunschutz gegen *L. monocytogenes* beitragen könnte. Obwohl die Infektion mit *L. innocua* nicht ausreicht, um eine primäre T-Zell-spezifische Immunantwort gegen *L. monocytogenes* zu induzieren, kann sie bestehende *L. monocytogenes*-spezifische T-Zell-Gedächtniszellen erfolgreich stimulieren.

6.2.1. Die protektive Wirkung *L. monocytogenes*-P60-spezifischer TH1-Zellen *in vivo*

Aus früheren Transferversuchen mit CD8 T-Zellen, die spezifisch auf die sekretierten Proteine P60 und LLO von *L. monocytogenes* reagieren (Harty und Bevan 1992; Harty und Pamer 1995), gelangte man zu der Annahme, dass sekretierte Proteine die wichtigsten Antigene für CD8 T-Zellen wären. Auch wurde mittels rekombinanter bakterieller Vektoren gezeigt, dass nur sezernierte Proteine antigen sind und somit eine wirksame T-Zellantwort induzieren (Hess et al. 1996). Hier wiederum gelang es, eine starke P60-spezifische TH1-Immunantwort während einer *L. monocytogenes*-Infektion im Mausmodell nachzuweisen. Durch den Transfer von phänotypisch gut definierten TH1-T-Zellklonen, mit hoher Spezifität gegen P60, genauer sogar dessen Peptid P60₃₀₁₋₃₁₂, und ohne Kreuzreaktivität gegenüber HKL, konnte ein wirksamer Schutz gegen eine *L. monocytogenes*-Infektion vermittelt werden. Damit konnte die Wichtigkeit von Überstandproteinen als Zielantigene für eine *L. monocytogenes*-spezifische CD4 T-Zellimmunisierung demonstriert werden.

Zwar waren bereits *L. monocytogenes*-spezifische CD4 T-Zellantigene bekannt (LLO (Safley et al. 1991), P60 (von Koenig et al. 1983; Kohler et al. 1990; Bubert et al. 1992; Hess et al. 1995)), doch zum ersten Mal konnte in der vorliegenden Arbeit am Beispiel des P60 für ein *L. monocytogenes*-CD4 T-ZellAntigen, die Signifikanz der Erkennung durch antigenspezifische CD4 T-Zellklone *in vivo* gezeigt werden.

Auf Grund seines charakteristischen intrazellulären Lebenszyklus (Tilney und Portnoy 1989) und der Verfügbarkeit eines Mausmodells, dient *L. monocytogenes* seit Jahrzehnten als Modellsystem für intrazellu-

läre Pathogene. Als zytoplasmatisch lokalisierter Organismus löst er nach allgemeiner Auffassung eine CD8 T-Zellantwort aus. Im Gegensatz dazu bewirken im Endosom verweilende Bakterien - wie *Mycobacterium tuberculosis* oder *Salmonella ssp.* - eine CD4 T-Zellantwort. Dieser allgemein verbreiteten Annahme, dass erworbene Immunität gegen *L. monocytogenes* hauptsächlich durch CD8 T-Zellen vermittelt sei, folgte bald der experimentelle Nachweis mit MHC-Klasse II-defizienten CD4 T-Zell-negativen Mäusen, dass CD4 T-Zellen einen wichtigen Beitrag zur Immunität gegen *L. monocytogenes* leisten (Ladel et al. 1994). Zwar wurden auch *L. monocytogenes*-spezifische CD4 T-Zellklone transferiert, doch waren methodenbedingt auf Grund wiederholter Stimulation mit HKL die Zytokinproduktion und die Antigenpezifität nur unzureichend charakterisiert (Kaufmann et al. 1987; Magee und Wing 1988). Außerdem benötigten die T-Zellklone z.T. *in vivo* Zugaben von IL-12 (Kaufmann et al. 1987), während unsere P60-spezifischen T-Zellklone keine Kreuzreaktion mit aus HKL prozessierten Antigenen zeigten. Dies unterstützt die Hypothese, dass diese P60-spezifischen T-Zellen Antigene erkennen, die aus P60 prozessiert wurden, das von lebenden Listerien sekretiert wurde. Untermuert wird dies durch die Annahme, dass P60 ein dominantes Antigen für TH1-Zellen darstellt, auf Grund der Beobachtung, dass die Proliferation von Milzzellen *L. monocytogenes*-infizierter Mäuse ähnlich stark von gereinigtem P60 wie von HKL induziert wird.

Es bestünde die Möglichkeit, dass durch die künstlichen Kulturbedingungen *in vitro* Klone mit unphysiologischen funktionellen Eigenschaften herausselektiert würden. Dies erscheint jedoch angesichts der hohen funktionellen Heterogenität, die sich im protektiven Potential, in der P60-Spezifität und IL-Produktion zeigt, eher unwahrscheinlich. Interessanterweise war kein linearer Zusammenhang zu erkennen, zwischen der protektiven Wirkung *in vivo* und der Empfindlichkeit bei der Erkennung von P60 bzw. bei der Fähigkeit, *L. monocytogenes*-infizierte Knochenmarksmakrophagen zu lysieren. Allerdings konnte eine Korrelation zwischen der IL-10-Produktion und der reduzierten Protektion gegen *L. monocytogenes in vivo* beobachtet werden. So unterschied sich Klon 3D von allen anderen Klonen durch seine 10-fach höhere IL-10-Produktion und deutlich geringere protektive Wirkung in der Milz. Dai et al. konnten 1997 zeigen, dass die angeborene und auch die erworbene Immunität gegen *L. monocytogenes* bei IL-10-defizienten Mäusen verstärkt wird. Andererseits wurde kein Zusammenhang zwischen der IL-2 Produktion und dem Schutz vor einer *L. monocytogenes*-Infektion festgestellt.

Die Klone zeigten alle das für TH1-Zellen typische Zytokinmuster mit hohen IFN- γ - und niedrigen IL-4-Konzentrationen. Die protektive Wirkung von *L. monocytogenes*-spezifischen CD4 T-Zellen wird auf die INF- γ -Produktion zurückgeführt, während bei den CD8 T-Zellen die Perforin-vermittelte Zytolyse hierfür verantwortlich ist (Mosmann und Coffman 1989; Kagi et al. 1994).

Eine mögliche Erklärung für die bessere protektive Wirkung von CD 4 T-Zellen in der Milz im Vergleich zur Leber wäre die Präferenz der Hepatozyten für MHC-Klasse I-Antigene. Phagozytische Zellen hingegen exprimieren MHC Klasse I und II Moleküle bzw. können zumindest die Expression von MHC-Klasse II induzieren. Außerdem zeigten Transferexperimente von CD8 T-Zellen in Mäuse mit chimärem Knochen-

mark, dass die antilisterielle Wirkung nach Induktion durch Knochenmark-abhängige phagozytische Zellen wirksamer war als die nach Kontakt mit Knochenmark-unabhängigen Zielzellen (Harty und Bevan 1996). Interessanterweise war die protektive Wirkung der CD4 T-Zellklone in der Milz im Vergleich zur Leber stärker. Im Gegensatz zu unseren Beobachtungen wurden bisher in vergleichbaren Transferexperimenten mit HKL stärkere Effekte in der Leber als in der Milz beobachtet. Dies kann womöglich auf die präferenzielle Erkennung der Antigene abgetöteter Bakterien (HKL) durch aktivierte Makrophagen - in Folge der Freisetzung aus den Hepatozyten - zurückgeführt werden (Rakhmievich 1994). Im Gegensatz zu den HKL-spezifischen Zellen setzt die Antigenerkennung seitens der P60-spezifischen TH1-Zellen die aktive Sekretion von P60 innerhalb der infizierten Zelle voraus. Somit könnte *in vivo* der Tropismus von *Listeria*-spezifischen CD4-Zellen bzgl. Milz und Leber durch die Art der Antigenpräsentation beeinflusst sein. Des Weiteren konnte an i.p. *L. monocytogenes*-infizierten Ratten gezeigt werden, dass die dabei generierten CD4⁺ TCR αβ-T-Zellen vor allem TGF-β1 und IL-10, während HKL-induzierte T-Zellen vor allem INF-γ produzieren (Kimura et al. 1998). Demnach legen spezielle HSP70-reaktive CD4⁺ T-Zelluntergruppen im natürlichen Ablauf der Infektion (mit lebenden *L. monocytogenes*) auch gleich den Grundstein für das Beenden der T-Zell-vermittelten Infektion, nachdem die „Schlacht“ gegen *L. monocytogenes* vom Immunsystem gewonnen wurde. In dieser Hinsicht könnte es sehr interessant sein, unsere T-Zellklone auf Reaktivität gegenüber HSP70 zu testen.

Das von Klon 1A erkannte Epitop (P60₃₀₁₋₃₁₂ EAAKPAPAPSTN) wird vom MHC-Klasse II Molekül A^d präsentiert. Es weist zwar keine Ähnlichkeit mit der typischen A^d-Bindungssequenz auf (Sette et al. 1988; Sette et al. 1989; Hunt et al. 1992), besitzt jedoch ebenso wie der A^d-Ligand HSVgd₂₄₅₋₂₆₀ (APYSTLLPELSETP) einen hohen Prolingehalt. HSVgd₂₄₅₋₂₆₀ hat statt drei sogar vier Proline und ebenfalls kein A^d-Bindungsmotiv. Daher untermauert P60₃₀₁₋₃₁₂ die Hypothese, dass durch die Prolinreste bestimmte sekundäre Strukturen aufgebrochen werden, wodurch prolinhaltige Sequenzen im Hinblick auf die Erkennung durch A^d anderen Regeln unterliegen als prolinfreie Peptide (Sette et al. 1988).

Trotz seiner raffinierten Virulenzmechanismen hat *L. monocytogenes* aus der Sicht des Pathogens nur eine sehr geringe Erfolgsquote. Für gewöhnlich werden lediglich immunsupprimierte Individuen (Neugeborene, Schwangere, AIDS-Patienten, Diabetiker, Krebspatienten, ältere Menschen (Kampelmacher et al. 1972), Alkoholranke und Patienten, die Immunsuppressiva verabreicht bekommen) erfolgreich infiziert. Bei Personen mit normalem Immunstatus dagegen verläuft eine eventuelle Infektion asymptomatisch (Gellin und Broome 1989). Die Wichtigkeit P60-spezifischer CD4-T-Zellen für den Schutz vor *L. monocytogenes*-Infektionen konnte im Mausmodell gezeigt werden. Zellkulturversuche zeigten auch, dass Antikörper gegen P60 – mittels Opsonisierung der Bakterien – eine wichtige Rolle bei der Fc-vermittelten Aufnahme von *L. monocytogenes* durch humane, von Monozyten abstammende dendritische Zellen spielen (Kolb-Maurer et al. 2001).

Da das P60 von *L. innocua* eine 90%-ige Homologie zum P60 von *L. monocytogenes* aufwies (Bubert et al. 1992), und das von Klon 1A erkannte H-2A^d-restringierte CD4-T-Zellepitop (P60₃₀₁₋₃₁₂ EAAKPAPAPSTN) bis auf den Aminosäureaustausch eines Glutamins bei *L. innocua* gegenüber einem Glutamat

bei *L. monocytogenes* in Position 1 identisch war, sollte geprüft werden, inwieweit diese Homologie zum Immunschutz gegen *L. monocytogenes* beitragen kann.

6.2.2. Die Rolle von *L. innocua* beim Schutz vor *L. monocytogenes*

Erstmals konnte experimentell die Hypothese untermauert werden, dass kreuzreaktive apathogene Mikroorganismen die Aufrechterhaltung des bestehenden Immunschutzes unterstützen (Beverley 1990; Zinkernagel et al. 1996; Sprent 1997).

Immer wieder machte man die Beobachtung, dass Gedächtnis-T-Zellen nach adoptivem Transfer nur schlecht überleben, wenn keine Stimulation mit spezifischem Antigen erfolgt. Auch auf Grund der fehlenden Bystander-Aktivierung wurde somit der regelmäßige Antigenkontakt für die Stimulation und Reifung von Gedächtnis-T-Zelle als essentiell angesehen (Gray und Matzinger 1991; Oehen et al. 1992; Kundig et al. 1996; Busch et al. 2000). Demgegenüber wurde aber auch von Gedächtnis-CD8 T-Zellen berichtet, die in völliger Abwesenheit eines spezifischen Antigens überlebten (Lau et al. 1994; Mullbacher 1994; Bruno et al. 1995). Ein Erklärungsansatz war die wiederholte Stimulation mit kreuzreaktiven Antigenen aus der Umwelt (Beverley 1990). Insbesondere wenn man die 10- bis 50-fach höhere Sensitivität gegenüber Antigenen berücksichtigt (Bruno et al. 1995; Pihlgren et al. 1996). Andere Erklärungsversuche, die auf Daten aus Experimenten mit viralen Systemen beruhen, gehen von einer Stimulation ohne spezifische T-Zell-Rezeptor-Interaktion als Bystanderzellen aus. Hier wirkt die Zytokinproduktion benachbarter T-Zellen in Folge einer Immunantwort auf einen nicht verwandten Mikroorganismus (Tough et al. 1996; Ehl et al. 1997). Infolge des gewählten Versuchsaufbaus erfolgte die Expansion der Gedächtnis-T-Zellen ausschließlich antigenspezifisch, da die Häufigkeit der LLO-spezifischen T-Zellen nicht beeinflusst wurde. Neuere Berichte stützen die antigenspezifische Aktivierung (Butz und Bevan 1998; Murali-Krishna et al. 1998). Danach werden bei viralen Infektionsmodellen hauptsächlich spezifische T-Zellen induziert, die bei Infektion mit einem nicht verwandten Virus nicht expandieren.

Im Gegensatz zu LLO oder der Metalloprotease, die von *L. monocytogenes*-spezifischen T-Zellen erkannt werden (Safley et al. 1991; Harty und Bevan 1992; Busch et al. 1997), kommt P60 bei allen *Listeria*-Spezies stark konserviert vor (Bubert et al. 1992; Portnoy et al. 1992). Dies scheint auch nicht weiter verwunderlich, wenn man bedenkt, dass P60 als (auch für die Zellteilung) wichtiges Housekeeping-Gen für das Bakterium essentiell ist (Wuenschel et al. 1993). Außer dem MHC-Klasse II Epitop P60₃₀₁₋₃₁₂ (s.o.), sind auch die beiden bekannten MHC-Klasse I-Epitope von *L. monocytogenes*, P60₂₁₇₋₂₂₅ und P60₄₄₉₋₄₅₇, bei beiden Spezies konserviert (Bubert et al. 1992) und werden von *L. innocua*-infizierten Makrophagen-ähnlichen P388D₁-Zellen präsentiert. Über die Antigenpräsentation via MHC-Klasse I Pathway von *L. innocua* (Zwickey und Potter 1996) oder LLO-negativen *L. monocytogenes* (Szalay et al. 1994) infizierten Zellen, wurde bereits zuvor berichtet. Dabei wurde jedoch die Stärke der MHC-Klasse I- bzw. MHC-Klasse II-restringierten Präsentation nicht direkt miteinander verglichen. Obwohl unsere Versuche mit LLO-negativen *L. monocytogenes* zeigten, dass die MHC-Klasse I-restringierte Präsentation LLO-

unabhängig ist, machte der Vergleich mit LLO-sezernierenden *L. monocytogenes* die Wichtigkeit von LLO für die effiziente Antigenpräsentation über MHC-Klasse I deutlich.

Dies ist im Einklang mit den Ergebnissen einer Untersuchung der LLO-Antigenpräsentation mit LLO-spezifischen MHC-Klasse I- und MHC-Klasse II-restringierten T-Zellhybridomen (Hiltbold et al. 1996), wonach die MHC-Klasse I-restringierte Präsentation von LLO von der hämolytischen Aktivität des LLO abhängig ist. Wir dagegen untersuchten den Einfluss von sezerniertem LLO auf ein unabhängiges bakterielles Protein. Der Vergleich der P60-Präsentation von Zellen, die mit wildtypischen oder LLO-negativen *L. monocytogenes* bzw. mit *L. innocua* infiziert wurden, demonstrierte deutlich, dass die Sekretion von LLO die Präsentation listerieller Proteine über MHC Klasse I stark verstärkt, während die über MHC-Klasse II gehemmt wird.

Trotz der starken Inhibition der MHC-Klasse I-restringierten Antigenpräsentation von P60 *in vitro*, konnten *in vivo* P60-spezifische CD4 T-Zellen sehr oft beobachtet werden. Zellen spezifisch für des CD4 T-Zellepitop P60₃₀₁₋₃₁₂ traten ähnlich häufig auf wie jene spezifisch für das CD8 T-Zellepitop P60₄₄₉₋₄₅₇, das im Vergleich zum Epitop P60₂₁₇₋₂₂₅ subdominant ist (Vijh und Pamer 1997). So entsprach die Antwort auf P60₃₀₁₋₃₁₂ nur 10% der gesamten P60-spezifischen CD4 T-Zellantwort. Die Anzahl der Gesamt-P60 spezifischen T-Zellen entsprach der Zahl der immundominanten P60₂₁₇₋₂₂₅-spezifischen T-Zellen. Die effiziente MHC-Klasse II-Präsentation von P60 *in vivo* könnte möglicherweise auf die MHC-Klasse II-Präsentation nach sekundärer Wiederaufnahme von sezerniertem P60 oder der Aufnahme abgetöteter Bakterien zurückzuführen sein; nach deren Freisetzung aus abgetöteten Wirtszellen seitens benachbarter, nicht infizierter Zellen. So wird auch die MHC-Klasse II-Präsentation von LLO in Kulturen nichtinfizierter Makrophagen ermöglicht (Hiltbold et al. 1996).

Im Gegensatz zur starken P60-spezifischen T-Zellantwort auf eine *L. monocytogenes*-Infektion konnte auf eine primäre Infektion mit *L. innocua* keine P60-spezifische CD4- oder CD8-Antwort induziert werden, obwohl das LI-P60 von den *L. innocua*-infizierten Makrophagen präsentiert wurde. Womöglich ist die schnelle Beseitigung von *L. innocua* aus der Milz und der Leber nach einer Infektion (von Koenig et al. 1983; Hof und Hefner 1988) hierfür verantwortlich. Dementsprechend führt eine Ampicillin-Antibiotikatherapie, mit der erst am fünften Tag nach der Infektion begonnen wird, zu einer deutlichen Verringerung des Schutzes gegen eine Zweitinfektion (North et al. 1981). Auf alle Fälle demonstrierte die Aktivierung bestehender P60-spezifischer CD4 und CD8 Gedächtnis-T-Zellen durch *L. innocua* - wie bereits auf Grund der *in vitro*-Antigenpräsentations-Versuche vorhergesagt - dass *in vivo* das P60 von *L. innocua* tatsächlich von MHC-Klasse I und II präsentiert wurde.

Somit kann angenommen werden, dass unterschiedliche Reize für die Induktion sowie für die Erneuerung der T-Zellantwort verantwortlich sind. Die Situation ist vergleichbar mit den nichtimmunogenen Tumorzelllinien, die ausschließlich in zuvor immunisierten Mäusen eine Gedächtnisimmunantwort induzieren können (Kundig et al. 1993). Über den Grund für diesen Unterschied kann nur spekuliert werden. So wurde z.B. berichtet, dass tote Bakterien die IL-12-Produktion hemmen, wogegen lebende diese *in vivo* induzieren (Zhan und Cheers 1998). In Anbetracht der Wichtigkeit von IL-12 für die Induktion der Immu-

nität (O'Garra 1998), könnte die suppressive Wirkung abgetöteter *L. innocua* die Induktion der T-Zell-Immunantwort verhindern.

Die Übertragung von *L. monocytogenes* erfolgt beim Menschen hauptsächlich über die Nahrung (Tompkin 2002; Wing und Gregory 2002). Durch Versuche an abgeschnürten infizierten Dünndarmabschnitten von Ratten konnte gezeigt werden, dass das primäre Durchdringen durch die Darmwand unabhängig von den listeriellen Virulenzfaktoren erfolgt. Dabei wird *L. innocua* mit vergleichbarer Effizienz wie *L. monocytogenes* von den dendritischen Zellen unterhalb der Peyerschen Plaques aufgenommen (Pron et al. 1998, 2001). Auch die mittels Epitop-mapping von P60 mit Blutseren gesunder Individuen identifizierte *L. innocua*-spezifischen B-Zellepitope unterstützen die Annahme, dass *L. innocua* von Natur aus häufig in Kontakt mit dem Immunsystem gerät. Da das P60 von *L. innocua* 90%-ige Homologie zum P60 von *L. monocytogenes* aufweist (Bubert et al. 1992), leistet *L. innocua* einen wichtigen Beitrag für die geringe Inzidenz an Listeriosen. Durch den permanenten Kontakt mit *L. innocua*, als dem von allen *Listeria*-Spezies am häufigsten isolierten Umweltkeim (Dillon et al. 1994; Laci-ar et al. 1999; Capita et al. 2001), wird die Immunität gegenüber *L. monocytogenes* in Folge der Stimulation kreuzreaktiver *L. monocytogenes*-spezifischer CD4- und CD8-Gedächtniszellen verstärkt.

Diese Erkenntnis ist für die Listerien-Diagnostik insofern wichtig, als dass Lebensmittel-Kontrollen gezielt auf *L. monocytogenes* ausgerichtet sein müssen, um nicht einen möglicherweise natürlichen Immunschutz durch Eliminierung von *L. innocua* zu unterbinden. Dies wäre nämlich auf Grundlage eines bloßen *Listeria*-Gattungsnachweises zu befürchten. Zudem würden unnötigerweise große Mengen an Nahrungsmitteln vernichtet, nur weil ein gattungsspezifischer Test *L. innocua* nachgewiesen hätte. Darüber hinaus würde durch einen erhöhten Einsatz von bakteriostatischen bzw. bakteriziden Mitteln ein „Wettrüsten“ mit den Bakterien initiiert, da auch bei Listerien Stress in Folge verschiedener negativer Umwelteinflüsse zur Adaptation und sogar zur erhöhten Virulenz führt (Marron et al. 1997; Ripio et al. 1998; Rowan und Anderson 1998; Gnanou Besse et al. 2000; Begley et al. 2002; Wemekamp-Kamphuis et al. 2002). Somit erscheint unter den oben genannten Gesichtspunkten eine Null-Toleranz für Listerien in Lebensmitteln - wie sie z.B. in den USA gefordert wird - als nicht zweckmäßig.

Auch wäre zu prüfen, ob nicht weitere Systeme existieren, bei denen bestehende T-Zellen mit Spezifität für virulente Keime durch nicht pathogene, genetisch nah verwandte Umweltbakterien stimuliert werden, und so der Immunschutz auf natürliche Art gefördert bzw. erhalten werden kann. Schließlich wäre zu überlegen, ob nicht entsprechend auch für andere pathogene Organismen, evtl. sogar durch genetisch veränderte apathogene Listerien (Dietrich 2000; Gentshev et al. 2002) eine gut kontrollierbare risikolose Verstärkung der natürlichen Immunität erfolgen kann. Dabei könnte das ELISPOT-Verfahren eine wertvolle Dienste bei der Identifikation neuer CD4- und CD8-Epitope leisten (Geginat et al. 2001).

6.3. prfA

Wir untersuchten die *in vitro*-Transkription an den Promotoren P_{hly} , P_{plcA} , P_{actA} und P_{mpl} , die zuvor als vom Transkriptionsaktivator PrfA streng abhängig beschrieben wurden (Leimeister-Wachter et al. 1990; Chakraborty et al. 1992; Domann et al. 1992; Leimeister-Wachter et al. 1992), an den Promotoren P_{prfA1} und P_{prfA2} , deren Repression durch PrfA angenommen wurde (Mengaud et al. 1991; Freitag et al. 1993) und bei P_{iap} als PrfA-unabhängigem Kontrollpromotor (Bubert et al. 1997). Die *in vitro*-Transkription wurde mittels „run-off“-Assays bestimmt und konnte bei allen untersuchten Promotoren erfolgreich induziert werden.

Die dabei erzeugten relativ kurzen Transkripte erlauben die exakte Bestimmung der transkriptionellen Startpunkte *in vitro*, die in allen untersuchten Fällen mit denen der *in vivo* bestimmten Stellen übereinstimmen. Die Transkription beginnend an P_{actA} , P_{plcA} und P_{iap} liefert einzelne Transkripte, während die Transkription an P_{hly} zu zwei Transkripten führt, die beide jeweils ausschließlich in Gegenwart von PrfA erzeugt werden. Auf Grund der Länge dieser Transkripte ist anzunehmen, dass sie an den zuvor *in vivo* bestimmten Transkription-Startpunkten, P1 und P2 (Mengaud et al. 1989) initiiert werden. Vergleichbar mit der *in vivo* Situation, wird auch *in vitro* P1 stärker transkribiert als P2.

Überraschender Weise stimmt die *in vitro* gezeigte PrfA-unabhängige Transkriptionsinduktion beginnend bei P_{mpl} nicht mit den *in vivo*-Beobachtungen überein (Mengaud et al. 1991; Freitag et al. 1993; Williams et al. 2000). Das in unserem Experiment eingesetzte *mpl*-Promotor-Fragment enthält die gesamte Sequenz, einschließlich der bereits früher als putative PrfA-Binderegion bezeichneten Sequenz (5'-TTAACAAATGTAAA-3'), sowie 20 Basenpaare (5'-) upstream davon. Die Fehlpaarungen in der vermuteten PrfA-Binderegion von P_{mpl} lassen annehmen, dass die Transkription an P_{mpl} nur in Gegenwart hoher Konzentrationen an PrfA gewährleistet ist, weil nur dann die Bindung an diese PrfA-Box erfolgen kann. Ohne PrfA ist die Transkription *in vitro* an P_{mpl} ebenso stark wie am PrfA-unabhängigen Promotor P_{iap} und kann auch durch die Zugabe von größeren Mengen an PrfA-Protein nicht weiter verstärkt werden. Vielmehr scheint die Transkriptionseffizienz durch die PrfA-Zugabe gehemmt zu werden. Die Sequenzierung des in den *in vitro*-Transkriptions-Assays eingesetzten *mpl*-Konstrukts offenbarte keine Abweichungen in der Nukleinsäuresequenz, die für eine andere Startregion und somit für ein Transkriptartefakt verantwortlich hätte gemacht werden können.

Frühere *in vivo*-Daten führten zu der Annahme, dass die PrfA-abhängige Transkription an P_{mpl} zu einer polycistronischen mRNA führt, die *mpl*, *actA*, *plcB* und einige kleinere, uncharakterisierte offene Leseraster enthält (Mengaud et al. 1991). Bei anderen *in vivo*-Untersuchungen war nur eine geringe Transkription von *mpl* festzustellen. Ebenso konnte keine Transkriptionsinduktion beobachtet werden, unter Bedingungen, bei denen echt PrfA-abhängige Gene (*hly*, *plcA* und *actA*) induziert wurden, wie z.B. in MEM (Bohne et al. 1994). Die vorliegenden *in vitro*-Daten zur Transkriptionsinitiation bei P_{mpl} zeigen auch höhere Aktivität mit $RNAP_{BHI}$ als mit $RNAP_{MEM}$. An Hand dieser Ergebnisse stellt sich die Frage, ob ein bzw. mehrere zusätzliche Faktoren oder eine besondere DNA-Tertiärstruktur notwendig sind, um das PrfA-Protein an die

eher degenerierte PrfA-Box von P_{mpl} zu binden, um die Transkription von *mpl in vivo* zu initiieren. An dieser Stelle sei hervorgehoben, dass im *in vitro*-System linearisierte DNA und gereinigtes PrfA-Protein eingesetzt werden. Somit sind alle positiven und negativen Einflüsse, sowohl einer spezifischen DNA-Tertiärstruktur als auch zusätzlicher Faktoren auf die Bindung von PrfA an die verschiedenen Bindungsregionen ausgeschlossen. Die beobachtete PrfA-unabhängige *in vitro*-Transkription an P_{mpl} ist nicht so überraschend, wenn man berücksichtigt, dass die -10 Box von P_{mpl} für die mit dem vegetativen Sigmafaktor 43 beladene RNA-Polymerase eine perfekte Konsensussequenz darstellt (TATAAT).

Die Expression der *prfA*-Gene wird von mehreren Promotoren reguliert. Zusätzlich zum autoregulierten Promotor vor *plcA*, der durch PrfA induziert wird und zu einem bicistronischem *plcA-prf*-Transkript führt (Mengaud et al. 1991; Freitag et al. 1993), existieren noch zwei weitere Promotoren (P_{prfA1} und P_{prfA2}) direkt vor dem *prfA* Gen. Diese beiden letztgenannten scheinen auch *in vivo* aktiv zu sein (Freitag und Portnoy 1994). Für P_{prfA2} wurde eine negative Regulation durch PrfA angenommen (Freitag et al. 1993). Diese Behauptung scheint gestützt durch das Vorhandensein einer PrfA-Box-ähnlichen Sequenz in der upstream-Region von P_{prfA2} (Lampidis et al. 1994). Jedenfalls konnte in anderen Arbeiten, die eine andere experimentelle Herangehensweise aufweisen, eine negative Kontrolle von P_{prfA2} seitens PrfA nicht bestätigt werden (Bohne et al. 1996; Bubert et al. 1997). P_{prfA1} und P_{prfA2} waren *in vitro* sowohl in Gegenwart als auch bei Fehlen von PrfA aktiv, und selbst hohe PrfA-Konzentrationen hatten weder einen Einfluss auf die Transkription an P_{prfA1} , noch an P_{prfA2} .

Voraussetzung für die erfolgreiche *in vitro*-Transkriptionsinitiation an den genannten Promotoren ist, dass die ersten drei rNTPs in ungefähr 50-fachem Überschuss gegenüber dem vierten radioaktiv markierten NTP vorliegen. In den meisten Fällen ist ein Überschuss an ATP nötig, um die Initiation der Transkription an den untersuchten Promotoren zu gewährleisten. Da es nicht möglich war, durch die Zugabe des ATP-Analogons ddATP das ATP zu ersetzen, ist es eher unwahrscheinlich, dass ATP lediglich als Energiequelle fungiert. Außerdem war auch UTP in der Lage, die Initiation der Transkription von diesen Promotoren zu verstärken. Darüber hinaus zeigte der kombinierte Einsatz beider rNTPs (ATP und UTP) den stärksten Effekt. Die einzige Ausnahme stellt P_{prfA2} dar, das entsprechend (erste drei rNTPs: AAG) GTP in 50-fachem Überschuss zur Transkriptionsinitiation benötigte. Die Tatsache, dass die meisten Promotoren ATP (und UTP) in höheren Konzentrationen für die Initiation der Transkription durch die listerielle RNA-Polymerase benötigen, ist vergleichbar mit dem erhöhten Bedarf an GTP und ATP bei der Transkriptionsinitiation der *E. coli* RNA-Polymerase. Diese benötigt GTP (und/oder ATP), um in die entsprechende Initiationskonformation überführt zu werden (Nieman und Chamberlin 1979).

In der Literatur häufen sich die Berichte, dass außer der zellulären PrfA-Konzentration noch weitere listerielle Faktoren oder Umwelteinflüsse die differentielle PrfA-vermittelte Genregulation beeinflussen (Bockmann et al. 1996; Bohne et al. 1996; Bubert et al. 1997; Renzoni et al. 1997; Vega et al. 1998; Bubert et al. 1999; Bockmann et al. 2000; Kreft und Vazquez-Boland 2001; Lalic-Multhaler et al. 2001; Con-

te et al. 2002; Johansson et al. 2002; Shetron-Rama et al. 2002). Während der Grossteil dieser Studien davon ausgeht, dass es einen Faktor gibt, der PrfA aktiviert oder hemmt, zeigen unsere Ergebnisse, dass hier auch die Modifikation der RNA-Polymerase eine entscheidende Rolle spielt.

Die verschiedenen über eine Heparinsäule aufgetrennten RNAP-Fractionen von *L. monocytogenes* zeigten, je nachdem ob die Kulturen einer Hitzeschockbehandlung bei 48°C (RNAP₄₈) ausgesetzt, nach MEM geschiftet (RNAP_{MEM}) oder aber direkt aus dem BHI-Medium (RNAP_{BHI}) geerntet wurden, unterschiedliche Aktivitätsprofile. Alle untersuchten Promotoren waren *in vitro* mit Fraktion 16 der RNAP_{BHI} in der Lage die Transkription mit höchster Effizienz zu initiieren. Die beobachteten Transkriptionseffizienzen der einzelnen Promotoren nahmen wie folgt ab: $P_{iap} = P_{prfA1} = P_{mpl} > P_{hly} > P_{actA} > P_{prfA2}$, während bei allen Promotoren nur eine geringe Transkription mit der spät eluierenden Fraktion 20 zu beobachten war. Bei Fraktion 16 der RNAP₄₈ entsprach die Reihenfolge $P_{iap} = P_{hly} > P_{actA} = P_{prfA1} > P_{mpl} > P_{prfA2}$, und hier fand auch bei Fraktion 20 eine deutliche Transkription an den PrfA-abhängigen Promotoren P_{hly} und P_{actA} statt. Die verstärkte Aktivität dieser beiden Promotoren wurde insbesondere für P_{actA} mit RNAP_{MEM} noch deutlicher. Die beobachteten Aktivitätsprofile der *in vitro* analysierten Promotoren stimmen gut mit den bereits früher gemachten Beobachtungen über die Transkription dieser Gene nach der Anzucht von *L. monocytogenes* in BHI, MEM bzw. nach Hitzeschockbehandlung überein (Sokolovic et al. 1993; Bohne et al. 1996).

Ebenso wie unter *in vivo*-Bedingungen erfolgt auch *in vitro* bei allen drei RNAP-Präparationen die Transkription von *prfA* am Promotor P_{prfA1} mit höherer Effizienz als an P_{prfA2} . Interessanter Weise tritt bei der *in vitro*-Transkription an P_{prfA1} eine deutliche Veränderung der Aktivität in Abhängigkeit von der verwendeten RNAP-Präparation auf. Die transkriptionelle Aktivität der Promotoren P_{prfA1} und P_{prfA2} war sowohl bei Fraktion 16 als auch bei Fraktion 20 mit RNAP₄₈ stärker als mit RNAP_{BHI}, während sie vor allem für P_{prfA1} mit RNAP_{MEM} bei beiden Fraktionen sehr niedrig ausfällt. Dies führt zu der Annahme, dass P_{prfA1} nicht zur *in vivo* in MEM zu beobachtenden Induktion der *prfA*-Expression beiträgt (Bohne et al. 1994). Auffallend ist auch, dass P_{prfA2} zwar mit Fraktion 16 ebenfalls diese Abnahme der Aktivität von RNAP_{BHI} über RNAP₄₈ nach RNAP_{MEM} zeigt, jedoch in der späten Fraktion 20 - entsprechend einem Switch von den früh eluierenden Fraktionen zu den späten Fraktionen - der genau umgekehrte Effekt auftritt: $RNAP_{BHI} < RNAP_{48} < RNAP_{MEM}$. Außerdem kann angenommen werden, dass die *in vivo* auftretende *prfA*-Induktion zum großen Teil auch auf das bei P_{plcA} beginnende bicistronische *plcA-prfA* Transkript, zurückzuführen ist. *In vitro* waren tatsächlich ähnliche Transkriptionseffizienzen an P_{plcA} wie an P_{actA} und P_{hly} zu beobachten.

Obwohl die drei eingesetzten RNAP-Präparationen nur grob aufgereinigt waren, ist nicht anzunehmen, dass die beobachteten Unterschiede der Aktivität auf einen oder mehrere direkt mit PrfA interagierende Faktoren zurückzuführen sind. Denn alle RNAP-Aufreinigungen wurden aus Lysaten einer *prfA*-Deletionsmutante gewonnen, so dass kein PrfA, das im Zuge der Abtrennung DNA-bindender Proteine PrfA-bindende Faktoren an der Heparinsäule dimerisieren könnte, vorhanden sein sollte. Über die Ursachen für die beobachteten Veränderungen der *in vitro*-Transkription mit den drei RNAP-Präparationen kann nur spekuliert werden. Bei *Bacillus subtilis* konnte gezeigt werden, dass RNAP, die mit verschiedenen Sigmafaktoren beladen ist, nach der Auftrennung über eine Heparinsäule unterschiedliche Elutionsprofile

aufweist (Tatti und Moran 1996). Wahrscheinlich wird RNAP₄₈ ebenso wie RNAP_{MEM} mit unterschiedlichen Sigmafaktoren beladen. Dies wäre eine mögliche Erklärung für die erhöhte spezifische Aktivität, die in den später eluierenden Fraktionen von RNAP₄₈ und RNAP_{MEM} zu beobachten ist. Betrachtet man die Induktion der PrfA-abhängigen Promotoren P_{ply} und P_{octA} mit diesen Stress-RNAP-Präparationen, so wäre es denkbar, dass diese Promotoren zusammen mit einem anderen, erst unter Stressbedingungen induzierten Sigmafaktor besser von der listeriellen RNA-Polymerase erkannt werden, als mit dem vegetativen Sigmafaktor 43 (Metzger et al. 1994). Tatsächlich konnte erst kürzlich gezeigt werden, dass P_{prfA2} vom Sigmafaktor sigB gebunden und die Transkription des Virulenzgenclusters über die Regulation von PrfA mit beeinflusst wird (Nadon et al. 2002). Nichtsdestotrotz schließen unsere Daten auch andere Modifikationen der RNA-Polymerase unter diesen Bedingungen nicht aus.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das beschriebene *in vitro*-Transkriptionssystem ein vielversprechendes Werkzeug ist, einerseits für die detaillierte Erforschung der PrfA-abhängigen Genregulation und andererseits für die Identifizierung zusätzlicher Faktoren, die für die differentielle Expression PrfA-abhängiger Gene benötigt werden. Das *in vitro*-Transkriptionssystem bietet sich vor allem an in Kombination mit weiteren molekulargenetischen Separationsmethoden, wie dem vorangestellten Fischen der verschiedenen RNA-Polymerase-Formen mittels magnetischer Beads, die zuvor mit den entsprechenden Promotor-DNA-Sonden gecoated wurden.

- Agranoff, D. D. and S. Krishna (1998). "Metal ion homeostasis and intracellular parasitism." *Mol Microbiol* **28**(3): 403-12.
- Ahmed, R. and D. Gray (1996). "Immunological memory and protective immunity: understanding their relation." *Science* **272**(5258): 54-60.
- Akita, E. M. and S. Nakai (1993). "Production and purification of Fab' fragments from chicken egg yolk immunoglobulin Y (IgY)." *J Immunol Methods* **162**(2): 155-64.
- Alavi, S. H., V. M. Puri, et al. (1999). "Development and validation of a dynamic growth model for *Listeria monocytogenes* in fluid whole milk." *J Food Prot* **62**(2): 170-6.
- Albert, M. L., B. Sauter, et al. (1998). "Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs." *Nature* **392**(6671): 86-9.
- al-Ghazali, M. R. and S. K. al-Azawi (1988). "Storage effects of sewage sludge cake on the survival of *Listeria monocytogenes*." *J Appl Bacteriol* **65**(3): 209-13.
- Allerberger, F., M. Dierich, et al. (1997). "Nonhemolytic strains of *Listeria monocytogenes* detected in milk products using VIDAS immunoassay kit." *Zentralbl Hyg Umweltmed* **200**(2-3): 189-95.
- Alvarez-Dominguez, C., E. Carrasco-Marin, et al. (1993). "Role of complement component C1q in phagocytosis of *Listeria monocytogenes* by murine macrophage-like cell lines." *Infect Immun* **61**(9): 3664-72.
- Alvarez-Dominguez, C., J. A. Vazquez-Boland, et al. (1997). "Host cell heparan sulfate proteoglycans mediate attachment and entry of *Listeria monocytogenes*, and the listerial surface protein ActA is involved in heparan sulfate receptor recognition." *Infect Immun* **65**(1): 78-88.
- anonymous (2000). "Multistate outbreak of listeriosis--United States, 2000." *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* **49**(50): 1129-30.
- Ashkar, S., G. F. Weber, et al. (2000). "Eta-1 (osteopontin): an early component of type-1 (cell-mediated) immunity." *Science* **287**(5454): 860-4.
- Aureli, P., G. C. Fiorucci, et al. (2000). "An outbreak of febrile gastroenteritis associated with corn contaminated by *Listeria monocytogenes*." *N Engl J Med* **342**(17): 1236-41.
- Bade, H. and H. Stegemann (1984). "Rapid method of extraction of antibodies from hen egg yolk." *J Immunol Methods* **72**(2): 421-6.
- Baeuerle, P. A. (1991). "The inducible transcription activator NF-kappa B: regulation by distinct protein subunits." *Biochim Biophys Acta* **1072**(1): 63-80.
- Begley, M., C. G. Gahan, et al. (2002). "Bile Stress Response in *Listeria monocytogenes* LO28: Adaptation, Cross-Protection, and Identification of Genetic Loci Involved in Bile Resistance." *Appl Environ Microbiol* **68**(12): 6005-12.
- Bennett, S. R., F. R. Carbone, et al. (1997). "Induction of a CD8+ cytotoxic T lymphocyte response by cross-priming requires cognate CD4+ T cell help." *J Exp Med* **186**(1): 65-70.
- Berche, P., J. L. Gaillard, et al. (1987). "T cell recognition of listeriolysin O is induced during infection with *Listeria monocytogenes*." *J Immunol* **139**(11): 3813-21.
- Berche, P., J. L. Gaillard, et al. (1987). "Intracellular growth of *Listeria monocytogenes* as a prerequisite for *in vivo* induction of T cell-mediated immunity." *J Immunol* **138**(7): 2266-71.

- Beumer, R. R., M. C. te Giffel, et al. (1997). "Optimization of haemolysis in enhanced haemolysis agar (EHA)--a selective medium for the isolation of *Listeria monocytogenes*." Lett Appl Microbiol **24**(5): 421-5.
- Beverley, P. C. (1990). "Is T-cell memory maintained by crossreactive stimulation?" Immunol Today **11**(6): 203-5.
- Bhunia, A. K. (1997). "Antibodies to *Listeria monocytogenes*." Crit Rev Microbiol **23**(2): 77-107.
- Bhunia, A. K., P. J. Steele, et al. (1994). "A six-hour *in vitro* virulence assay for *Listeria monocytogenes* using myeloma and hybridoma cells from murine and human sources." Microb Pathog **16**(2): 99-110.
- Blanden, R. V. and R. E. Langman (1972). "Cell-mediated immunity to bacterial infection in the mouse. Thymus-derived cells as effectors of acquired resistance to *Listeria monocytogenes*." Scand J Immunol **1**(4): 379-91.
- Bockmann, R., C. Dickneite, et al. (2000). "PrfA mediates specific binding of RNA polymerase of *Listeria monocytogenes* to PrfA-dependent virulence genes resulting in a transcriptionally active complex." Mol Microbiol **36**(2): 487-97.
- Bockmann, R., C. Dickneite, et al. (1996). "Specific binding of the *Listeria monocytogenes* transcriptional regulator PrfA to target sequences requires additional factor(s) and is influenced by iron." Mol Microbiol **22**(4): 643-53.
- Bohne, J., H. Kestler, et al. (1996). "Differential regulation of the virulence genes of *Listeria monocytogenes* by the transcriptional activator PrfA." Mol Microbiol **20**(6): 1189-98.
- Bohne, J., Z. Sokolovic, et al. (1994). "Transcriptional regulation of *prfA* and PrfA-regulated virulence genes in *Listeria monocytogenes*." Mol Microbiol **11**(6): 1141-50.
- Bortolussi, R., C. M. Vandenbroucke-Grauls, et al. (1987). "Relationship of bacterial growth phase to killing of *Listeria monocytogenes* by oxidative agents generated by neutrophils and enzyme systems." Infect Immun **55**(12): 3197-203.
- Bouwer, H. G. and D. J. Hinrichs (1996). "Cytotoxic-T-lymphocyte responses to epitopes of listeriolysin O and p60 following infection with *Listeria monocytogenes*." Infect Immun **64**(7): 2515-22.
- Bouwer, H. G., H. Shen, et al. (1999). "Existing antilisterial immunity does not inhibit the development of a *Listeria monocytogenes*-specific primary cytotoxic T-lymphocyte response." Infect Immun **67**(1): 253-8.
- Braun, L., F. Nato, et al. (1999). "The 213-amino-acid leucine-rich repeat region of the *Listeria monocytogenes* InlB protein is sufficient for entry into mammalian cells, stimulation of PI 3-kinase and membrane ruffling." Mol Microbiol **34**(1): 10-23.
- Braun, L., H. Ohayon, et al. (1998). "The InlB protein of *Listeria monocytogenes* is sufficient to promote entry into mammalian cells." Mol Microbiol **27**(5): 1077-87.
- Bregenholt, S., P. Berche, et al. (2001). "Conventional alpha beta T cells are sufficient for innate and adaptive immunity against enteric *Listeria monocytogenes*." J Immunol **166**(3): 1871-6.
- Brehm, K., A. Haas, et al. (1992). "A gene encoding a superoxide dismutase of the facultative intracellular bacterium *Listeria monocytogenes*." Gene **118**(1): 121-5.
- Brehm, K., J. Kreff, et al. (1996). "Regulation of virulence gene expression in pathogenic *Listeria*." Microbiologia **12**(2): 219-36.
- Brehm, K., M. T. Ripio, et al. (1999). "The *bvr* locus of *Listeria monocytogenes* mediates virulence gene repression by beta-glucosides." J Bacteriol **181**(16): 5024-32.
- Brett, M. S., P. Short, et al. (1998). "A small outbreak of listeriosis associated with smoked mussels." Int J Food Microbiol **43**(3): 223-9.
- Brundage, R. A., G. A. Smith, et al. (1993). "Expression and phosphorylation of the *Listeria monocytogenes* ActA protein in mammalian cells." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(24): 11890-4.
- Bruno, L., J. Kirberg, et al. (1995). "On the cellular basis of immunological T cell memory." Immunity **2**(1): 37-43.

- Brunt, L. M., D. A. Portnoy, et al. (1990). "Presentation of *Listeria monocytogenes* to CD8+ T cells requires secretion of hemolysin and intracellular bacterial growth." J Immunol **145**(11): 3540-6.
- Bubert, A. (1993). Vergleichende molekulargenetische and funktionale Analyse der *iap*-Gene bzw. p60 Proteine aus *Listeria* und deren diagnostische Anwendungen. Lehrstuhl für Mikrobiologie, Universität Würzburg.
- Bubert, A., H. Kestler, et al. (1997). "The *Listeria monocytogenes iap* gene as an indicator gene for the study of PrfA-dependent regulation." Mol Gen Genet **256**(1): 54-62.
- Bubert, A., S. Kohler, et al. (1992). "The homologous and heterologous regions within the *iap* gene allow genus- and species-specific identification of *Listeria* spp. by polymerase chain reaction." Appl Environ Microbiol **58**(8): 2625-32.
- Bubert, A., M. Kuhn, et al. (1992). "Structural and functional properties of the p60 proteins from different *Listeria* species." J Bacteriol **174**(24): 8166-71.
- Bubert, A., J. Riebe, et al. (1997). "Isolation of catalase-negative *Listeria monocytogenes* strains from listeriosis patients and their rapid identification by anti-p60 antibodies and/or PCR." J Clin Microbiol **35**(1): 179-83.
- Bubert, A., P. Schubert, et al. (1994). "Synthetic peptides derived from the *Listeria monocytogenes* p60 protein as antigens for the generation of polyclonal antibodies specific for secreted cell-free *L. monocytogenes* p60 proteins." Appl Environ Microbiol **60**(9): 3120-7.
- Bubert, A., Z. Sokolovic, et al. (1999). "Differential expression of *Listeria monocytogenes* virulence genes in mammalian host cells." Mol Gen Genet **261**(2): 323-36.
- Burger, D., M. A. Ramus, et al. (1985). "Antibodies to human plasma kallikrein from egg yolks of an immunized hen: preparation and characterization." Thromb Res **40**(2): 283-8.
- Burley, R. W. and W. H. Cook (1961). Can. J. Biochem. Physiol. **39**(9): 1295.
- Busch, D. H., H. G. Bouwer, et al. (1997). "A nonamer peptide derived from *Listeria monocytogenes* metalloprotease is presented to cytolytic T lymphocytes." Infect Immun **65**(12): 5326-9.
- Busch, D. H., I. M. Pilip, et al. (1998). "Coordinate regulation of complex T cell populations responding to bacterial infection." Immunity **8**(3): 353-62.
- Butz, E. A. and M. J. Bevan (1998). "Massive expansion of antigen-specific CD8+ T cells during an acute virus infection." Immunity **8**(2): 167-75.
- Capell, C. J., R. M. Kirby, et al. (1995). "A method and medium for the electrical detection of *Listeria* spp. from food." Int J Food Microbiol **25**(2): 169-77.
- Capita, R., C. Alonso-Calleja, et al. (2001). "Occurrence of *Listeria* species in retail poultry meat and comparison of a cultural/immunoassay for their detection." Int J Food Microbiol **65**(1-2): 75-82.
- Caron, E., J. P. Liautard, et al. (1994). "Differentiated U937 cells exhibit increased bactericidal activity upon LPS activation and discriminate between virulent and avirulent *Listeria* and *Brucella* species." J Leukoc Biol **56**(2): 174-81.
- Chakraborty, T., M. Leimeister-Wachter, et al. (1992). "Coordinate regulation of virulence genes in *Listeria monocytogenes* requires the product of the *prfA* gene." J Bacteriol **174**(2): 568-74.
- Christie, R., N. E. Atkins, et al. (1944). "A note on lytic phenome-non shown by Group B strepto-cocci." Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci. **22**: 197-200.
- Cocolin, L., M. Manzano, et al. (1997). "A PCR-microplate capture hybridization method to detect *Listeria monocytogenes* in blood." Mol Cell Probes **11**(6): 453-5.

- Cocolin, L., K. Rantsiou, et al. (2002). "Direct Identification in Food Samples of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* by Molecular Methods." Appl Environ Microbiol **68**(12): 6273-82.
- Comi, G., L. Cocolin, et al. (1997). "A RE-PCR method to distinguish *Listeria monocytogenes* serovars." FEMS Immunol Med Microbiol **18**(2): 99-104.
- Conlan, J. W. (1999). "Early host-pathogen interactions in the liver and spleen during systemic murine listeriosis: an overview." Immunobiology **201**(2): 178-87.
- Conte, M. P., C. Longhi, et al. (1996). "Iron availability affects entry of *Listeria monocytogenes* into the enterocytelike cell line Caco-2." Infect Immun **64**(9): 3925-9.
- Conte, M. P., G. Petrone, et al. (2002). "Effect of acid adaptation on the fate of *Listeria monocytogenes* in THP- 1 human macrophages activated by gamma interferon." Infect Immun **70**(8): 4369-78.
- Cordano, A. M. and J. Rocourt (2001). "Occurrence of *Listeria monocytogenes* in food in Chile." Int J Food Microbiol **70**(1-2): 175-8.
- Cossart, P. and J. Mengaud (1989). "*Listeria monocytogenes*. A model system for the molecular study of intracellular parasitism." Mol Biol Med **6**(5): 463-74.
- Cotter, P. D., C. G. Gahan, et al. (2001). "A glutamate decarboxylase system protects *Listeria monocytogenes* in gastric fluid." Mol Microbiol **40**(2): 465-75.
- Dabiri, G. A., J. M. Sanger, et al. (1990). "*Listeria monocytogenes* moves rapidly through the host-cell cytoplasm by inducing directional actin assembly." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(16): 6068-72.
- Dai, W. J., W. Bartens, et al. (1997). "Impaired macrophage listericidal and cytokine activities are responsible for the rapid death of *Listeria monocytogenes*-infected IFN- gamma receptor-deficient mice." J Immunol **158**(11): 5297-304.
- Dallmier, A. W. and S. E. Martin (1990). "Catalase, superoxide dismutase, and hemolysin activities and heat susceptibility of *Listeria monocytogenes* after growth in media containing sodium chloride." Appl Environ Microbiol **56**(9): 2807-10.
- Dalton, C. B., C. C. Austin, et al. (1997). "An outbreak of gastroenteritis and fever due to *Listeria monocytogenes* in milk." N Engl J Med **336**(2): 100-5.
- Darji, A., T. Chakraborty, et al. (1997). "TAP-dependent major histocompatibility complex class I presentation of soluble proteins using listeriolysin." Eur J Immunol **27**(6): 1353-9.
- Davey, B. (1989), Immunology-A Foudation Text, Open Univerity Press
- Davies, J. W., E. P. Ewan, et al. (1984). "*Listeria monocytogenes* infections in Canada." Clin Invest Med **7**(4): 315-20.
- de Chastellier, C. and P. Berche (1994). "Fate of *Listeria monocytogenes* in murine macrophages: evidence for simultaneous killing and survival of intracellular bacteria." Infect Immun **62**(2): 543-53.
- De Luca, G., F. Zanetti, et al. (1998). "Occurrence of *Listeria monocytogenes* in sewage sludge." Zentralbl Hyg Umweltmed **201**(3): 269-77.
- de Valk, H., V. Vaillant, et al. (2001). "Two consecutive nationwide outbreaks of Listeriosis in France, October 1999-February 2000." Am J Epidemiol **154**(10): 944-50.
- Decatur, A. L. and D. A. Portnoy (2000). "A PEST-like sequence in listeriolysin O essential for *Listeria monocytogenes* pathogenicity." Science **290**(5493): 992-5.
- Demuth, A., W. Goebel, et al. (1996). "Differential regulation of cytokine and cytokine receptor mRNA expression upon infection of bone marrow-derived macrophages with *Listeria monocytogenes*." Infect Immun **64**(9): 3475-83.
- Dickneite, C., R. Bockmann, et al. (1998). "Differential interaction of the transcription factor PrfA and the PrfA- activating factor (Paf) of *Listeria monocytogenes* with target sequences." Mol Microbiol **27**(5): 915-28.

- Dietrich, G. (2000). "Current status and future perspectives of DNA vaccine delivery by attenuated intracellular bacteria." *Arch Immunol Ther Exp* **48**(3): 177-82.
- Dietrich, G., A. Bubert, et al. (1998). "Delivery of antigen-encoding plasmid DNA into the cytosol of macrophages by attenuated suicide *Listeria monocytogenes*." *Nat Biotechnol* **16**(2): 181-5.
- Dillon, R., T. Patel, et al. (1994). "Occurrence of *Listeria* in hot and cold smoked seafood products." *Int J Food Microbiol* **22**(1): 73-7.
- Domann, E., M. Leimeister-Wachter, et al. (1991). "Molecular cloning, sequencing, and identification of a metalloprotease gene from *Listeria monocytogenes* that is species specific and physically linked to the listeriolysin gene." *Infect Immun* **59**(1): 65-72.
- Domann, E., J. Wehland, et al. (1993). "Detection of a *prfA*-independent promoter responsible for listeriolysin gene expression in mutant *Listeria monocytogenes* strains lacking the PrfA regulator." *Infect Immun* **61**(7): 3073-5.
- Domann, E., J. Wehland, et al. (1992). "A novel bacterial virulence gene in *Listeria monocytogenes* required for host cell microfilament interaction with homology to the proline-rich region of vinculin." *Embo J* **11**(5): 1981-90.
- Domann, E., S. Zechel, et al. (1997). "Identification and characterization of a novel PrfA-regulated gene in *Listeria monocytogenes* whose product, IrpA, is highly homologous to internalin proteins, which contain leucine-rich repeats." *Infect Immun* **65**(1): 101-9.
- Donnelly, C. W., G. J. Baigent, et al. (1988). "Flow cytometry for automated analysis of milk containing *Listeria monocytogenes*." *J Assoc Off Anal Chem* **71**(3): 655-8.
- Dons, L., O. F. Rasmussen, et al. (1992). "Cloning and characterization of a gene encoding flagellin of *Listeria monocytogenes*." *Mol Microbiol* **6**(20): 2919-29.
- Dramsı, S., I. Biswas, et al. (1995). "Entry of *Listeria monocytogenes* into hepatocytes requires expression of InlB, a surface protein of the internalin multigene family." *Mol Microbiol* **16**(2): 251-61.
- Dramsı, S., P. Dehoux, et al. (1997). "Identification of four new members of the internalin multigene family of *Listeria monocytogenes* EGD." *Infect Immun* **65**(5): 1615-25.
- Dramsı, S., C. Kocks, et al. (1993). "Internalin-mediated invasion of epithelial cells by *Listeria monocytogenes* is regulated by the bacterial growth state, temperature and the pleiotropic activator *prfA*." *Mol Microbiol* **9**(5): 931-41.
- Drevets, D. A., P. J. Leenen, et al. (1996). "Complement receptor type 3 mediates phagocytosis and killing of *Listeria monocytogenes* by a TNF-alpha- and IFN-gamma-stimulated macrophage precursor hybrid." *Cell Immunol* **169**(1): 1-6.
- Dunn, P. L. and R. J. North (1991). "Early gamma interferon production by natural killer cells is important in defense against murine listeriosis." *Infect Immun* **59**(9): 2892-900.
- Eckmann, L., M. F. Kagnoff, et al. (1993). "Epithelial cells secrete the chemokine interleukin-8 in response to bacterial entry." *Infect Immun* **61**(11): 4569-74.
- Egan, P. J. and S. R. Carding (2000). "Downmodulation of the inflammatory response to bacterial infection by gammadelta T cells cytotoxic for activated macrophages." *J Exp Med* **191**(12): 2145-58.
- Ehl, S., J. Hombach, et al. (1997). "Bystander activation of cytotoxic T cells: studies on the mechanism and evaluation of *in vivo* significance in a transgenic mouse model." *J Exp Med* **185**(7): 1241-51.
- Elsner, H. A., I. Sobottka, et al. (1996). "Catalase-negative *Listeria monocytogenes* causing lethal sepsis and meningitis in an adult hematologic patient." *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **15**(12): 965-7.

- Engelbrecht, F., S. K. Chun, et al. (1996). "A new PrfA-regulated gene of *Listeria monocytogenes* encoding a small, secreted protein which belongs to the family of internalins." Mol Microbiol **21**(4): 823-37.
- Engelbrecht, F., C. Dickneite, et al. (1998a). "Sequence comparison of the chromosomal regions encompassing the internalin C genes (inlC) of *Listeria monocytogenes* and *L. ivanovii*." Mol Gen Genet **257**(2): 186-97.
- Engelbrecht, F., G. Dominguez-Bernal, et al. (1998b). "A novel PrfA-regulated chromosomal locus, which is specific for *Listeria ivanovii*, encodes two small, secreted internalins and contributes to virulence in mice." Mol Microbiol **30**(2): 405-17.
- Ermolaeva, S. A., I. F. Belyi, et al. (2000). "[Changes in the virulence factor expression level in *Listeria monocytogenes* under various environmental conditions]." Mol Gen Mikrobiol Virusol **1**: 17-9.
- Farber, J. M. (2000). "Present situation in Canada regarding *Listeria monocytogenes* and ready- to-eat seafood products." Int J Food Microbiol **62**(3): 247-51.
- Farber, J. M. and P. I. Peterkin (1991). "*Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen." Microbiol Rev **55**(3): 476-511.
- Farber, J. M., G. W. Sanders, et al. (1989). "The effect of various acidulants on the growth of *Listeria monocytogenes*." Letts. Appl. Microbiol. **9**: 181-193.
- Fenlon, D. R. (1985). "Wild birds and silage as reservoirs of *Listeria* in the agricultural environment." J Appl Bacteriol **59**(6): 537-43.
- Fensterle, J., L. Grode, et al. (1999). "Effective DNA vaccination against listeriosis by prime/boost inoculation with the gene gun." J Immunol **163**(8): 4510-8.
- Finlay, B. B. and S. Falkow (1997). "Common themes in microbial pathogenicity revisited." Microbiol Mol Biol Rev **61**(2): 136-69.
- Firstenberg-Eden, R. and L. A. Shelef (2000). "A new rapid automated method for the detection of *Listeria* from environmental swabs and sponges." Int J Food Microbiol **56**(2-3): 231-7.
- Fischer, M., A. Hlinak, et al. (1996). "[Comparison of standard methods for the preparation of egg yolk antibodies]." Tierarztl Prax **24**(4): 411-8.
- Fisher, C. W., D. Lee, et al. (2000). "Influence of catalase and superoxide dismutase on ozone inactivation of *Listeria monocytogenes*." Appl Environ Microbiol **66**(4): 1405-9.
- Fisher, C. W. and S. E. Martin (1999). "Effects of iron and selenium on the production of catalase, superoxide dismutase, and listeriolysin O in *Listeria monocytogenes*." J Food Prot **62**(10): 1206-9.
- Freitag, N. E. and K. E. Jacobs (1999). "Examination of *Listeria monocytogenes* intracellular gene expression by using the green fluorescent protein of *Aequorea victoria*." Infect Immun **67**(4): 1844-52.
- Freitag, N. E. and D. A. Portnoy (1994). "Dual promoters of the *Listeria monocytogenes* *prfA* transcriptional activator appear essential *in vitro* but are redundant *in vivo*." Mol Microbiol **12**(5): 845-53.
- Freitag, N. E., L. Rong, et al. (1993). "Regulation of the *prfA* transcriptional activator of *Listeria monocytogenes*: multiple promoter elements contribute to intracellular growth and cell-to-cell spread." Infect Immun **61**(6): 2537-44.
- Fruh, K. and Y. Yang (1999). "Antigen presentation by MHC class I and its regulation by interferon gamma." Curr Opin Immunol **11**(1): 76-81.
- Füzi, M. and Pillis (1962). "Production of opacity in egg-yolk medium by *Listeria monocytogenes*." Nature **196**: 195.
- Gaillard, J. L., P. Berche, et al. (1991). "Entry of *L. monocytogenes* into cells is mediated by internalin, a repeat protein reminiscent of surface antigens from gram-positive cocci." Cell **65**(7): 1127-41.
- Gaillard, J. L., P. Berche, et al. (1987). "In vitro model of penetration and intracellular growth of *Listeria monocytogenes* in the human enterocyte-like cell line Caco-2." Infect Immun **55**(11): 2822-9.

- Gaillot, O., E. Pellegrini, et al. (2000). "The ClpP serine protease is essential for the intracellular parasitism and virulence of *Listeria monocytogenes*." Mol Microbiol **35**(6): 1286-94.
- Galsworthy, S. B. (1990). "Monocytosis producing activity from virulent and avirulent strains of *Listeria*." Acta Microbiol Hung **37**(1): 97-9.
- Gedde, M. M., D. E. Higgins, et al. (2000). "Role of listeriolysin O in cell-to-cell spread of *Listeria monocytogenes*." Infect Immun **68**(2): 999-1003.
- Geginat, G., M. Lalic, et al. (1998). "TH1 cells specific for a secreted protein of *Listeria monocytogenes* are protective *in vivo*." J Immunol **160**(12): 6046-55.
- Geginat, G., T. Nichterlein, et al. (1999). "Enhancement of the *Listeria monocytogenes* p60-specific CD4 and CD8 T cell memory by nonpathogenic *Listeria innocua*." J Immunol **162**(8): 4781-9.
- Geginat, G., S. Schenk, et al. (2001). "A novel approach of direct ex vivo epitope mapping identifies dominant and subdominant CD4 and CD8 T cell epitopes from *Listeria monocytogenes*." J Immunol **166**(3): 1877-84.
- Geisen, R. (1999). "Inhibition of food-related pathogenic bacteria by god-transformed *Penicillium nalgiovense* strains." J Food Prot **62**(8): 940-3.
- Gellin, B. G. and C. V. Broome (1989). "Listeriosis." Jama **261**(9): 1313-20.
- Gellin, B. G., C. V. Broome, et al. (1991). "The epidemiology of listeriosis in the United States--1986. Listeriosis Study Group." Am J Epidemiol **133**(4): 392-401.
- Gentschev, I., G. Dietrich, et al. (2002). "Delivery of protein antigens and DNA by attenuated intracellular bacteria." Int J Med Microbiol **291**(6-7): 577-82.
- Gentschev, I., Z. Sokolovic, et al. (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**(12): 5091-8.
- Geoffroy, C., J. L. Gaillard, et al. (1987). "Purification, characterization, and toxicity of the sulfhydryl- activated hemolysin listeriolysin O from *Listeria monocytogenes*." Infect Immun **55**(7): 1641-6.
- Geoffroy, C., J. Raveneau, et al. (1991). "Purification and characterization of an extracellular 29-kilodalton phospholipase C from *Listeria monocytogenes*." Infect Immun **59**(7): 2382-8.
- Germain, R. N. (1994). "MHC-dependent antigen processing and peptide presentation: providing ligands for T lymphocyte activation." Cell **76**(2): 287-99.
- Gertler, F. B., K. Niebuhr, et al. (1996). "Mena, a relative of VASP and Drosophila Enabled, is implicated in the control of microfilament dynamics." Cell **87**(2): 227-39.
- Geuenich, H. H. and H. E. Muller (1984). "[Isolation and germ count of *Listeria monocytogenes* in raw and biologically treated waste water]." Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg [B] **179**(3): 266-73.
- Gilot, P., Y. Jossin, et al. (2000). "Cloning, sequencing and characterisation of a *Listeria monocytogenes* gene encoding a fibronectin-binding protein." J Med Microbiol **49**(10): 887-96.
- Gnanou Besse, N., F. Dubois Brissonnet, et al. (2000). "Effect of various environmental parameters on the recovery of sublethally salt-damaged and acid-damaged *Listeria monocytogenes*." J Appl Microbiol **89**(6): 944-50.
- Goebel, W. and J. Kreff (1997). "Cytolysins and the intracellular life of bacteria." Trends Microbiol **5**(3): 86-8.
- Goebel, W., M. Leimeister-Wachter, et al. (1993). "*Listeria monocytogenes*--a model system for studying the pathomechanisms of an intracellular microorganism." Zentralbl Bakteriol **278**(2-3): 334-47.
- Gohmann, S., M. Leimeister-Wachter, et al. (1990). "Characterization of a *Listeria monocytogenes*-specific protein capable of inducing delayed hypersensitivity in *Listeria*-immune mice." Mol Microbiol **4**(7): 1091-9.

- Golden, D. A., L. R. Beuchat, et al. (1988). "Evaluation of selective direct plating media for their suitability to recover uninjured, heat-injured, and freeze-injured *Listeria monocytogenes* from foods." Appl Environ Microbiol **54**(6): 1451-6.
- Goldfine, H. and C. Knob (1992). "Purification and characterization of *Listeria monocytogenes* phosphatidylinositol-specific phospholipase C." Infect Immun **60**(10): 4059-67.
- Goldfine, H., C. Knob, et al. (1995). "Membrane permeabilization by *Listeria monocytogenes* phosphatidylinositol-specific phospholipase C is independent of phospholipid hydrolysis and cooperative with listeriolysin O." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(7): 2979-83.
- Goossens, P. L., G. Milon, et al. (1995). "Attenuated *Listeria monocytogenes* as a live vector for induction of CD8+ T cells *in vivo*: a study with the nucleoprotein of the lymphocytic choriomeningitis virus." Int Immunol **7**(5): 797-805.
- Goulet, V., C. Jacquet, et al. (1995). "Listeriosis from consumption of raw-milk cheese." Lancet **345**(8964): 1581-2.
- Gray, D. and P. Matzinger (1991). "T cell memory is short-lived in the absence of antigen." J Exp Med **174**(5): 969-74.
- Gray, M. L. J. S., F. Thorp, Jr., L. B. Sholl and W. F. Riley, Jr. (1948). "A new technique for isolating listerellae from the bovine brain." J. Bacteriol **30**: 471-476.
- Gray, M. L. and A. H. Killinger (1966). "*Listeria monocytogenes* and listeric infections." Bacteriol Rev **30**(2): 309-82.
- Greiffenberg, L., W. Goebel, et al. (1998). "Interaction of *Listeria monocytogenes* with human brain microvascular endothelial cells: InB-dependent invasion, long-term intracellular growth, and spread from macrophages to endothelial cells." Infect Immun **66**(11): 5260-7.
- Guzman, C. A., M. Rohde, et al. (1995). "Interaction of *Listeria monocytogenes* with mouse dendritic cells." Infect Immun **63**(9): 3665-73.
- Harty, J. T. and M. J. Bevan (1992). "CD8+ T cells specific for a single nonamer epitope of *Listeria monocytogenes* are protective *in vivo*." J Exp Med **175**(6): 1531-8.
- Harty, J. T. and M. J. Bevan (1996). "CD8 T-cell recognition of macrophages and hepatocytes results in immunity to *Listeria monocytogenes*." Infect Immun **64**(9): 3632-40.
- Harty, J. T. and E. G. Pamer (1995). "CD8 T lymphocytes specific for the secreted p60 antigen protect against *Listeria monocytogenes* infection." J Immunol **154**(9): 4642-50.
- Harty, J. T., R. D. Schreiber, et al. (1992). "CD8 T cells can protect against an intracellular bacterium in an interferon gamma-independent fashion." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(23): 11612-6.
- Harvey, J. and A. Gilmour (1993). "Occurrence and characteristics of *Listeria* in foods produced in Northern Ireland." Int J Food Microbiol **19**(3): 193-205.
- Harvey, J. and A. Gilmour (1994). "Application of multilocus enzyme electrophoresis and restriction fragment length polymorphism analysis to the typing of *Listeria monocytogenes* strains isolated from raw milk, nondairy foods, and clinical and veterinary sources." Appl Environ Microbiol **60**(5): 1547-53.
- Harvey, J. and A. Gilmour (2001). "Characterization of recurrent and sporadic *Listeria monocytogenes* isolates from raw milk and nondairy foods by pulsed-field gel electrophoresis, monocin typing, plasmid profiling, and cadmium and antibiotic resistance determination." Appl Environ Microbiol **67**(2): 840-7.
- Hassan, L., H. O. Mohammed, et al. (2001). "Farm-management and milking practices associated with the presence of *Listeria monocytogenes* in New York state dairy herds." Prev Vet Med **51**(1-2): 63-73.
- Hauf, N., W. Goebel, et al. (1997). "*Listeria monocytogenes* infection of P388D₁ macrophages results in a biphasic NF-kappaB (RelA/p50) activation induced by lipoteichoic acid and bacterial phospholipases and mediated by IkappaBalpha and IkappaBbeta degradation." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(17): 9394-9.

- Hayes, P. S., J. C. Feeley, et al. (1986). "Isolation of *Listeria monocytogenes* from raw milk." Appl Environ Microbiol **51**(2): 438-40.
- Heiseck, J. E., D. E. Wagner, et al. (1989). "*Listeria* spp. found on fresh market produce." Appl Environ Microbiol **55**(8): 1925-7.
- Henry, B. S. (1933). "Dissociation in the genus *Brucella*." J Infect Dis **52**: 374-402.
- Hess, J., A. Dreher, et al. (1996). "Protein p60 participates in intestinal host invasion by *Listeria monocytogenes*." Zentralbl Bakteriologie **284**(2-3): 263-72.
- Hess, J., I. Gentschev, et al. (1996). "Superior efficacy of secreted over somatic antigen display in recombinant *Salmonella* vaccine induced protection against listeriosis." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(4): 1458-63.
- Hess, J., I. Gentschev, et al. (1995). "*Listeria monocytogenes* p60 supports host cell invasion by and *in vivo* survival of attenuated *Salmonella typhimurium*." Infect Immun **63**(5): 2047-53.
- Hess, J., L. Grode, et al. (2000). "Secretion of different listeriolysin cognates by recombinant attenuated *Salmonella typhimurium*: superior efficacy of haemolytic over non-haemolytic constructs after oral vaccination." Microbes Infect **2**(15): 1799-806.
- Hiemstra, P. S., M. T. van den Barselaar, et al. (1999). "Ubiquicidin, a novel murine microbicidal protein present in the cytosolic fraction of macrophages." J Leukoc Biol **66**(3): 423-8.
- Higgins, D. E., N. Shastri, et al. (1999). "Delivery of protein to the cytosol of macrophages using *Escherichia coli* K-12." Mol Microbiol **31**(6): 1631-41.
- Hiltbold, E. M., S. A. Safley, et al. (1996). "The presentation of class I and class II epitopes of listeriolysin O is regulated by intracellular localization and by intercellular spread of *Listeria monocytogenes*." J Immunol **157**(3): 1163-75.
- Hinomatsu, K., Y. Yoshikai, et al. (1992). "A protective role of gamma/delta T cells in primary infection with *Listeria monocytogenes* in mice." J Exp Med **175**(1): 49-56.
- Hirose, K., H. Suzuki, et al. (1998). "Interleukin-15 may be responsible for early activation of intestinal intraepithelial lymphocytes after oral infection with *Listeria monocytogenes* in rats." Infect Immun **66**(12): 5677-83.
- Hlinak, A., W. Schrodli, et al. (1996). "Production of Egg Yolk Antibodies against Human Cell-Associated Antigens." Altex **13**(5): 76-77.
- Ho, J. L., K. N. Shands, et al. (1986). "An outbreak of type 4b *Listeria monocytogenes* infection involving patients from eight Boston hospitals." Arch Intern Med **146**(3): 520-4.
- Hof, H. (1990). "Treatment of experimental listeriosis by CI 934, a new quinolone." J Antimicrob Chemother **25**(1): 121-6.
- Hof, H., P. Emmerling, et al. (1978). "[Influence of killed *Bordetella pertussis* cells on the resistance against infection with *Listeria monocytogenes* (author's transl)]." Zentralbl Bakteriologie [Orig A] **240**(2): 208-14.
- Hof, H. and P. Hefner (1988). "Pathogenicity of *Listeria monocytogenes* in comparison to other *Listeria* species." Infection **16**(Suppl 2): S141-4.
- Holt, C., D. Hirst, et al. (1995). "Discrimination of species in the genus *Listeria* by Fourier transform infrared spectroscopy and canonical variate analysis." Appl Environ Microbiol **61**(1): 377-8.
- Huang, S. H., M. F. Stins, et al. (2000). "Bacterial penetration across the blood-brain barrier during the development of neonatal meningitis." Microbes Infect **2**(10): 1237-44.
- Huillet, E., S. Larpin, et al. (1999). "Identification of a new locus in *Listeria monocytogenes* involved in cellobiose-dependent repression of *hly* expression." FEMS Microbiol Lett **174**(2): 265-72.

- Hunt, D. F., H. Michel, et al. (1992). "Peptides presented to the immune system by the murine class II major histocompatibility complex molecule I-Ad." *Science* **256**(5065): 1817-20.
- Ikebe, H., H. Yamada, et al. (2001). "Persistent infection with *Listeria monocytogenes* in the kidney induces anti-inflammatory invariant fetal-type gamma delta T cells." *Immunology* **102**(1): 94-102.
- Ireton, K., B. Payrastre, et al. (1999). "The *Listeria monocytogenes* protein InlB is an agonist of mammalian phosphoinositide 3-kinase." *J Biol Chem* **274**(24): 17025-32.
- Ishikawa, S., Y. Hara, et al. (1998). "Regulation of a new cell wall hydrolase gene, cwfF, which affects cell separation in *Bacillus subtilis*." *J Bacteriol* **180**(9): 2549-55.
- Jacquet, C., B. Catimel, et al. (1995). "Investigations related to the epidemic strain involved in the French listeriosis outbreak in 1992." *Appl Environ Microbiol* **61**(6): 2242-6.
- Jenssen, J. C., I. Andersen, et al. (1981). "Eggs: conveniently packaged antibodies. Methods for purification of yolk IgG." *J Immunol Methods* **46**(1): 63-8.
- Johannessen, G. S., S. Loncarevic, et al. (2002). "Bacteriological analysis of fresh produce in Norway." *Int J Food Microbiol* **77**(3): 199-204.
- Johansson, J., P. Mandin, et al. (2002). "An RNA thermosensor controls expression of virulence genes in *Listeria monocytogenes*." *Cell* **110**(5): 551-61.
- Johansson, T. (1998). "Enhanced detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* from foodstuffs and food-processing environments." *Int J Food Microbiol* **40**(1-2): 77-85.
- Jones, D. (1988). "The place of *Listeria* among gram-positive bacteria." *Infection* **16**(Suppl 2): S85-8.
- Kagi, D., B. Ledermann, et al. (1994). "CD8+ T cell-mediated protection against an intracellular bacterium by perforin-dependent cytotoxicity." *Eur J Immunol* **24**(12): 3068-72.
- Kampelmacher, E. H., W. T. Huysinga, et al. (1972). "The presence of *Listeria monocytogenes* in feces of pregnant women and neonates." *Zentralbl Bakteriol [Orig A]* **222**(2): 258-62.
- Kang, D. H. and D. Y. Fung (1999). "Thin agar layer method for recovery of heat-injured *Listeria monocytogenes*." *J Food Prot* **62**(11): 1346-9.
- Kathariou, S., L. Pine, et al. (1990). "Nonhemolytic *Listeria monocytogenes* mutants that are also noninvasive for mammalian cells in culture: evidence for coordinate regulation of virulence." *Infect Immun* **58**(12): 3988-95.
- Kaufmann, S. H. (1993). "Immunity to intracellular bacteria." *Annu Rev Immunol* **11**: 129-63.
- Kaufmann, S. H., E. Hug, et al. (1987). "Specific lysis of *Listeria monocytogenes*-infected macrophages by class II-restricted L3T4+ T cells." *Eur J Immunol* **17**(2): 237-46.
- Kaufmann, S. H., M. M. Simon, et al. (1979). "Specific Lyt 123 cells are involved in protection against *Listeria monocytogenes* and in delayed-type hypersensitivity to listerial antigens." *J Exp Med* **150**(4): 1033-8.
- Kayal, S., A. Lilienbaum, et al. (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**(6): 1709-22.
- Kimura, Y., S. Tomida, et al. (1996). "Evidence for the early recruitment of T-cell receptor gamma delta+ T cells during rat listeriosis." *Immunology* **87**(1): 21-8.
- Kimura, Y., K. Yamada, et al. (1998). "The regulatory role of heat shock protein 70-reactive CD4+ T cells during rat listeriosis." *Int Immunol* **10**(2): 117-30.
- Klarsfeld, A. D., P. L. Goossens, et al. (1994). "Five *Listeria monocytogenes* genes preferentially expressed in infected mammalian cells: *plcA*, *purH*, *purD*, *pyrE* and an arginine ABC transporter gene, *arpJ*." *Mol Microbiol* **13**(4): 585-97.

- Klinger, J. D. (1988). "Isolation of *Listeria*: a review of procedures and future prospects." Infection **16**(Suppl 2): S98-105.
- Kobe, B. and J. Deisenhofer (1994). "The leucine-rich repeat: a versatile binding motif." Trends Biochem Sci **19**(10): 415-21.
- Kocks, C., E. Gouin, et al. (1992). "*L. monocytogenes*-induced actin assembly requires the *actA* gene product, a surface protein." Cell **68**(3): 521-31.
- Kocks, C., R. Hellio, et al. (1993). "Polarized distribution of *Listeria monocytogenes* surface protein ActA at the site of directional actin assembly." J Cell Sci **105**(Pt 3): 699-710.
- Kohler, S., A. Bubert, et al. (1991). "Expression of the *iap* gene coding for protein p60 of *Listeria monocytogenes* is controlled on the posttranscriptional level." J Bacteriol **173**(15): 4668-74.
- Kohler, S., M. Leimeister-Wachter, et al. (1990). "The gene coding for protein p60 of *Listeria monocytogenes* and its use as a specific probe for *Listeria monocytogenes*." Infect Immun **58**(6): 1943-50.
- Kolb, A., S. Busby, et al. (1993). "Transcriptional regulation by cAMP and its receptor protein." Annu Rev Biochem **62**: 749-95.
- Kolb-Maurer, A., S. Pilgrim, et al. (2001). "Antibodies against listerial protein 60 act as an opsonin for phagocytosis of *Listeria monocytogenes* by human dendritic cells." Infect Immun **69**(5): 3100-9.
- Kreff, J., D. Funke, et al. (1989). "Production, purification and characterization of hemolysins from *Listeria ivanovii* and *Listeria monocytogenes* Sv4b." FEMS Microbiol Lett **48**(2): 197-202.
- Kreff, J. and J. A. Vazquez-Boland (2001). "Regulation of virulence genes in *Listeria*." Int J Med Microbiol **291**(2): 145-57.
- Kugler, S., S. Schuller, et al. (1997). "Involvement of MAP-kinases and -phosphatases in uptake and intracellular replication of *Listeria monocytogenes* in J774 macrophage cells." FEMS Microbiol Lett **157**(1): 131-6.
- Kuhn, M. (1998). "The microtubule depolymerizing drugs nocodazole and colchicine inhibit the uptake of *Listeria monocytogenes* by P388D₁ macrophages." FEMS Microbiol Lett **160**(1): 87-90.
- Kuhn, M. and W. Goebel (1989). "Identification of an extracellular protein of *Listeria monocytogenes* possibly involved in intracellular uptake by mammalian cells." Infect Immun **57**(1): 55-61.
- Kuhn, M. and W. Goebel (1994). "Induction of cytokines in phagocytic mammalian cells infected with virulent and avirulent *Listeria* strains." Infect Immun **62**(2): 348-56.
- Kuhn, M. and W. Goebel (1995). "Molecular studies on the virulence of *Listeria monocytogenes*." Genet Eng **17**: 31-51.
- Kuhn, M. and W. Goebel (1998). "Host cell signalling during *Listeria monocytogenes* infection." Trends Microbiol **6**(1): 11-5.
- Kundig, T. M., M. F. Bachmann, et al. (1993). "Nonimmunogenic tumor cells may efficiently restimulate tumor antigen-specific cytotoxic T cells." J Immunol **150**(10): 4450-6.
- Kundig, T. M., M. F. Bachmann, et al. (1996). "On the role of antigen in maintaining cytotoxic T-cell memory." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(18): 9716-23.
- Laciar, A. L., L. Vaca, et al. (1999). "[*Listeria* spp. in food of animal origin]." Rev Argent Microbiol **31**(1): 25-30.
- Ladel, C. H., I. E. Flesch, et al. (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**(7): 3116-22.

- Lalic-Muelthaler, M. (1996). Spezifischer Nachweis von *Listeria monocytogenes* mit Hilfe immunologischer und genetischer Sonden auf der Basis des p60-Proteins und des *iap* - Gens. Lehrstuhl für Mikrobiologie. Würzburg, Julius-Maximilians-Universität Würzburg: 105.
- Lalic-Multhaler, M., J. Bohne, et al. (2001). "In vitro transcription of PrfA-dependent and -independent genes of *Listeria monocytogenes*." Mol Microbiol **42**(1): 111-20.
- Lampidis, R., R. Gross, et al. (1994). "The virulence regulator protein of *Listeria ivanovii* is highly homologous to PrfA from *Listeria monocytogenes* and both belong to the Crp-Fnr family of transcription regulators." Mol Microbiol **13**(1): 141-51.
- Lane, F. C. and E. R. Unanue (1972). "Requirement of thymus (T) lymphocytes for resistance to listeriosis." J Exp Med **135**(5): 1104-12.
- Lau, L. L., B. D. Jamieson, et al. (1994). "Cytotoxic T-cell memory without antigen." Nature **369**(6482): 648-52.
- Lavon, I., I. Goldberg, et al. (2000). "High susceptibility to bacterial infection, but no liver dysfunction, in mice compromised for hepatocyte NF-kappaB activation." Nat Med **6**(5): 573-7.
- Leblond-Francillard, M., J. L. Gaillard, et al. (1989). "Loss of catalase activity in Tn1545-induced mutants does not reduce growth of *Listeria monocytogenes* in vivo." Infect Immun **57**(8): 2569-73.
- Leimeister-Wachter, M., E. Domann, et al. (1992). "The expression of virulence genes in *Listeria monocytogenes* is thermoregulated." J Bacteriol **174**(3): 947-52.
- Leimeister-Wachter, M., C. Haffner, et al. (1990). "Identification of a gene that positively regulates expression of listeriolysin, the major virulence factor of *Listeria monocytogenes*." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(21): 8336-40.
- Lin, L., H. Londe, et al. (1994). "Photochemical inactivation of pathogenic bacteria in human platelet concentrates." Blood **83**(9): 2698-706.
- Lingnau, A., E. Domann, et al. (1995). "Expression of the *Listeria monocytogenes* EGD inlA and inlB genes, whose products mediate bacterial entry into tissue culture cell lines, by PrfA-dependent and -independent mechanisms." Infect Immun **63**(10): 3896-903.
- Linnan, M. J., L. Mascola, et al. (1988). "Epidemic listeriosis associated with Mexican-style cheese." N Engl J Med **319**(13): 823-8.
- Lyytikäinen, O., T. Autio, et al. (2000). "An outbreak of *Listeria monocytogenes* serotype 3a infections from butter in Finland." J Infect Dis **181**(5): 1838-41.
- Maayan, M. C., C. Wajzman, et al. (1981). "Meningitis and bacteraemia due to *Listeria monocytogenes* in compromised hosts." Postgrad Med J **57**(664): 77-9.
- Mackaness, G. B. (1962). "Cellular resistance to infection." J Exp Med **116**: 381-406.
- Mackaness, G. B. (1969). "The influence of immunologically committed lymphoid cells on macrophage activity in vivo." J Exp Med **129**(5): 973-92.
- Mackaness, G. B. (1971). "Resistance to intracellular infection." J Infect Dis **123**(4): 439-45.
- Magee, D. M. and E. J. Wing (1988). "Cloned L3T4+ T lymphocytes protect mice against *Listeria monocytogenes* by secreting IFN-gamma." J Immunol **141**(9): 3203-7.
- Marquis, H., V. Doshi, et al. (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**(11): 4531-4.
- Marquis, H., H. Goldfine, et al. (1997). "Proteolytic pathways of activation and degradation of a bacterial phospholipase C during intracellular infection by *Listeria monocytogenes*." J Cell Biol **137**(6): 1381-92.
- Marquis, H. and E. J. Hager (2000). "pH-regulated activation and release of a bacteria-associated phospholipase C during intracellular infection by *Listeria monocytogenes*." Mol Microbiol **35**(2): 289-98.

- Marron, L., N. Emerson, et al. (1997). "A mutant of *Listeria monocytogenes* LO28 unable to induce an acid tolerance response displays diminished virulence in a murine model." Appl Environ Microbiol **63**(12): 4945-7.
- Mattingly, J. A., B. T. Butman, et al. (1988). "Rapid monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Listeria* in food products." J Assoc Off Anal Chem **71**(3): 679-81.
- Meier, J. and L. Lopez (2001). "Listeriosis: an emerging food-borne disease." Clin Lab Sci **14**(3): 187-92; quiz 194.
- Mengaud, J., C. Braun-Breton, et al. (1991). "Identification of phosphatidylinositol-specific phospholipase C activity in *Listeria monocytogenes*: a novel type of virulence factor?" Mol Microbiol **5**(2): 367-72.
- Mengaud, J., S. Dramsi, et al. (1991). "Pleiotropic control of *Listeria monocytogenes* virulence factors by a gene that is autoregulated." Mol Microbiol **5**(9): 2273-83.
- Mengaud, J., C. Geoffroy, et al. (1991). "Identification of a new operon involved in *Listeria monocytogenes* virulence: its first gene encodes a protein homologous to bacterial metalloproteases." Infect Immun **59**(3): 1043-9.
- Mengaud, J., H. Ohayon, et al. (1996). "E-cadherin is the receptor for internalin, a surface protein required for entry of *L. monocytogenes* into epithelial cells." Cell **84**(6): 923-32.
- Mengaud, J., M. F. Vicente, et al. (1988). "Expression in *Escherichia coli* and sequence analysis of the listeriolysin O determinant of *Listeria monocytogenes*." Infect Immun **56**(4): 766-72.
- Mengaud, J., M. F. Vicente, et al. (1989). "Transcriptional mapping and nucleotide sequence of the *Listeria monocytogenes* *hlyA* region reveal structural features that may be involved in regulation." Infect Immun **57**(12): 3695-701.
- Metzger, R., D. P. Brown, et al. (1994). "Characterization of the macromolecular synthesis (MMS) operon from *Listeria monocytogenes*." Gene **151**(1-2): 161-6.
- Meyer, D. H., K. P. Mintz, et al. (1997). "Models of invasion of enteric and periodontal pathogens into epithelial cells: a comparative analysis." Crit Rev Oral Biol Med **8**(4): 389-409.
- Milenbachs, A. A., D. P. Brown, et al. (1997). "Carbon-source regulation of virulence gene expression in *Listeria monocytogenes*." Mol Microbiol **23**(5): 1075-85.
- Mosmann, T. R. and R. L. Coffman (1989). "TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties." Annu Rev Immunol **7**: 145-73.
- Mourrain, P., I. Lasa, et al. (1997). "ActA is a dimer." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(19): 10034-9.
- Mullbacher, A. (1994). "The long-term maintenance of cytotoxic T cell memory does not require persistence of antigen." J Exp Med **179**(1): 317-21.
- Murali-Krishna, K., J. D. Altman, et al. (1998). "Counting antigen-specific CD8 T cells: a reevaluation of bystander activation during viral infection." Immunity **8**(2): 177-87.
- Murray, E. G. D., R. E. Webb, et al. (1926). "A disease of rabbits characterized by a large mononuclear leucocytosis, caused by a hitherto undescribed bacillus *Bacterium monocytogenes* (n. sp.)." J Pathol Bacteriol **29**: 407-439.
- Nadon, C. A., B. M. Bowen, et al. (2002). "Sigma B contributes to PrfA-mediated virulence in *Listeria monocytogenes*." Infect Immun **70**(7): 3948-52.
- Niebuhr, K., T. Chakraborty, et al. (1993). "Localization of the ActA polypeptide of *Listeria monocytogenes* in infected tissue culture cell lines: ActA is not associated with actin "comets"." Infect Immun **61**(7): 2793-802.

- Nierman, W. C. and M. J. Chamberlin (1979). "Studies of RNA chain initiation by *Escherichia coli* RNA polymerase bound to T7 DNA. Direct analysis of the kinetics and extent of RNA chain initiation at T7 promoter A1." J Biol Chem **254**(16): 7921-6.
- North, R. J., P. A. Berche, et al. (1981). "Immunologic consequences of antibiotic-induced abridgement of bacterial infection: effect on generation and loss of protective T cells and level of immunologic memory." J Immunol **127**(1): 342-6.
- Oehen, S., H. Waldner, et al. (1992). "Antivirally protective cytotoxic T cell memory to lymphocytic choriomeningitis virus is governed by persisting antigen." J Exp Med **176**(5): 1273-81.
- O'Garra, A. (1998). "Cytokines induce the development of functionally heterogeneous T helper cell subsets." Immunity **8**(3): 275-83.
- Ohteki, T., T. Fukao, et al. (1999). "Interleukin 12-dependent interferon gamma production by CD8alpha+ lymphoid dendritic cells." J Exp Med **189**(12): 1981-6.
- Ohya, S., H. Xiong, et al. (1998). "Killing mechanism of *Listeria monocytogenes* in activated macrophages as determined by an improved assay system." J Med Microbiol **47**(3): 211-5.
- Pamer, E. and P. Cresswell (1998). "Mechanisms of MHC class I-restricted antigen processing." Annu Rev Immunol **16**: 323-58.
- Pamer, E. G. (1993). "Cellular immunity to intracellular bacteria." Curr Opin Immunol **5**(4): 492-6.
- Pamer, E. G. (1994). "Direct sequence identification and kinetic analysis of an MHC class I-restricted *Listeria monocytogenes* CTL epitope." J Immunol **152**(2): 686-94.
- Pamer, E. G., J. T. Harty, et al. (1991). "Precise prediction of a dominant class I MHC-restricted epitope of *Listeria monocytogenes*." Nature **353**(6347): 852-5.
- Pandiripally, V. K., D. G. Westbrook, et al. (1999). "Surface protein p104 is involved in adhesion of *Listeria monocytogenes* to human intestinal cell line, Caco-2." J Med Microbiol **48**(2): 117-24.
- Parida, S. K., E. Domann, et al. (1998). "Internalin B is essential for adhesion and mediates the invasion of *Listeria monocytogenes* into human endothelial cells." Mol Microbiol **28**(1): 81-93.
- Park, J. H., Y. S. Lee, et al. (2000). "Specific binding of recombinant *Listeria monocytogenes* p60 protein to Caco-2 cells." FEMS Microbiol Lett **186**(1): 35-40.
- Peel, M., W. Donachie, et al. (1988). "Temperature-dependent expression of flagella of *Listeria monocytogenes* studied by electron microscopy, SDS-PAGE and western blotting." J Gen Microbiol **134**(Pt 8): 2171-8.
- Pfeuffer, T., W. Goebel, et al. (2000). "LaXp180, a mammalian ActA-binding protein, identified with the yeast two-hybrid system, co-localizes with intracellular *Listeria monocytogenes*." Cell Microbiol **2**(2): 101-14.
- Pihlgren, M., P. M. Dubois, et al. (1996). "Resting memory CD8+ T cells are hyperreactive to antigenic challenge *in vitro*." J Exp Med **184**(6): 2141-51.
- Pine, L., G. B. Malcolm, et al. (1989). "Physiological studies on the growth and utilization of sugars by *Listeria* species." Can J Microbiol **35**(2): 245-54.
- Pingulkar, K., A. Kamat, et al. (2001). "Microbiological quality of fresh leafy vegetables, salad components and ready-to-eat salads: an evidence of inhibition of *Listeria monocytogenes* in tomatoes." Int J Food Sci Nutr **52**(1): 15-23.
- Pinto, B. and D. Reali (1996). "Prevalence of *Listeria monocytogenes* and other listerias in Italian-made soft cheeses." Zentralbl Hyg Umweltmed **199**(1): 60-8.
- Pirie, J. H. H. (1940). "*Listeria* : change of name for a genus of bacteria." Nature **145**: 264.
- Portnoy, D. A., T. Chakraborty, et al. (1992). "Molecular determinants of *Listeria monocytogenes* pathogenesis." Infect Immun **60**(4): 1263-7.

- Portnoy, D. A., P. S. Jacks, et al. (1988). "Role of hemolysin for the intracellular growth of *Listeria monocytogenes*." J Exp Med **167**(4): 1459-71.
- Portnoy, D. A. and S. Jones (1994). "The cell biology of *Listeria monocytogenes* infection (escape from a vacuole)." Ann N Y Acad Sci **730**: 15-25.
- Portnoy, D. A., R. D. Schreiber, et al. (1989). "Gamma interferon limits access of *Listeria monocytogenes* to the macrophage cytoplasm." J Exp Med **170**(6): 2141-6.
- Portnoy, D. A., G. A. Smith, et al. (1994). "Phospholipases C and the pathogenesis of *Listeria*." Braz J Med Biol Res **27**(2): 357-61.
- Potel, J. and J. Schulze-Lammers (1985). "*Listeria monocytogenes*-vaccine: production and control." Zentralbl Bakteriolog Mikrobiol Hyg [A] **259**(3): 331-40.
- Pron, B., C. Boumaila, et al. (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**(5): 331-340.
- Pron, B., C. Boumaila, et al. (1998). "Comprehensive study of the intestinal stage of listeriosis in a rat ligated ileal loop system." Infect Immun **66**(2): 747-55.
- Pushkareva, V. I., V. I. Litvin, et al. (1996). "[*Listeria* in plants: an experimental study of its colonization, numbers and variability]." Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol(5): 10-2.
- Qiagen (1992). "The high level expression & protein purification system." The QIAexpressionist.
- Racz, P., K. Tenner, et al. (1972). "Experimental *Listeria* enteritis. I. An electron microscopic study of the epithelial phase in experimental listeria infection." Lab Invest **26**(6): 694-700.
- Raffelsbauer, D., A. Bubert, et al. (1998). "The gene cluster *inlC2DE* of *Listeria monocytogenes* contains additional new internalin genes and is important for virulence in mice." Mol Gen Genet **260**(2-3): 144-58.
- Rakhmievich, A. L. (1994). "Evidence for a significant role of CD4+ T cells in adoptive immunity to *Listeria monocytogenes* in the liver." Immunology **82**(2): 249-54.
- Rasmussen, O. F., P. Skouboe, et al. (1995). "*Listeria monocytogenes* exists in at least three evolutionary lines: evidence from flagellin, invasive associated protein and listeriolysin O genes." Microbiology **141**(Pt 9): 2053-61.
- Rauch, M. (1997). Nachweis von Listerien mit Hilfe von PCR-Verfahren auf der Basis des *iap*-Gens. Lehrstuhl für Mikrobiologie. Würzburg, Julius-Maximilians-Universität Würzburg: 102.
- Raveneau, J., C. Geoffroy, et al. (1992). "Reduced virulence of a *Listeria monocytogenes* phospholipase-deficient mutant obtained by transposon insertion into the zinc metalloprotease gene." Infect Immun **60**(3): 916-21.
- Renzoni, A., A. Klarsfeld, et al. (1997). "Evidence that PrfA, the pleiotropic activator of virulence genes in *Listeria monocytogenes*, can be present but inactive." Infect Immun **65**(4): 1515-8.
- Ripio, M. T., K. Brehm, et al. (1997). "Glucose-1-phosphate utilization by *Listeria monocytogenes* is PrfA dependent and coordinately expressed with virulence factors." J Bacteriol **179**(22): 7174-80.
- Ripio, M. T., G. Dominguez-Bernal, et al. (1997). "A Gly145Ser substitution in the transcriptional activator PrfA causes constitutive overexpression of virulence factors in *Listeria monocytogenes*." J Bacteriol **179**(5): 1533-40.
- Ripio, M. T., G. Dominguez-Bernal, et al. (1996). "Transcriptional activation of virulence genes in wild-type strains of *Listeria monocytogenes* in response to a change in the extracellular medium composition." Res Microbiol **147**(5): 371-84.
- Ripio, M. T., J. A. Vazquez-Boland, et al. (1998). "Evidence for expressional crosstalk between the central virulence regulator PrfA and the stress response mediator ClpC in *Listeria monocytogenes*." FEMS Microbiol Lett **158**(1): 45-50.

- Rock, K. L., C. Gramm, et al. (1994). "Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules." *Cell* **78**(5): 761-71.
- Rocourt, J. (1988). "Taxonomy of the genus *Listeria*." *Infection* **16**(Suppl 2): S89-91.
- Rocourt, J., P. Boerlin, et al. (1992). "Assignment of *Listeria grayi* and *Listeria murrayi* to a single species, *Listeria grayi*, with a revised description of *Listeria grayi*." *Int J Syst Bacteriol* **42**(1): 171-4.
- Rogers, H. W., M. P. Callery, et al. (1996). "*Listeria monocytogenes* induces apoptosis of infected hepatocytes." *J Immunol* **156**(2): 679-84.
- Rolph, M. S. and S. H. Kaufmann (2000). "Partially TAP-independent protection against *Listeria monocytogenes* by H2-M3-restricted CD8+ T cells." *J Immunol* **165**(8): 4575-80.
- Rose, F., S. A. Zeller, et al. (2001). "Human endothelial cell activation and mediator release in response to *Listeria monocytogenes* virulence factors." *Infect Immun* **69**(2): 897-905.
- Roth, J. A. and M. L. Kaeberle (1980). "Chemiluminescence by *Listeria monocytogenes*." *J Bacteriol* **144**(2): 752-7.
- Rothe, J., W. Lesslauer, et al. (1993). "Mice lacking the tumour necrosis factor receptor 1 are resistant to TNF-mediated toxicity but highly susceptible to infection by *Listeria monocytogenes*." *Nature* **364**(6440): 798-802.
- Rowan, N. J. and J. G. Anderson (1998). "Effects of above-optimum growth temperature and cell morphology on thermotolerance of *Listeria monocytogenes* cells suspended in bovine milk." *Appl Environ Microbiol* **64**(6): 2065-71.
- Rowan, N. J., A. A. Candlish, et al. (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**(7): 2643-8.
- Ruhland, G. J., M. Hellwig, et al. (1993). "Cell-surface location of *Listeria*-specific protein p60--detection of *Listeria* cells by indirect immunofluorescence." *J Gen Microbiol* **139**(Pt 3): 609-16.
- Safley, S. A., C. W. Cluff, et al. (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**(10): 3604-16.
- Saito, A., T. Sawada, et al. (1998). "Classification of *Listeria monocytogenes* by PCR-restriction enzyme analysis in the two genes of *hlyA* and *iap*." *New Microbiol* **21**(1): 87-92.
- Salamina, G., E. Dalle Donne, et al. (1996). "A foodborne outbreak of gastroenteritis involving *Listeria monocytogenes*." *Epidemiol Infect* **117**(3): 429-36.
- Sallen, B., A. Rajoharison, et al. (1996). "Comparative analysis of 16S and 23S rRNA sequences of *Listeria* species." *Int J Syst Bacteriol* **46**(3): 669-74.
- Santiago, N. I., A. Zipf, et al. (1999). "Influence of temperature and growth phase on expression of a 104-kilodalton *Listeria* adhesion protein in *Listeria monocytogenes*." *Appl Environ Microbiol* **65**(6): 2765-9.
- Schaferkordt, S. and T. Chakraborty (1997). "Identification, cloning, and characterization of the *lma* operon, whose gene products are unique to *Listeria monocytogenes*." *J Bacteriol* **179**(8): 2707-16.
- Schlech, W. F., 3rd (2000). "Foodborne listeriosis." *Clin Infect Dis* **31**(3): 770-5.
- Schluter, D., E. Domann, et al. (1998). "Phosphatidylcholine-specific phospholipase C from *Listeria monocytogenes* is an important virulence factor in murine cerebral listeriosis." *Infect Immun* **66**(12): 5930-8.
- Schubert, K., A. M. Bichlmaier, et al. (2000). "P45, an extracellular 45 kDa protein of *Listeria monocytogenes* with similarity to protein p60 and exhibiting peptidoglycan lytic activity." *Arch Microbiol* **173**(1): 21-8.
- Schuchat, A., B. Swaminathan, et al. (1991). "Epidemiology of human listeriosis." *Clin Microbiol Rev* **4**(2): 169-83.
- Schuchat, A., B. Swaminathan, et al. (1991). "*Listeria monocytogenes* CAMP reaction." *Clin Microbiol Rev* **4**(3): 396.
- Schuller, S., S. Kugler, et al. (1998). "Suppression of major histocompatibility complex class I and class II gene expression in *Listeria monocytogenes*-infected murine macrophages." *FEMS Immunol Med Microbiol* **20**(4): 289-99.

- Schwan, W. R. and W. Goebel (1994). "Host cell responses to *Listeria monocytogenes* infection include differential transcription of host stress genes involved in signal transduction." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(14): 6428-32.
- Schwarzer, N., R. Nost, et al. (1998). "Two distinct phospholipases C of *Listeria monocytogenes* induce ceramide generation, nuclear factor-kappa B activation, and E-selectin expression in human endothelial cells." J Immunol **161**(6): 3010-8.
- Schwarzkopf, A. (1996). "*Listeria monocytogenes*--aspects of pathogenicity." Pathol Biol (Paris) **44**(9): 769-74.
- Scotter, S. L., S. Langton, et al. (2001). "Validation of ISO method 11290 part 1--detection of *Listeria monocytogenes* in foods." Int J Food Microbiol **64**(3): 295-306.
- Seaman, M. S., C. R. Wang, et al. (2000). "MHC class Ib-restricted CTL provide protection against primary and secondary *Listeria monocytogenes* infection." J Immunol **165**(9): 5192-201.
- Seeliger, H. P. R. and D. Jones (1994). Genus *Listeria*. Bergey's manual of determinative bacteriology. J. G. e. a. Holt. Baltimore, The Williams and Wilkins Co.
- Sette, A., S. Buus, et al. (1989). "Prediction of major histocompatibility complex binding regions of protein antigens by sequence pattern analysis." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(9): 3296-300.
- Sette, A., S. Buus, et al. (1988). "I-Ad-binding peptides derived from unrelated protein antigens share a common structural motif." J Immunol **141**(1): 45-8.
- Sheehan, B., A. Klarsfeld, et al. (1996). "A single substitution in the putative helix-turn-helix motif of the pleiotropic activator PrfA attenuates *Listeria monocytogenes* virulence." Mol Microbiol **20**(4): 785-97.
- Sheehan, B., A. Klarsfeld, et al. (1995). "Differential activation of virulence gene expression by PrfA, the *Listeria monocytogenes* virulence regulator." J Bacteriol **177**(22): 6469-76.
- Shen, H., J. F. Miller, et al. (1998). "Compartmentalization of bacterial antigens: differential effects on priming of CD8 T cells and protective immunity." Cell **92**(4): 535-45.
- Shen, Y., M. Naujokas, et al. (2000). "InIb-dependent internalization of *Listeria* is mediated by the Met receptor tyrosine kinase." Cell **103**(3): 501-10.
- Shetron-Rama, L. M., H. Marquis, et al. (2002). "Intracellular induction of *Listeria monocytogenes actA* expression." Infect Immun **70**(3): 1087-96.
- Shum, D. T. and S. B. Galsworthy (1982). "Stimulation of monocyte production by an endogenous mediator induced by a component from *Listeria monocytogenes*." Immunology **46**(2): 343-51.
- Sijts, A. J., A. Neisig, et al. (1996). "Two *Listeria monocytogenes* CTL epitopes are processed from the same antigen with different efficiencies." J Immunol **156**(2): 683-92.
- Sijts, A. J. and E. G. Pamer (1997). "Enhanced intracellular dissociation of major histocompatibility complex class I-associated peptides: a mechanism for optimizing the spectrum of cell surface-presented cytotoxic T lymphocyte epitopes." J Exp Med **185**(8): 1403-11.
- Sijts, A. J., I. Pilip, et al. (1997). "The *Listeria monocytogenes*-secreted p60 protein is an N-end rule substrate in the cytosol of infected cells. Implications for major histocompatibility complex class I antigen processing of bacterial proteins." J Biol Chem **272**(31): 19261-8.
- Sijts, A. J., M. S. Villanueva, et al. (1996). "CTL epitope generation is tightly linked to cellular proteolysis of a *Listeria monocytogenes* antigen." J Immunol **156**(4): 1497-503.
- Siragusa, G. R. and M. G. Johnson (1990). "Monoclonal antibody specific for *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua*, and *Listeria welshimeri*." Appl Environ Microbiol **56**(6): 1897-904.

- Skoble, J., D. A. Portnoy, et al. (2000). "Three regions within ActA promote Arp2/3 complex-mediated actin nucleation and *Listeria monocytogenes* motility." J Cell Biol **150**(3): 527-38.
- Smith, G. A. and D. A. Portnoy (1997). "How the *Listeria monocytogenes* ActA protein converts actin polymerization into a motile force." Trends Microbiol **5**(7): 272-6.
- Smith, G. A., D. A. Portnoy, et al. (1995). "Asymmetric distribution of the *Listeria monocytogenes* ActA protein is required and sufficient to direct actin-based motility." Mol Microbiol **17**(5): 945-51.
- Sokolovic, Z., A. Fuchs, et al. (1990). "Synthesis of species-specific stress proteins by virulent strains of *Listeria monocytogenes*." Infect Immun **58**(11): 3582-7.
- Sokolovic, Z. and W. Goebel (1989). "Synthesis of listeriolysin in *Listeria monocytogenes* under heat shock conditions." Infect Immun **57**(1): 295-8.
- Sokolovic, Z., J. Riedel, et al. (1993). "Surface-associated, PrfA-regulated proteins of *Listeria monocytogenes* synthesized under stress conditions." Mol Microbiol **8**(2): 219-27.
- Sokolovic, Z., S. Schuller, et al. (1996). "Differences in virulence and in expression of PrfA and PrfA-regulated virulence genes of *Listeria monocytogenes* strains belonging to serogroup 4." Infect Immun **64**(10): 4008-19.
- Somowiyarjo, S., N. Sako, et al. (1990). "Production of avian antibodies to three potyviruses in coturnix quail." J Virol Methods **28**(2): 125-32.
- Soriano, J. M., H. Rico, et al. (2001). "*Listeria* species in raw and ready-to-eat foods from restaurants." J Food Prot **64**(4): 551-3.
- Sprent, J. (1997). "Immunological memory." Curr Opin Immunol **9**(3): 371-9.
- Sriram, V., C. E. Jebaraj, et al. (1999). "Chicken egg yolk anti-asialoGM1 immunoglobulin (IgY): an inexpensive glycohistochemical probe for localization of T-antigen in human colorectal adenocarcinomas." Indian J Exp Biol **37**(7): 639-49.
- Stuart, M. R. and H. J. Welshimer (1974). "Taxonomic reexamination of *Listeria* Pirie and transfer of *Listeria grayi* and *Listeria murrayi* to a new genus *Murraya*." Int J Syst Bacteriol **24**: 177-185.
- Suh, J. H. and S. J. Knabel (2001). "Comparison of different enrichment broths and background flora for detection of heat-injured *Listeria monocytogenes* in whole milk." J Food Prot **64**(1): 30-6.
- Sun, A. N., A. Camilli, et al. (1990). "Isolation of *Listeria monocytogenes* small-plaque mutants defective for intracellular growth and cell-to-cell spread." Infect Immun **58**(11): 3770-8.
- Swaminathan, B., P. S. Hayes, et al. (1988). "Evaluation of enrichment and plating media for isolating *Listeria monocytogenes*." J Assoc Off Anal Chem **71**(3): 664-8.
- Swartz, M. A., D. F. Welch, et al. (1991). "Catalase-negative *Listeria monocytogenes* causing meningitis in an adult. Clinical and laboratory features." Am J Clin Pathol **96**(1): 130-3.
- Sword, C. P. (1966). "Mechanisms of pathogenesis in *Listeria monocytogenes* infection. I. Influence of iron." J Bacteriol **92**(3): 536-42.
- Szalay, G., J. Hess, et al. (1994). "Presentation of *Listeria monocytogenes* antigens by major histocompatibility complex class I molecules to CD8 cytotoxic T lymphocytes independent of listeriolysin secretion and virulence." Eur J Immunol **24**(7): 1471-7.
- Tang, M. Y., Y. M. Cheong, et al. (1994). "Incidence of *Listeria* spp. in vegetables in Kuala Lumpur." Med J Malaysia **49**(3): 217-22.
- Tang, P., C. L. Sutherland, et al. (1998). "*Listeria monocytogenes* invasion of epithelial cells requires the MEK-1/ERK-2 mitogen-activated protein kinase pathway." Infect Immun **66**(3): 1106-12.
- Tatti, K. M. and C. P. Moran, Jr. (1996). "RNA polymerase sigma factors of *Bacillus subtilis*: purification and characterization." Methods Enzymol **273**: 149-62.

- Temple, M. E. and M. C. Nahata (2000). "Treatment of listeriosis." Ann Pharmacother **34**(5): 656-61.
- Tham, W., H. Ericsson, et al. (2000). "Lessons from an outbreak of listeriosis related to vacuum-packed gravad and cold-smoked fish." Int J Food Microbiol **62**(3): 173-5.
- Tilney, L. G. and D. A. Portnoy (1989). "Actin filaments and the growth, movement, and spread of the intracellular bacterial parasite, *Listeria monocytogenes*." J Cell Biol **109**(4 Pt 1): 1597-608.
- Tompkin, R. B. (2002). "Control of *Listeria monocytogenes* in the food-processing environment." J Food Prot **65**(4): 709-25.
- Tough, D. F., P. Borrow, et al. (1996). "Induction of bystander T cell proliferation by viruses and type I interferon *in vivo*." Science **272**(5270): 1947-50.
- Townsend, A. and J. Trowsdale (1993). "The transporters associated with antigen presentation." Semin Cell Biol **4**(1): 53-61.
- Tripp, C. S., S. F. Wolf, et al. (1993). "Interleukin 12 and tumor necrosis factor alpha are costimulators of interferon gamma production by natural killer cells in severe combined immunodeficiency mice with listeriosis, and interleukin 10 is a physiologic antagonist." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(8): 3725-9.
- Tvinnereim, A. R. and J. T. Harty (2000). "CD8(+) T-cell priming against a nonsecreted *Listeria monocytogenes* antigen is independent of the antimicrobial activities of gamma interferon." Infect Immun **68**(4): 2196-204.
- Urdea, M. S., B. D. Warner, et al. (1988). "A comparison of non-radioisotopic hybridization assay methods using fluorescent, chemiluminescent and enzyme labeled synthetic oligodeoxyribonucleotide probes." Nucleic Acids Res **16**(11): 4937-56.
- Uyttendaele, M., I. Van Hoorde, et al. (2000). "The use of immuno-magnetic separation (IMS) as a tool in a sample preparation method for direct detection of *L. monocytogenes* in cheese." Int J Food Microbiol **54**(3): 205-12.
- van Dissel, J. T., J. J. Stikkelbroeck, et al. (1993). "Differences in the rate of intracellular killing of catalase-negative and catalase-positive *Listeria monocytogenes* by normal and interferon- gamma-activated macrophages." Scand J Immunol **37**(4): 443-6.
- Van Langendonck, N., P. Velge, et al. (1998). "Host cell protein tyrosine kinases are activated during the entry of *Listeria monocytogenes*. Possible role of pp60c-src family protein kinases." FEMS Microbiol Lett **162**(1): 169-76.
- van Netten, P., I. Perales, et al. (1989). "Liquid and solid selective differential media for the detection and enumeration of *L. monocytogenes* and other *Listeria* spp." Int J Food Microbiol **8**(4): 299-316.
- Vater, C. A. and R. C. Jackson (1989). "Purification and characterization of a cortical secretory vesicle membrane fraction." Dev Biol **135**(1): 111-23.
- Vazquez-Boland, J. A., L. Dominguez, et al. (1992). "Epidemiologic investigation of a silage-associated epizootic of ovine listeric encephalitis, using a new *Listeria*-selective enumeration medium and phage typing." Am J Vet Res **53**(3): 368-71.
- Vazquez-Boland, J. A., C. Kocks, et al. (1992). "Nucleotide sequence of the lecithinase operon of *Listeria monocytogenes* and possible role of lecithinase in cell-to-cell spread." Infect Immun **60**(1): 219-30.
- Vega, Y., C. Dickneite, et al. (1998). "Functional similarities between the *Listeria monocytogenes* virulence regulator PrfA and cyclic AMP receptor protein: the PrfA* (Gly145Ser) mutation increases binding affinity for target DNA." J Bacteriol **180**(24): 6655-60.
- Velge, P., E. Bottreau, et al. (1997). "Cell proliferation enhances entry of *Listeria monocytogenes* into intestinal epithelial cells by two proliferation-dependent entry pathways." J Med Microbiol **46**(8): 681-92.

- Vijh, S. and E. G. Pamer (1997). "Immunodominant and subdominant CTL responses to *Listeria monocytogenes* infection." J Immunol **158**(7): 3366-71.
- Vijh, S., I. M. Pilip, et al. (1998). "Effect of antigen-processing efficiency on *in vivo* T cell response magnitudes." J Immunol **160**(8): 3971-7.
- Vijh, S., I. M. Pilip, et al. (1999). "Noncompetitive expansion of cytotoxic T lymphocytes specific for different antigens during bacterial infection." Infect Immun **67**(3): 1303-9.
- Vines, A. and B. Swaminathan (1998). "Identification and characterization of nucleotide sequence differences in three virulence-associated genes of *Listeria monocytogenes* strains representing clinically important serotypes." Curr Microbiol **36**(5): 309-18.
- Vlaemynck, G., V. Lafarge, et al. (2000). "Improvement of the detection of *Listeria monocytogenes* by the application of ALOA, a diagnostic, chromogenic isolation medium." J Appl Microbiol **88**(3): 430-41.
- von Koenig, C. H., B. Heymer, et al. (1983). "Course of infection and development of immunity in experimental infection of mice with *Listeria* serotypes." Infect Immun **40**(3): 1170-7.
- Wadsworth, S. J. and H. Goldfine (1999). "*Listeria monocytogenes* phospholipase C-dependent calcium signaling modulates bacterial entry into J774 macrophage-like cells." Infect Immun **67**(4): 1770-8.
- Walker, S. J., P. Archer, et al. (1990). "Growth of *Listeria monocytogenes* at refrigeration temperatures." J Appl Bacteriol **68**(2): 157-62.
- Walton, C. M., C. H. Wu, et al. (1999). "A method for purification of listeriolysin O from a hypersecretor strain of *Listeria monocytogenes*." Protein Expr Purif **15**(2): 243-5.
- Wang, R. F., W. W. Cao, et al. (1991). "Dried gel hybridization in place of southern hybridization for detection of *Listeria monocytogenes* DNA fragments." Lett Appl Microbiol **12**(6): 224-7.
- Watkins, J. and K. P. Sleath (1981). "Isolation and enumeration of *Listeria monocytogenes* from Sewage, Sewage Sludge and River Water." J Appl Bacteriol **50**(1): 1-9.
- Weiglein, I., W. Goebel, et al. (1997). "*Listeria monocytogenes* infection of HeLa cells results in listeriolysin O-mediated transient activation of the Raf-MEK-MAP kinase pathway." FEMS Microbiol Lett **148**(2): 189-95.
- Weis, J. and H. P. Seeliger (1975). "Incidence of *Listeria monocytogenes* in nature." Appl Microbiol **30**(1): 29-32.
- Wemekamp-Kamphuis, H. H., J. A. Wouters, et al. (2002). "Multiple deletions of the osmolyte transporters BetL, Gbu, and OpuC of *Listeria monocytogenes* affect virulence and growth at high osmolarity." Appl Environ Microbiol **68**(10): 4710-6.
- Wiedmann, M., J. L. Bruce, et al. (1996). "Ribotype diversity of *Listeria monocytogenes* strains associated with outbreaks of listeriosis in ruminants." J Clin Microbiol **34**(5): 1086-90.
- Williams, J. R., C. Thayyullathil, et al. (2000). "Sequence variations within PrfA DNA binding sites and effects on *Listeria monocytogenes* virulence gene expression." J Bacteriol **182**(3): 837-41.
- Wilson, I. G. (1995). "Occurrence of *Listeria* species in ready to eat foods." Epidemiol Infect **115**(3): 519-26.
- Wilson, I. G. (1996). "Occurrence of *Listeria* species in prepacked retail sandwiches." Epidemiol Infect **117**(1): 89-93.
- Wing, E. J. and S. H. Gregory (2002). "*Listeria monocytogenes*: clinical and experimental update." J Infect Dis **185** **Suppl 1**: S18-24.
- Wisniewski, J. M. and J. E. Bielecki (1999). "Intracellular growth of *Listeria monocytogenes* insertional mutant deprived of protein p60." Acta Microbiol Pol **48**(4): 317-29.
- Wuenscher, M. D., S. Kohler, et al. (1993). "The *iap* gene of *Listeria monocytogenes* is essential for cell viability, and its gene product, p60, has bacteriolytic activity." J Bacteriol **175**(11): 3491-501.
- Yang, D. and D. Wang (1990). "[Comparative study of two methods for the extraction of yolk IgG]." Hua Xi Yi Ke Da Xue Xue Bao **21**(3): 263-6.

- Yoshikawa, H., I. Kawamura, et al. (1993). "Membrane damage and interleukin-1 production in murine macrophages exposed to listeriolysin O." Infect Immun **61**(4): 1334-9.
- Youdim, S., O. Stuntman, et al. (1973). "Thymus dependency of cells involved in transfer of delayed hypersensitivity to *Listeria monocytogenes* in mice." Cell Immunol **8**(3): 395-402.
- Zhan, Y. and C. Cheers (1998). "Control of IL-12 and IFN-gamma production in response to live or dead bacteria by TNF and other factors." J Immunol **161**(3): 1447-53.
- Zhang, WW. (2003). "The use of gene-specific IgY antibodies for drug target discovery." Drug Discov Today; **8**(8):364-71.
- Zinkernagel, R. M., M. F. Bachmann, et al. (1996). "On immunological memory." Annu Rev Immunol **14**: 333-67.
- Zwickey, H. L. and T. A. Potter (1996). "Peptide epitopes from noncytosolic *Listeria monocytogenes* can be presented by major histocompatibility complex class I molecules." Infect Immun **64**(5): 1870-2.
- Zwickey, H. L. and T. A. Potter (1999). "Antigen secreted from noncytosolic *Listeria monocytogenes* is processed by the classical MHC class I processing pathway." J Immunol **162**(11): 6341-50.

8.

Abkürzungen

=	entspricht, bedeutet, ist gleich	m	mili-
®	Warenzeichen	M	molar
°C	Grad Celsius	max.	maximal
Abb.	Abbildung	MG	Molekulargewicht = Molmasse
AG	Antigen(e)	MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
Amp.	Ampicillin	min	Minute(n)
APS	Ammoniumperoxodisulfat	mind.	mindestens
ATP	Adenosintriphosphat	MOI	Multiplizität der Infektion
<i>B.</i>	<i>Bacillus</i>	mRNA	messenger-Ribonukleinsäure
BHI	Brain Heart Infusion	n	nano-
bp	Basenpaar	NK-Zellen	natürliche Killerzellen
BSA	Rinderserumalbumin	OD	optische Dichte
bzw.	beziehungsweise	PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
ca.	zirka	PBS	Phosphat-gepufferte Saline
CTL	cytotoxische T-Zellen	PEG	Polyethylenglykol
CTP	Cytidintriphosphat	RNA	Ribonukleinsäure
dest.	destilliert	RNAP	RNA-Polymerase
DNA	Desoxyribonukleinsäure	RNase	Ribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat	rpm	Umdrehungen pro Minute
ds	doppelsträngig	rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol	RT	Raumtemperatur
<i>E. coli.</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>S.</i>	<i>Salmonella</i>
<i>E. faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	s.o.	siehe oben
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	s.u.	siehe unten
ER	Endoplasmatisches Retikulum	SDS	Natriumdodecylsulfat
et al.	et alii = und andere	sek	Sekunde(n)
EtBr	Ethidiumbromid	SOD	Superoxiddismutase
etc.	et cetera = und so weiter	sp.	Subspecies
EtOH	Ethanol	ss	einzelsträngig
g	Gramm	T	Threonin
GTP	Guanosintriphosphat	t	Zeit
h	Stunde	Tab.	Tabelle
i. m.	intramuskulär	TCA	Trichloressigsäure
i.p.	intraperitoneal	TEMED	Tetraethylmethyldiamin
i.v.	intravenös	Th-	T-Helfer-(Zellen)
IL	Interleukin	TNF	Tumornekrose Faktor
INF- γ	Interferon gamma	TTP	Thymidintriphosphat
kb	Kilobase	ÜK	Übernachtskultur
kDa	Kilodalton	üN	über Nacht
KE	Klett-Einheiten	verd.	verdünnt
<i>L.</i>	<i>Listeria</i>	vgl.	vergleiche
LD	lethale Dosis	Vol.	Volumen
LI-P60	<i>L. innocua</i> -P60	YT	Yeast Extract
Lit.	Literatur	γ	Gamma
LM-P60	<i>L. monocytogenes</i> -P60	α -	anti-
Lsg.	Lösung	μ	mikro

Der internationalen Konvention zufolge wird die Kursivschreibweise für Gene und Großbuchstaben für deren PRODUKTE, verwendet.

9.

Anhang Epitop-Spot-Mapping

9.1. Aminosäuresequenz der generierten Peptidlibrary des listeriellen p60-Proteins

Aus dem File: C:\ANWENDER\MIO\18X27.SEQ für je zwei Filter mit LM-P60 und LI-P60:

1	R A A A A A A A A A	885.2	51	T A T A G I A V T A F	1022.4
2	R R R R R R R R R R	1736.2	52	T T A G I A V T A F A	1022.4
3	R N N N N N N N N N	1316.2	53	T A G I A V T A F A A	992.4
4	R D D D D D D D D D	1325.2	54	T G I A V T A F A A P	1018.5
5	R C C C C C C C C C	1206.2	55	T I A V T A F A A P T	1062.5
6	R Q Q Q Q Q Q Q Q Q	1456.2	56	T A V T A F A A P T I	1062.5
7	R E E E E E E E E E	1465.2	57	T V T A F A A P T I A	1062.5
8	R G G G G G G G G G	745.2	58	T T A F A A P T I A S	1051.2
9	R H H H H H H H H H	1546.2	59	T A F A A P T I A S A	1021.2
10	R I I I I I I I I I	1306.2	60	T F A A P T I A S A S	1038.0
11	R L L L L L L L L L	1306.2	61	T A A P T I A S A S T	991.9
12	R K K K K K K K K K	1456.2	62	T A P T I A S A S T V	1020.0
13	R M M M M M M M M M	1487.2	63	T P T I A S A S T V V	1048.1
14	R F F F F F F F F F	1646.2	64	T T I A S A S T V V V	1050.1
15	R P P P P P P P P P	1146.2	65	T I A S A S T V V V E	1078.1
16	R S S S S S S S S S	1053.2	66	T A S A S T V V V E A	1036.0
17	R T T T T T T T T T	1185.2	67	R	174.2
18	R W W W W W W W W W	2037.2	68	R	174.2
19	R Y Y Y Y Y Y Y Y Y	1806.2	69	T S A S T V V V E A G	1022.0
20	R V V V V V V V V V	1166.2	70	T A S T V V V E A G D	1049.2
21	R A A A A A A A A A	885.2	71	T S T V V V E A G D T	1079.2
22	R R R R R R R R R R	1736.2	72	T T V V V E A G D T L	1104.5
23	R N N N N N N N N N	1316.2	73	T V V V E A G D T L W	1189.7
24	R D D D D D D D D D	1325.2	74	T V V E A G D T L W G	1147.6
25	R C C C C C C C C C	1206.2	75	T V E A G D T L W G I	1161.6
26	R Q Q Q Q Q Q Q Q Q	1456.2	76	T E A G D T L W G I A	1133.5
27	R E E E E E E E E E	1465.2	77	T A G D T L W G I A Q	1132.6
28	R G G G G G G G G G	745.2	78	T G D T L W G I A Q S	1149.4
29	R H H H H H H H H H	1546.2	79	T D T L W G I A Q S K	1220.5
30	R I I I I I I I I I	1306.2	80	T T L W G I A Q S K G	1162.5
31	R L L L L L L L L L	1306.2	81	T L W G I A Q S K G T	1162.5
32	R K K K K K K K K K	1456.2	82	T W G I A Q S K G T T	1150.4
33	R M M M M M M M M M	1487.2	83	T G I A Q S K G T T V	1063.3
34	R F F F F F F F F F	1646.2	84	T I A Q S K G T T V D	1121.3
35	R P P P P P P P P P	1146.2	85	T A Q S K G T T V D A	1079.2
36	R S S S S S S S S S	1053.2	86	T Q S K G T T V D A I	1121.3
37	R T T T T T T T T T	1185.2	87	T S K G T T V D A I K	1121.3
38	R W W W W W W W W W	2037.2	88	T K G T T V D A I K K	1161.6
39	R Y Y Y Y Y Y Y Y Y	1806.2	89	T G T T V D A I K K A	1104.5
40	R V V V V V V V V V	1166.2	90	T T T V D A I K K A N	1161.6
41	R	174.2	91	T T V D A I K K A N N	1174.7
42	T M N M K K A T I A A	1179.9	92	T V D A I K K A N N L	1186.8
43	T N M K K A T I A A T	1149.7	93	R	174.2
44	T M K K A T I A A T A	1106.6	94	R	174.2
45	T K K A T I A A T A G	1032.4	95	T D A I K K A N N L T	1188.7
46	T K A T I A A T A G I	1017.4	96	T A I K K A N N L T T	1174.7
47	T A T I A A T A G I A	960.3	97	T I K K A N N L T T D	1218.7
48	T T I A A T A G I A V	988.4	98	T K K A N N L T T D K	1233.7
49	T I A A T A G I A V T	988.4	99	T K A N N L T T D K I	1218.7
50	T A A T A G I A V T A	946.3	100	T A N N L T T D K I V	1189.7

101	T N N L T T D K I V P	1215.8	167	T W H K I T Y N D G K	1362.9
102	T N L T T D K I V P G	1158.7	168	T H K I T Y N D G K T	1277.7
103	T L T T D K I V P G Q	1172.7	169	T K I T Y N D G K T G	1197.6
104	T T T D K I V P G Q K	1187.7	170	T I T Y N D G K T G F	1216.6
105	T T D K I V P G Q K L	1199.8	171	T T Y N D G K T G F V	1202.6
106	T D K I V P G Q K L Q	1226.9	172	T Y N D G K T G F V N	1215.7
107	T K I V P G Q K L Q V	1211.0	173	T N D G K T G F V N G	1109.6
108	T I V P G Q K L Q V N	1197.0	174	T D G K T G F V N G K	1123.6
109	T V P G Q K L Q V N N	1198.0	175	T G K T G F V N G K Y	1171.7
110	T P G Q K L Q V N N E	1227.9	176	T K T G F V N G K Y L	1227.8
111	T G Q K L Q V N N E V	1229.9	177	T T G F V N G K Y L T	1200.7
112	T Q K L Q V N N E V A	1243.9	178	T G F V N G K Y L T D	1214.7
113	T K L Q V N N E V A A	1186.8	179	T F V N G K Y L T D K	1285.8
114	T L Q V N N E V A A A	1129.7	180	T V N G K Y L T D K A	1209.7
115	T Q V N N E V A A A E	1145.6	181	T N G K Y L T D K A V	1209.7
116	T V N N E V A A A E K	1145.6	182	T G K Y L T D K A V S	1183.4
117	T N N E V A A A E K T	1147.5	183	T K Y L T D K A V S T	1227.4
118	T N E V A A A E K T E	1162.4	184	T Y L T D K A V S T P	1196.4
119	T E V A A A E K T E K	1176.4	185	T L T D K A V S T P V	1132.4
120	T V A A A E K T E K S	1135.2	186	T T D K A V S T P V A	1090.3
121	T A A A E K T E K S V	1135.2	187	T D K A V S T P V A P	1086.4
122	T A A E K T E K S V S	1152.0	188	T K A V S T P V A P T	1072.4
123	T A E K T E K S V S A	1152.0	189	T A V S T P V A P T Q	1072.4
124	T E K T E K S V S A T	1182.0	190	T V S T P V A P T Q E	1130.4
125	T K T E K S V S A T W	1239.2	191	T S T P V A P T Q E V	1130.4
126	T T E K S V S A T W L	1224.2	192	T T P V A P T Q E V K	1170.7
127	T E K S V S A T W L N	1237.3	193	T P V A P T Q E V K K	1197.8
128	T K S V S A T W L N V	1207.4	194	T V A P T Q E V K K E	1229.7
129	T S V S A T W L N V R	1235.4	195	T A P T Q E V K K E T	1231.6
130	T V S A T W L N V R S	1235.4	196	T P T Q E V K K E T T	1261.6
131	T S A T W L N V R S G	1193.3	197	T T Q E V K K E T T T	1265.5
132	T A T W L N V R S G A	1176.5	198	T Q E V K K E T T T Q	1292.6
133	T T W L N V R S G A G	1162.5	199	T E V K K E T T T Q Q	1292.6
134	T W L N V R S G A G V	1160.6	200	T V K K E T T T Q Q A	1234.6
135	T L N V R S G A G V D	1089.4	201	T K K E T T T Q Q A A	1206.5
136	T N V R S G A G V D N	1090.4	202	T K E T T T Q Q A A P	1175.5
137	T V R S G A G V D N S	1064.1	203	T E T T T Q Q A A P A	1118.4
138	T R S G A G V D N S I	1078.1	204	T T T T Q Q A A P A A	1060.4
139	T S G A G V D N S I I	1035.1	205	T T T Q Q A A P A A E	1088.4
140	T G A G V D N S I I T	1048.3	206	T T Q Q A A P A A E T	1088.4
141	T A G V D N S I I T S	1079.1	207	T Q Q A A P A A E T K	1115.5
142	T G V D N S I I T S I	1121.2	208	T Q A A P A A E T K T	1088.4
143	T V D N S I I T S I K	1192.3	209	T A A P A A E T K T E	1089.3
144	T D N S I I T S I K G	1150.2	210	T A P A A E T K T E V	1117.4
145	T N S I I T S I K G G	1092.2	211	T P A A E T K T E V K	1174.5
146	T S I I T S I K G G T	1079.1	212	T A A E T K T E V K Q	1205.5
147	T I I T S I K G G T K	1119.4	213	T A E T K T E V K Q T	1235.5
148	T I T S I K G G T K V	1105.4	214	T E T K T E V K Q T T	1265.5
149	T T S I K G G T K V T	1093.3	215	T T K T E V K Q T T Q	1264.6
150	T S I K G G T K V T V	1091.4	216	T K T E V K Q T T Q A	1234.6
151	T I K G G T K V T V E	1132.6	217	T T E V K Q T T Q A T	1207.5
152	T K G G T K V T V E T	1120.5	218	T E V K Q T T Q A T T	1207.5
153	T G G T K V T V E T T	1093.4	219	T V K Q T T Q A T T P	1175.6
154	T G T K V T V E T T E	1165.4	220	T K Q T T Q A T T P A	1147.5
155	T T K V T V E T T E S	1196.2	221	T Q T T Q A T T P A P	1116.5
156	T K V T V E T T E S N	1209.3	222	T T T Q A T T P A P K	1116.5
157	T V T V E T T E S N G	1138.2	223	T T Q A T T P A P K V	1114.6
158	T T V E T T E S N G W	1225.3	224	T Q A T T P A P K V A	1084.6
159	T V E T T E S N G W H	1261.4	225	T A T T P A P K V A E	1085.5
160	T E T T E S N G W H K	1290.4	226	T T T P A P K V A E T	1115.5
161	T T T E S N G W H K I	1274.5	227	t T P A P K V A E T K	1142.6
162	T T E S N G W H K I T	1274.5	228	t P A P K V A E T K E	1170.6
163	T E S N G W H K I T Y	1336.6	229	t A P K V A E T K E T	1174.5
164	T S N G W H K I T Y N	1321.7	230	t P K V A E T K E T P	1200.6
165	T N G W H K I T Y N D	1348.9	231	t K V A E T K E T P V	1202.6
166	T G W H K I T Y N D G	1291.8	232	t V A E T K E T P V V	1173.6

233	t A E T K E T P V V D	1189.5	299	t K A E V K T E A P A	1144.5
234	t E T K E T P V V D Q	1246.6	300	t A E V K T E A P A A	1087.4
235	t T K E T P V V D Q N	1231.7	301	t E V K T E A P A A E	1145.4
236	t K E T P V V D Q N A	1201.7	302	t V K T E A P A A E K	1144.5
237	t E T P V V D Q N A T	1174.6	303	t K T E A P A A E K Q	1173.5
238	t T P V V D Q N A T T	1146.6	304	t T E A P A A E K Q A	1116.4
239	t P V V D Q N A T T H	1182.7	305	t E A P A A E K Q A A	1086.4
240	t V V D Q N A T T H A	1156.6	306	t A P A A E K Q A A P	1054.5
241	t V D Q N A T T H A V	1156.6	307	t P A A E K Q A A P V	1082.6
242	t D Q N A T T H A V K	1185.6	308	t A A E K Q A A P V V	1084.6
243	t Q N A T T H A V K S	1158.4	309	t A E K Q A A P V V K	1141.7
244	t N A T T H A V K S G	1087.3	310	t E K Q A A P V V K E	1199.7
245	t A T T H A V K S G D	1088.2	311	t K Q A A P V V K E N	1184.8
246	t T T H A V K S G D T	1118.2	312	t Q A A P V V K E N T	1157.7
247	t T H A V K S G D T I	1130.3	313	t A A P V V K E N T N	1143.7
248	t H A V K S G D T I W	1215.5	314	t A P V V K E N T N T	1173.7
249	t A V K S G D T I W A	1149.4	315	t P V V K E N T N T N	1216.8
250	t V K S G D T I W A L	1191.5	316	t V V K E N T N T N T	1220.7
251	t K S G D T I W A L S	1180.2	317	t V K E N T N T N T A	1192.6
252	t S G D T I W A L S V	1151.2	318	t K E N T N T N T A T	1194.5
253	t G D T I W A L S V K	1191.5	319	t E N T N T N T A T T	1167.4
254	t D T I W A L S V K Y	1297.6	320	t N T N T N T A T T E	1167.4
255	t T I W A L S V K Y G	1239.6	321	t T N T N T A T T E K	1181.4
256	t I W A L S V K Y G V	1237.7	322	t N T N T A T T E K K	1208.5
257	t W A L S V K Y G V S	1212.4	323	t T N T A T T E K K E	1223.4
258	t A L S V K Y G V S V	1125.3	324	t N T A T T E K K E T	1223.4
259	t L S V K Y G V S V Q	1182.4	325	t T A T T E K K E T A	1180.3
260	t S V K Y G V S V Q D	1184.3	326	t A T T E K K E T A T	1180.3
261	t V K Y G V S V Q D I	1209.6	327	t T T E K K E T A T Q	1237.4
262	t K Y G V S V Q D I M	1241.7	328	t T E K K E T A T Q Q	1264.5
263	t Y G V S V Q D I M S	1201.4	329	t E K K E T A T Q Q Q	1291.6
264	t G V S V Q D I M S W	1224.5	330	t K K E T A T Q Q Q T	1263.6
265	t V S V Q D I M S W N	1281.6	331	t K E T A T Q Q Q T A	1206.5
266	t S V Q D I M S W N N	1296.6	332	t E T A T Q Q Q T A P	1175.5
267	t V Q D I M S W N N L	1321.9	333	t T A T Q Q Q T A P K	1174.6
268	t Q D I M S W N N L S	1310.6	334	t A T Q Q Q T A P K A	1144.6
269	t D I M S W N N L S S	1270.3	335	t T Q Q Q T A P K A P	1170.7
270	t I M S W N N L S S S	1243.1	336	t Q Q Q T A P K A P T	1170.7
271	t M S W N N L S S S S	1217.8	337	t Q Q T A P K A P T E	1171.6
272	t S W N N L S S S S I	1199.7	338	t Q T A P K A P T E A	1114.5
273	t W N N L S S S S I Y	1275.0	339	t T A P K A P T E A A	1057.4
274	t N N L S S S S I Y V	1187.9	340	t A P K A P T E A A K	1084.5
275	t N L S S S S I Y V G	1130.8	341	t P K A P T E A A K P	1110.6
276	t L S S S S I Y V G Q	1144.8	342	t K A P T E A A K P A	1084.5
277	t S S S S I Y V G Q K	1159.8	343	t A P T E A A K P A P	1053.5
278	t S S S I Y V G Q K L	1185.1	344	t P T E A A K P A P A	1053.5
279	t S S I Y V G Q K L A	1168.3	345	t T E A A K P A P A P	1053.5
280	t S I Y V G Q K L A I	1193.6	346	t E A A K P A P A P S	1040.3
281	t I Y V G Q K L A I K	1233.9	347	t A A K P A P A P S T	1012.3
282	t Y V G Q K L A I K Q	1248.9	348	t A K P A P A P S T N	1055.4
283	t V G Q K L A I K Q T	1186.8	349	t K P A P A P S T N T	1085.4
284	t G Q K L A I K Q T A	1158.7	350	t P A P A P S T N T N	1071.4
285	t Q K L A I K Q T A N	1215.8	351	t A P A P S T N T N A	1045.3
286	t K L A I K Q T A N T	1188.7	352	t P A P S T N T N A N	1088.4
287	t L A I K Q T A N T A	1131.6	353	t A P S T N T N A N K	1119.4
288	t A I K Q T A N T A T	1119.5	354	t P S T N T N A N K T	1149.4
289	t I K Q T A N T A T P	1145.6	355	t S T N T N A N K T N	1166.4
290	t K Q T A N T A T P K	1160.6	356	t T N T N A N K T N T	1179.6
291	t Q T A N T A T P K A	1103.5	357	t N T N A N K T N T N	1192.7
292	t T A N T A T P K A E	1104.4	358	t T N A N K T N T N T	1179.6
293	t A N T A T P K A E V	1102.5	359	t N A N K T N T N T N	1192.7
294	t N T A T P K A E V K	1159.6	360	t A N K T N T N T N T	1179.6
295	t T A T P K A E V K T	1146.5	361	t N K T N T N T N T N	1222.7
296	t A T P K A E V K T E	1174.5	362	t K T N T N T N T N T	1209.6
297	t T P K A E V K T E A	1174.5	363	t T N T N T N T N T N	1195.6
298	t P K A E V K T E A P	1170.6	364	t N T N T N T N T N T	1195.6

365	t	T	N	T	N	T	N	T	N	T	N	1195.6	431	t	W	G	G	N	G	P	T	T	F	D	1152.6
366	t	N	T	N	T	N	T	N	T	N	N	1208.7	432	t	G	G	N	G	P	T	T	F	D	C	1069.5
367	t	T	N	T	N	T	N	T	N	N	T	1195.6	433	t	G	N	G	P	T	T	F	D	C	S	1100.3
368	t	N	T	N	T	N	T	N	N	T	N	1208.7	434	t	N	G	P	T	T	F	D	C	S	G	1100.3
369	t	T	N	T	N	T	N	N	T	N	T	1195.6	435	t	G	P	T	T	F	D	C	S	G	Y	1149.3
370	t	N	T	N	T	N	N	T	N	T	N	1208.7	436	t	P	T	T	F	D	C	S	G	Y	T	1193.3
371	t	T	N	T	N	N	T	N	T	N	T	1195.6	437	t	T	T	F	D	C	S	G	Y	T	K	1224.3
372	t	N	T	N	N	T	N	T	N	T	P	1191.7	438	t	T	F	D	C	S	G	Y	T	K	Y	1286.4
373	t	T	N	N	T	N	T	N	T	P	S	1165.4	439	t	F	D	C	S	G	Y	T	K	Y	V	1284.5
374	t	N	N	T	N	T	N	T	P	S	K	1192.5	440	t	D	C	S	G	Y	T	K	Y	V	F	1284.5
375	t	N	T	N	T	N	T	P	S	K	N	1192.5	441	t	C	S	G	Y	T	K	Y	V	F	A	1240.5
376	t	T	N	T	N	T	P	S	K	N	T	1179.4	442	t	S	G	Y	T	K	Y	V	F	A	K	1265.5
377	t	N	T	N	T	P	S	K	N	T	N	1192.5	443	t	G	Y	T	K	Y	V	F	A	K	A	1248.7
378	t	T	N	T	P	S	K	N	T	N	T	1179.4	444	t	Y	T	K	Y	V	F	A	K	A	G	1248.7
379	t	N	T	P	S	K	N	T	N	T	N	1192.5	445	t	T	K	Y	V	F	A	K	A	G	I	1198.7
380	t	T	P	S	K	N	T	N	T	N	S	1166.2	446	t	K	Y	V	F	A	K	A	G	I	S	1185.5
381	t	P	S	K	N	T	N	T	N	S	N	1179.3	447	t	Y	V	F	A	K	A	G	I	S	L	1170.5
382	t	S	K	N	T	N	T	N	S	N	T	1183.2	448	t	V	F	A	K	A	G	I	S	L	P	1104.5
383	t	K	N	T	N	T	N	S	N	T	N	1209.5	449	t	F	A	K	A	G	I	S	L	P	R	1161.5
384	t	N	T	N	T	N	S	N	T	N	T	1182.4	450	t	A	K	A	G	I	S	L	P	R	T	1115.4
385	t	T	N	T	N	S	N	T	N	T	N	1182.4	451	t	K	A	G	I	S	L	P	R	T	S	1132.2
386	t	N	T	N	S	N	T	N	T	N	T	1182.4	452	t	A	G	I	S	L	P	R	T	S	G	1061.1
387	t	T	N	S	N	T	N	T	N	T	N	1182.4	453	t	G	I	S	L	P	R	T	S	G	A	1061.1
388	t	N	S	N	T	N	T	N	T	N	S	1169.2	454	t	I	S	L	P	R	T	S	G	A	Q	1132.2
389	t	S	N	T	N	T	N	T	N	S	N	1169.2	455	t	S	L	P	R	T	S	G	A	Q	Y	1182.2
390	t	N	T	N	T	N	T	N	S	N	T	1182.4	456	t	L	P	R	T	S	G	A	Q	Y	A	1165.4
391	t	T	N	T	N	T	N	S	N	T	N	1182.4	457	t	P	R	T	S	G	A	Q	Y	A	S	1140.1
392	t	N	T	N	T	N	S	N	T	N	A	1152.4	458	t	R	T	S	G	A	Q	Y	A	S	T	1144.0
393	t	T	N	T	N	S	N	T	N	A	N	1152.4	459	t	T	S	G	A	Q	Y	A	S	T	T	1088.9
394	t	N	T	N	S	N	T	N	A	N	Q	1179.5	460	t	S	G	A	Q	Y	A	S	T	T	R	1144.0
395	t	T	N	S	N	T	N	A	N	Q	G	1122.4	461	t	G	A	Q	Y	A	S	T	T	R	I	1169.3
396	t	N	S	N	T	N	A	N	Q	G	S	1109.2	462	t	A	Q	Y	A	S	T	T	R	I	S	1200.1
397	t	S	N	T	N	A	N	Q	G	S	S	1082.9	463	t	Q	Y	A	S	T	T	R	I	S	E	1258.1
398	t	N	T	N	A	N	Q	G	S	S	N	1109.2	464	t	Y	A	S	T	T	R	I	S	E	S	1217.8
399	t	T	N	A	N	Q	G	S	S	N	N	1109.2	465	t	A	S	T	T	R	I	S	E	S	Q	1182.8
400	t	N	A	N	Q	G	S	S	N	N	N	1122.3	466	t	S	T	T	R	I	S	E	S	Q	A	1182.8
401	t	A	N	Q	G	S	S	N	N	N	S	1096.0	467	t	T	T	R	I	S	E	S	Q	A	K	1223.1
402	t	N	Q	G	S	S	N	N	N	S	N	1139.1	468	t	T	R	I	S	E	S	Q	A	K	P	1219.2
403	t	Q	G	S	S	N	N	N	S	N	S	1112.8	469	t	R	I	S	E	S	Q	A	K	P	G	1175.2
404	t	G	S	S	N	N	N	S	N	S	S	1072.5	470	t	I	S	E	S	Q	A	K	P	G	D	1134.1
405	t	S	S	N	N	N	S	N	S	S	A	1086.5	471	t	S	E	S	Q	A	K	P	G	D	L	1134.1
406	t	S	N	N	N	S	N	S	S	A	S	1086.5	472	t	E	S	Q	A	K	P	G	D	L	V	1145.4
407	t	N	N	N	S	N	S	S	A	S	A	1069.7	473	R										174.2	
408	t	N	N	S	N	S	S	A	S	A	I	1068.7	474	t	S	Q	A	K	P	G	D	L	V	F	1163.5
409	t	N	S	N	S	S	A	S	A	I	I	1067.7	475	t	Q	A	K	P	G	D	L	V	F	F	1222.8
410	t	S	N	S	S	A	S	A	I	I	A	1024.6	476	t	A	K	P	G	D	L	V	F	F	D	1209.7
411	t	N	S	S	A	S	A	I	I	A	E	1065.8	477	t	K	P	G	D	L	V	F	F	D	Y	1301.8
412	t	S	A	S	A	I	I	A	E	A		1022.7	478	t	P	G	D	L	V	F	F	D	Y	G	1230.7
413	t	S	A	S	A	I	I	A	E	A	Q	1063.0	479	t	G	D	L	V	F	F	D	Y	G	S	1221.4
414	t	A	S	A	I	I	A	E	A	Q	K	1103.3	480	t	D	L	V	F	F	D	Y	G	S	G	1221.4
415	t	S	A	I	I	A	E	A	Q	K	H	1169.4	481	t	L	V	F	F	D	Y	G	S	G	I	1219.5
416	t	A	I	I	A	E	A	Q	K	H	L	1194.7	482	t	V	F	F	D	Y	G	S	G	I	S	1194.2
417	t	I	I	A	E	A	Q	K	H	L	G	1180.7	483	t	F	F	D	Y	G	S	G	I	S	H	1232.2
418	t	I	A	E	A	Q	K	H	L	G	K	1195.7	484	t	F	D	Y	G	S	G	I	S	H	V	1184.2
419	t	A	E	A	Q	K	H	L	G	K	A	1153.6	485	t	D	Y	G	S	G	I	S	H	V	G	1094.1
420	t	E	A	Q	K	H	L	G	K	A	Y	1245.7	486	t	Y	G	S	G	I	S	H	V	G	I	1092.2
421	t	A	Q	K	H	L	G	K	A	Y	S	1204.5	487	t	G	S	G	I	S	H	V	G	I	Y	1092.2
422	t	Q	K	H	L	G	K	A	Y	S	W	1319.7	488	t	S	G	I	S	H	V	G	I	Y	V	1134.3
423	t	K	H	L	G	K	A	Y	S	W	G	1248.6	489	t	G	I	S	H	V	G	I	Y	V	G	1103.5
424	t	H	L	G	K	A	Y	S	W	G	G	1177.5	490	t	I	S	H	V	G	I	Y	V	G	N	1160.6
425	t	L	G	K	A	Y	S	W	G	G	N	1154.5	491	t	S	H	V	G	I	Y	V	G	N	G	1104.5
426	t	G	K	A	Y	S	W	G	G	N	G	1098.4	492	t	H	V	G	I	Y	V	G	N	G	Q	1144.8
427	t	K	A	Y	S	W	G	G	N	G	P	1138.5	493	t	V	G	I	Y	V	G	N	G	Q	M	1138.9
428	t	A	Y	S	W	G	G	N	G	P	T	1111.4	494	t	G	I	Y	V	G	N	G	Q	M	I	1152.9
429	t	Y	S	W	G	G	N	G	P	T	T	1141.4	495	t	I	Y	V	G	N	G	Q	M	I	N	1210.0
430	t	S	W	G	G	N	G	P	T	T	F	1125.4	496	t	Y	V	G	N	G	Q	M	I	N	A	1167.9

497 t V G N G Q M I N A Q 1132.9
 498 t G N G Q M I N A Q D 1148.8
 499 R 174.2
 500 R 174.2
 501 R 174.2
 502 t N G Q M I N A Q D N 1205.9
 503 t G Q M I N A Q D N G 1148.8
 504 t Q M I N A Q D N G V 1190.9
 505 t M I N A Q D N G V K 1190.9
 506 t I N A Q D N G V K Y 1222.8
 507 t N A Q D N G V K Y D 1224.7
 508 t A Q D N G V K Y D N 1224.7
 509 t Q D N G V K Y D N I 1266.8
 510 t D N G V K Y D N I H 1275.8
 511 t N G V K Y D N I H G 1217.8
 512 t G V K Y D N I H G S 1191.5
 513 t V K Y D N I H G S G 1191.5
 514 t K Y D N I H G S G W 1278.6
 515 t Y D N I H G S G W G 1207.5
 516 t D N I H G S G W G K 1172.5
 517 t N I H G S G W G K Y 1220.6
 518 t I H G S G W G K Y L 1219.6
 519 t H G S G W G K Y L V 1205.6
 520 t G S G W G K Y L V G 1125.5
 521 t S G W G K Y L V G F 1215.6
 522 t G W G K Y L V G F G 1184.8
 523 t W G K Y L V G F G R 1283.9
 524 t G K Y L V G F G R V 1196.8
 525 R 174.2
 526 R 174.2
 527 R 174.2
 528 M M N M K K A T I A A 1210.1
 529 M N M K K A T I A A T 1179.9
 530 M M K K A T I A A T A 1136.8
 531 M K K A T I A A T A G 1062.6
 532 M K A T I A A T A G I 1047.6
 533 M A T I A A T A G I A 990.5
 534 M T I A A T A G I A V 1018.6
 535 M I A A T A G I A V T 1018.6
 536 M A A T A G I A V T A 976.5
 537 M A T A G I A V T A F 1052.6
 538 M T A G I A V T A F A 1052.6
 539 M A G I A V T A F A A 1022.6
 540 M G I A V T A F A A P 1048.7
 541 M I A V T A F A A P T 1092.7
 542 M A V T A F A A P T I 1092.7
 543 M V T A F A A P T I A 1092.7
 544 M T A F A A P T I A S 1081.4
 545 M A F A A P T I A S A 1051.4
 546 M F A A P T I A S A S 1068.2
 547 M A A P T I A S A S T 1022.1
 548 M A P T I A S A S T V 1050.2
 549 M P T I A S A S T V V 1078.3
 550 M T I A S A S T V V V 1080.3
 551 M I A S A S T V V V E 1108.3
 552 M A S A S T V V V E A 1066.2
 553 R 174.2
 554 R 174.2
 555 M S A S T V V V E A G 1052.2
 556 M A S T V V V E A G D 1079.4
 557 M S T V V V E A G D T 1109.4
 558 M T V V V E A G D T L 1134.7
 559 M V V V E A G D T L W 1219.9
 560 M V V E A G D T L W G 1177.8
 561 M V E A G D T L W G I 1191.8
 562 M E A G D T L W G I A 1163.7

563 M A G D T L W G I A Q 1162.8
 564 M G D T L W G I A Q S 1179.6
 565 M D T L W G I A Q S K 1250.7
 566 M T L W G I A Q S K G 1192.7
 567 M L W G I A Q S K G T 1192.7
 568 M W G I A Q S K G T T 1180.6
 569 M G I A Q S K G T T V 1093.5
 570 M I A Q S K G T T V D 1151.5
 571 M A Q S K G T T V D A 1109.4
 572 M Q S K G T T V D A I 1151.5
 573 M S K G T T V D A I K 1151.5
 574 M K G T T V D A I K K 1191.8
 575 M G T T V D A I K K A 1134.7
 576 M T T V D A I K K A N 1191.8
 577 M T V D A I K K A N N 1204.9
 578 R 174.2
 579 R 174.2
 580 M V D A I K K A N N L 1217.0
 581 M D A I K K A N N L T 1218.9
 582 M A I K K A N N L T T 1204.9
 583 M I K K A N N L T T D 1248.9
 584 M K K A N N L T T D K 1263.9
 585 M K A N N L T T D K I 1248.9
 586 M A N N L T T D K I V 1219.9
 587 M N N L T T D K I V P 1246.0
 588 M N L T T D K I V P G 1188.9
 589 M L T T D K I V P G Q 1202.9
 590 M T T D K I V P G Q K 1217.9
 591 M T D K I V P G Q K L 1230.0
 592 M D K I V P G Q K L Q 1257.1
 593 M K I V P G Q K L Q V 1241.2
 594 M I V P G Q K L Q V N 1227.2
 595 M V P G Q K L Q V N N 1228.2
 596 M P G Q K L Q V N N E 1258.1
 597 M G Q K L Q V N N E V 1260.1
 598 M Q K L Q V N N E V A 1274.1
 599 M K L Q V N N E V A A 1217.0
 600 M L Q V N N E V A A A 1159.9
 601 M Q V N N E V A A A E 1175.8
 602 M V N N E V A A A E K 1175.8
 603 M N N E V A A A E K T 1177.7
 604 M N E V A A A E K T E 1192.6
 605 M E V A A A E K T E K 1206.6
 606 M V A A A E K T E K S 1165.4
 607 M A A A E K T E K S V 1165.4
 608 M A A E K T E K S V S 1182.2
 609 M A E K T E K S V S A 1182.2
 610 M E K T E K S V S A T 1212.2
 611 M K T E K S V S A T W 1269.4
 612 M T E K S V S A T W L 1254.4
 613 M E K S V S A T W L N 1267.5
 614 M K S V S A T W L N V 1237.6
 615 M S V S A T W L N V R 1265.6
 616 M V S A T W L N V R S 1265.6
 617 M S A T W L N V R S G 1223.5
 618 M A T W L N V R S G A 1206.7
 619 M T W L N V R S G A G 1192.7
 620 M W L N V R S G A G V 1190.8
 621 M L N V R S G A G V D 1119.6
 622 M N V R S G A G V D N 1120.6
 623 M V R S G A G V D N S 1094.3
 624 M R S G A G V D N S I 1108.3
 625 M S G A G V D N S I I 1065.3
 626 M G A G V D N S I I T 1078.5
 627 M A G V D N S I I T S 1109.3
 628 M G V D N S I I T S I 1151.4

629	M V D N S I I T S I K	1222.5	695	M A A P A A E T K T E	1119.5
630	M D N S I I T S I K G	1180.4	696	M A P A A E T K T E V	1147.6
631	M N S I I T S I K G G	1122.4	697	M P A A E T K T E V K	1204.7
632	M S I I T S I K G G T	1109.3	698	M A A E T K T E V K Q	1235.7
633	M I I T S I K G G T K	1149.6	699	M A E T K T E V K Q T	1265.7
634	M I T S I K G G T K V	1135.6	700	M E T K T E V K Q T T	1295.7
635	M T S I K G G T K V T	1123.5	701	M T K T E V K Q T T Q	1294.8
636	M S I K G G T K V T V	1121.6	702	M K T E V K Q T T Q A	1264.8
637	M I K G G T K V T V E	1162.8	703	M T E V K Q T T Q A T	1237.7
638	M K G G T K V T V E T	1150.7	704	M E V K Q T T Q A T T	1237.7
639	M G G T K V T V E T T	1123.6	705	M V K Q T T Q A T T P	1205.8
640	M G T K V T V E T T E	1195.6	706	M K Q T T Q A T T P A	1177.7
641	M T K V T V E T T E S	1226.4	707	M Q T T Q A T T P A P	1146.7
642	M K V T V E T T E S N	1239.5	708	M T T Q A T T P A P K	1146.7
643	M V T V E T T E S N G	1168.4	709	M T Q A T T P A P K V	1144.8
644	M T V E T T E S N G W	1255.5	710	M Q A T T P A P K V A	1114.8
645	M V E T T E S N G W H	1291.6	711	M A T T P A P K V A E	1115.7
646	M E T T E S N G W H K	1320.6	712	M T T P A P K V A E T	1145.7
647	M T T E S N G W H K I	1304.7	713	M T P A P K V A E T K	1172.8
648	M T E S N G W H K I T	1304.7	714	M P A P K V A E T K E	1200.8
649	M E S N G W H K I T Y	1366.8	715	M A P K V A E T K E T	1204.7
650	M S N G W H K I T Y N	1351.9	716	M P K V A E T K E T P	1230.8
651	M N G W H K I T Y N D	1379.1	717	M K V A E T K E T P V	1232.8
652	M G W H K I T Y N D G	1322.0	718	M V A E T K E T P V V	1203.8
653	M W H K I T Y N D G K	1393.1	719	M A E T K E T P V V D	1219.7
654	M H K I T Y N D G K T	1307.9	720	M E T K E T P V V D Q	1276.8
655	M K I T Y N D G K T G	1227.8	721	M T K E T P V V D Q N	1261.9
656	M I T Y N D G K T G F	1246.8	722	M K E T P V V D Q N A	1231.9
657	M T Y N D G K T G F V	1232.8	723	M E T P V V D Q N A T	1204.8
658	M Y N D G K T G F V N	1245.9	724	M T P V V D Q N A T T	1176.8
659	M N D G K T G F V N G	1139.8	725	M P V V D Q N A T T H	1212.9
660	M D G K T G F V N G K	1153.8	726	M V V D Q N A T T H A	1186.8
661	M G K T G F V N G K Y	1201.9	727	M V D Q N A T T H A V	1186.8
662	M K T G F V N G K Y L	1258.0	728	M D Q N A T T H A V K	1215.8
663	M T G F V N G K Y L T	1230.9	729	M Q N A T T H A V K S	1188.6
664	M G F V N G K Y L T D	1244.9	730	M N A T T H A V K S G	1117.5
665	M F V N G K Y L T D K	1316.0	731	M A T T H A V K S G D	1118.4
666	M V N G K Y L T D K A	1239.9	732	M T T H A V K S G D T	1148.4
667	M N G K Y L T D K A V	1239.9	733	M T H A V K S G D T I	1160.5
668	M G K Y L T D K A V S	1213.6	734	M H A V K S G D T I W	1245.7
669	M K Y L T D K A V S T	1257.6	735	M A V K S G D T I W A	1179.6
670	M Y L T D K A V S T P	1226.6	736	M V K S G D T I W A L	1221.7
671	M L T D K A V S T P V	1162.6	737	M K S G D T I W A L S	1210.4
672	M T D K A V S T P V A	1120.5	738	M S G D T I W A L S V	1181.4
673	M D K A V S T P V A P	1116.6	739	M G D T I W A L S V K	1221.7
674	M K A V S T P V A P T	1102.6	740	M D T I W A L S V K Y	1327.8
675	M A V S T P V A P T Q	1102.6	741	M T I W A L S V K Y G	1269.8
676	M V S T P V A P T Q E	1160.6	742	M I W A L S V K Y G V	1267.9
677	M S T P V A P T Q E V	1160.6	743	M W A L S V K Y G V S	1242.6
678	M T P V A P T Q E V K	1200.9	744	M A L S V K Y G V S V	1155.5
679	M P V A P T Q E V K K	1228.0	745	M L S V K Y G V S V Q	1212.6
680	M V A P T Q E V K K E	1259.9	746	M S V K Y G V S V Q D	1214.5
681	M A P T Q E V K K E T	1261.8	747	M V K Y G V S V Q D I	1239.8
682	M P T Q E V K K E T T	1291.8	748	M K Y G V S V Q D I M	1271.9
683	M T Q E V K K E T T T	1295.7	749	M Y G V S V Q D I M S	1231.6
684	M Q E V K K E T T T Q	1322.8	750	M G V S V Q D I M S W	1254.7
685	M E V K K E T T T Q Q	1322.8	751	M V S V Q D I M S W N	1311.8
686	M V K K E T T T Q Q A	1264.8	752	M S V Q D I M S W N N	1326.8
687	M K K E T T T Q Q A A	1236.7	753	M V Q D I M S W N N L	1352.1
688	M K E T T T Q Q A A P	1205.7	754	M Q D I M S W N N L S	1340.8
689	M E T T T Q Q A A P A	1148.6	755	M D I M S W N N L S S	1300.5
690	M T T T Q Q A A P A A	1090.6	756	M I M S W N N L S S S	1273.3
691	M T T Q Q A A P A A E	1118.6	757	M M S W N N L S S S S	1248.0
692	M T Q Q A A P A A E T	1118.6	758	M S W N N L S S S S I	1229.9
693	M Q Q A A P A A E T K	1145.7	759	M W N N L S S S S I Y	1305.2
694	M Q A A P A A E T K T	1118.6	760	M N N L S S S S I Y V	1218.1

761 M N L S S S S I Y V G 1161.0
762 M L S S S S I Y V G Q 1175.0
763 M S S S S I Y V G Q K 1190.0
764 M S S S I Y V G Q K L 1215.3
765 M S S I Y V G Q K L A 1198.5
766 M S I Y V G Q K L A I 1223.8
767 M I Y V G Q K L A I K 1264.1
768 M Y V G Q K L A I K Q 1279.1
769 M V G Q K L A I K Q T 1217.0
770 M G Q K L A I K Q T A 1188.9
771 M Q K L A I K Q T A N 1246.0
772 M K L A I K Q T A N T 1218.9
773 M L A I K Q T A N T A 1161.8
774 M A I K Q T A N T A T 1149.7
775 M I K Q T A N T A T P 1175.8
776 M K Q T A N T A T P K 1190.8
777 M Q T A N T A T P K A 1133.7
778 M T A N T A T P K A E 1134.6
779 M A N T A T P K A E V 1132.7
780 M N T A T P K A E V K 1189.8
781 M T A T P K A E V K T 1176.7
782 m A T P K A E V K T E 1204.7
783 m T P K A E V K T E A 1204.7
784 m P K A E V K T E A P 1200.8
785 m K A E V K T E A P A 1174.7
786 m A E V K T E A P A A 1117.6
787 m E V K T E A P A A E 1175.6
788 m V K T E A P A A E K 1174.7
789 m K T E A P A A E K Q 1203.7
790 m T E A P A A E K Q A 1146.6
791 m E A P A A E K Q A A 1116.6
792 m A P A A E K Q A A P 1084.7
793 m P A A E K Q A A P V 1112.8
794 m A A E K Q A A P V V 1114.8
795 m A E K Q A A P V V K 1171.9
796 m E K Q A A P V V K E 1229.9
797 m K Q A A P V V K E N 1215.0
798 m Q A A P V V K E N T 1187.9
799 m A A P V V K E N T N 1173.9
800 m A P V V K E N T N T 1203.9
801 m P V V K E N T N T N 1247.0
802 m V V K E N T N T N T 1250.9
803 m V K E N T N T N T A 1222.8
804 m K E N T N T N T A T 1224.7
805 m E N T N T N T A T T 1197.6
806 m N T N T N T A T T E 1197.6
807 m T N T N T A T T E K 1211.6
808 m N T N T A T T E K K 1238.7
809 m T N T A T T E K K E 1253.6
810 m N T A T T E K K E T 1253.6
811 m T A T T E K K E T A 1210.5
812 m A T T E K K E T A T 1210.5
813 m T T E K K E T A T Q 1267.6
814 m T E K K E T A T Q Q 1294.7
815 m E K K E T A T Q Q Q 1321.8
816 m K K E T A T Q Q Q T 1293.8
817 m K E T A T Q Q Q T A 1236.7
818 m E T A T Q Q Q T A P 1205.7
819 m T A T Q Q Q T A P K 1204.8
820 m A T Q Q Q T A P K A 1174.8
821 m T Q Q Q T A P K A P 1200.9
822 m Q Q Q T A P K A P T 1200.9
823 m Q Q T A P K A P T E 1201.8
824 m Q T A P K A P T E A 1144.7
825 m T A P K A P T E A A 1087.6
826 m A P K A P T E A A K 1114.7

827 m P K A P T E A A K P 1140.8
828 m K A P T E A A K P A 1114.7
829 m A P T E A A K P A P 1083.7
830 m P T E A A K P A P A 1083.7
831 m T E A A K P A P A P 1083.7
832 m E A A K P A P A P S 1070.5
833 m A A K P A P A P S T 1042.5
834 m A K P A P A P S T N 1085.6
835 m K P A P A P S T N T 1115.6
836 m P A P A P S T N T N 1101.6
837 m A P A P S T N T N A 1075.5
838 m P A P S T N T N A N 1118.6
839 m A P S T N T N A N K 1149.6
840 m P S T N T N A N K T 1179.6
841 m S T N T N A N K T N 1196.6
842 m T N T N A N K T N T 1209.8
843 m N T N A N K T N T N 1222.9
844 m T N A N K T N T N T 1209.8
845 m N A N K T N T N T N 1222.9
846 m A N K T N T N T N T 1209.8
847 m N K T N T N T N T N 1252.9
848 m K T N T N T N T N T 1239.8
849 m T N T N T N T N T N 1225.8
850 m N T N T N T N T N T 1225.8
851 m T N T N T N T N T N 1225.8
852 m N T N T N T N T N N 1238.9
853 m T N T N T N T N N T 1225.8
854 m N T N T N T N N T N 1238.9
855 m T N T N T N N T N T 1225.8
856 m N T N T N N T N T N 1238.9
857 m T N T N N T N T N T 1225.8
858 m N T N N T N T N T P 1221.9
859 m T N N T N T N T P S 1195.6
860 m N N T N T N T P S K 1222.7
861 m N T N T N T P S K N 1222.7
862 m T N T N T P S K N T 1209.6
863 m N T N T P S K N T N 1222.7
864 m T N T P S K N T N T 1209.6
865 m N T P S K N T N T N 1222.7
866 m T P S K N T N T N S 1196.4
867 m P S K N T N T N S N 1209.5
868 m S K N T N T N S N T 1213.4
869 m K N T N T N S N T N 1239.7
870 m N T N T N S N T N T 1212.6
871 m T N T N S N T N T N 1212.6
872 m N T N S N T N T N T 1212.6
873 m T N S N T N T N T N 1212.6
874 m N S N T N T N T N S 1199.4
875 m S N T N T N T N S N 1199.4
876 m N T N T N T N S N T 1212.6
877 m T N T N T N S N T N 1212.6
878 m N T N T N S N T N A 1182.6
879 m T N T N S N T N A N 1182.6
880 m N T N S N T N A N Q 1209.7
881 m T N S N T N A N Q G 1152.6
882 m N S N T N A N Q G S 1139.4
883 m S N T N A N Q G S S 1113.1
884 m N T N A N Q G S S N 1139.4
885 m T N A N Q G S S N N 1139.4
886 m N A N Q G S S N N N 1152.5
887 m A N Q G S S N N N S 1126.2
888 m N Q G S S N N N S N 1169.3
889 m Q G S S N N N S N S 1143.0
890 m G S S N N N S N S S 1102.7
891 m S S N N N S N S S A 1116.7
892 m S N N N S N S S A S 1116.7

893	m	N	N	N	S	N	S	S	A	S	A			1099.9
894	m	N	N	S	N	S	S	A	S	A	I			1098.9
895	m	N	S	N	S	S	A	S	A	I	I			1097.9
896	m	S	N	S	S	A	S	A	I	I	A			1054.8
897	m	N	S	S	A	S	A	I	I	A	E			1096.0
898	m	S	S	A	S	A	I	I	A	E	A			1052.9
899	m	S	A	S	A	I	I	A	E	A	Q			1093.2
900	m	A	S	A	I	I	A	E	A	Q	K			1133.5
901	m	S	A	I	I	A	E	A	Q	K	H			1199.6
902	m	A	I	I	A	E	A	Q	K	H	L			1224.9
903	m	I	I	A	E	A	Q	K	H	L	G			1210.9
904	m	I	A	E	A	Q	K	H	L	G	K			1225.9
905	m	A	E	A	Q	K	H	L	G	K	A			1183.8
906	m	E	A	Q	K	H	L	G	K	A	Y			1275.9
907	m	A	Q	K	H	L	G	K	A	Y	S			1234.7
908	m	Q	K	H	L	G	K	A	Y	S	W			1349.9
909	m	K	H	L	G	K	A	Y	S	W	G			1278.8
910	m	H	L	G	K	A	Y	S	W	G	G			1207.7
911	m	L	G	K	A	Y	S	W	G	G	N			1184.7
912	m	G	K	A	Y	S	W	G	G	N	G			1128.6
913	m	K	A	Y	S	W	G	G	N	G	P			1168.7
914	m	A	Y	S	W	G	G	N	G	P	T			1141.6
915	m	Y	S	W	G	G	N	G	P	T	T			1171.6
916	m	S	W	G	G	N	G	P	T	T	F			1155.6
917	m	W	G	G	N	G	P	T	T	F	D			1182.8
918	m	G	G	N	G	P	T	T	F	D	C			1099.7
919	m	G	N	G	P	T	T	F	D	C	S			1130.5
920	m	N	G	P	T	T	F	D	C	S	G			1130.5
921	m	G	P	T	T	F	D	C	S	G	Y			1179.5
922	m	P	T	T	F	D	C	S	G	Y	T			1223.5
923	m	T	T	F	D	C	S	G	Y	T	K			1254.5
924	m	T	F	D	C	S	G	Y	T	K	Y			1316.6
925	m	F	D	C	S	G	Y	T	K	Y	V			1314.7
926	m	D	C	S	G	Y	T	K	Y	V	F			1314.7
927	m	C	S	G	Y	T	K	Y	V	F	A			1270.7
928	m	S	G	Y	T	K	Y	V	F	A	K			1295.7
929	m	G	Y	T	K	Y	V	F	A	K	A			1278.9
930	m	Y	T	K	Y	V	F	A	K	A	G			1278.9
931	m	T	K	Y	V	F	A	K	A	G	I			1228.9
932	m	K	Y	V	F	A	K	A	G	I	S			1215.7
933	m	Y	V	F	A	K	A	G	I	S	L			1200.7
934	m	V	F	A	K	A	G	I	S	L	P			1134.7
935	m	F	A	K	A	G	I	S	L	P	R			1191.7
936	m	A	K	A	G	I	S	L	P	R	T			1145.6
937	m	K	A	G	I	S	L	P	R	T	S			1162.4
938	m	A	G	I	S	L	P	R	T	S	G			1091.3
939	m	G	I	S	L	P	R	T	S	G	A			1091.3
940	m	I	S	L	P	R	T	S	G	A	Q			1162.4
941	m	S	L	P	R	T	S	G	A	Q	Y			1212.4
942	m	L	P	R	T	S	G	A	Q	Y	A			1195.6
943	m	P	R	T	S	G	A	Q	Y	A	S			1170.3
944	m	R	T	S	G	A	Q	Y	A	S	T			1174.2
945	m	T	S	G	A	Q	Y	A	S	T	T			1119.1
946	m	S	G	A	Q	Y	A	S	T	T	R			1174.2
947	m	G	A	Q	Y	A	S	T	T	R	I			1199.5
948	m	A	Q	Y	A	S	T	T	R	I	S			1230.3
949	m	Q	Y	A	S	T	T	R	I	S	E			1288.3
950	m	Y	A	S	T	T	R	I	S	E	S			1248.0
951	m	A	S	T	T	R	I	S	E	S	Q			1213.0
952	m	S	T	T	R	I	S	E	S	Q	A			1213.0
953	m	T	T	R	I	S	E	S	Q	A	K			1253.3
954	m	T	R	I	S	E	S	Q	A	K	P			1249.4
955	m	R	I	S	E	S	Q	A	K	P	G			1205.4
956	m	I	S	E	S	Q	A	K	P	G	D			1164.3
957	m	S	E	S	Q	A	K	P	G	D	L			1164.3
958	m	E	S	Q	A	K	P	G	D	L	V			1175.6
959	R													174.2
960	m	S	Q	A	K	P	G	D	L	V	F			1193.7
961	m	Q	A	K	P	G	D	L	V	F	F			1253.0
962	m	A	K	P	G	D	L	V	F	F	D			1239.9
963	m	K	P	G	D	L	V	F	F	D	Y			1332.0
964	m	P	G	D	L	V	F	F	D	Y	G			1260.9
965	m	G	D	L	V	F	F	D	Y	G	S			1251.6
966	m	D	L	V	F	F	D	Y	G	S	G			1251.6
967	m	L	V	F	F	D	Y	G	S	G	I			1249.7
968	m	V	F	F	D	Y	G	S	G	I	S			1224.4
969	m	F	F	D	Y	G	S	G	I	S	H			1262.4
970	m	F	D	Y	G	S	G	I	S	H	V			1214.4
971	m	D	Y	G	S	G	I	S	H	V	G			1124.3
972	m	Y	G	S	G	I	S	H	V	G	I			1122.4
973	m	G	S	G	I	S	H	V	G	I	Y			1122.4
974	m	S	G	I	S	H	V	G	I	Y	V			1164.5
975	m	G	I	S	H	V	G	I	Y	V	G			1133.7
976	m	I	S	H	V	G	I	Y	V	G	N			1190.8
977	m	S	H	V	G	I	Y	V	G	N	G			1134.7
978	m	H	V	G	I	Y	V	G	N	G	Q			1175.0
979	m	V	G	I	Y	V	G	N	G	Q	M			1169.1
980	m	G	I	Y	V	G	N	G	Q	M	I			1183.1
981	m	I	Y	V	G	N	G	Q	M	I	N			1240.2
982	m	Y	V	G	N	G	Q	M	I	N	A			1198.1
983	m	V	G	N	G	Q	M	I	N	A	Q			1163.1
984	m	G	N	G	Q	M	I	N	A	Q	D			1179.0
985	R													174.2
986	R													174.2
987	R													174.2
988	m	N	G	Q	M	I	N	A	Q	D	N			1236.1
989	m	G	Q	M	I	N	A	Q	D	N	G			1179.0
990	m	Q	M	I	N	A	Q	D	N	G	V			1221.1
991	m	M	I	N	A	Q	D	N	G	V	K			1221.1
992	m	I	N	A	Q	D	N	G	V	K	Y			1253.0
993	m	N	A	Q	D	N	G	V	K	Y	D			1254.9
994	m	A	Q	D	N	G	V	K	Y	D	N			1254.9
995	m	Q	D	N	G	V	K	Y	D	N	I			1297.0
996	m	D	N	G	V	K	Y	D	N	I	H			1306.0
997	m	N	G	V	K	Y	D	N	I	H	G			1248.0
998	m	G	V	K	Y	D	N	I	H	G	S			1221.7
999	m	V	K	Y	D	N	I	H	G	S	G			1221.7
1000	m	K	Y	D	N	I	H	G	S	G	W			1308.8
1001	m	Y	D	N	I	H	G	S	G	W	G			1237.7
1002	m	D	N	I	H	G	S	G	W	G	K			1202.7
1003	m	N	I	H	G	S	G	W	G	K	Y			1250.8
1004	m	I	H	G	S	G	W	G	K	Y	L			1249.8
1005	m	H	G	S	G	W	G	K	Y	L	V			1235.8
1006	m	G	S	G	W	G	K	Y	L	V	G			1155.7
1007	m	S	G	W	G	K	Y	L	V	G	F			1245.8
1008	m	G	W	G	K	Y	L	V	G	F	G			1215.0
1009	m	W	G	K	Y	L	V	G	F	G	R			1314.1
1010	m	G	K	Y	L	V	G	F	G	R	V			1227.0
1011	R													174.2
1012	R													174.2
1013	R													174.2
1014	C	M	N	M	K	K	A	T	I	A	A			1182.0
1015	C	N	M	K	K	A	T	I	A	A	T			1151.8
1016	C	M	K	K	A	T	I	A	A	T	A			1108.7
1017	C	K	K	A	T	I	A	A	T	A	G			1034.5
1018	C	K	A	T	I	A	A	T	A	G	I			1019.5
1019	C	A	T	I	A	A	T	A	G	I	A			962.4
1020	C	T	I	A	A	T	A	G	I	A	V			990.5
1021	C	I	A	A	T	A	G	I	A	V	T			990.5
1022	C	A	A	T	A	G	I	A	V	T	A			948.4
1023	C	A	T	A	G	I	A	V	T	A	F			1024.5
1024	C	T	A	G	I	A	V	T	A	F	A			1024.5

1025	C A G I A V T A F A A	994.5	1091	C E V A T E E K A E K	1236.5
1026	C G I A V T A F A A P	1020.6	1092	C V A T E E K A E K S	1195.3
1027	C I A V T A F A A P T	1064.6	1093	C A T E E K A E K S V	1195.3
1028	C A V T A F A A P T I	1064.6	1094	C T E E K A E K S V S	1212.1
1029	C V T A F A A P T I A	1064.6	1095	C E E K A E K S V S A	1182.1
1030	C T A F A A P T I A S	1053.3	1096	C E K A E K S V S A T	1154.1
1031	C A F A A P T I A S A	1023.3	1097	C K A E K S V S A T W	1211.3
1032	C F A A P T I A S A S	1040.1	1098	C A E K S V S A T W L	1196.3
1033	C A A P T I A S A S T	994.0	1099	C E K S V S A T W L N	1239.4
1034	C A P T I A S A S T V	1022.1	1100	C K S V S A T W L N V	1209.5
1035	C P T I A S A S T V V	1050.2	1101	C S V S A T W L N V R	1237.5
1036	C T I A S A S T V V V	1052.2	1102	C V S A T W L N V R S	1237.5
1037	C I A S A S T V V V E	1080.2	1103	C S A T W L N V R S G	1195.4
1038	R	174.2	1104	C A T W L N V R S G A	1178.6
1039	R	174.2	1105	C T W L N V R S G A G	1164.6
1040	R	174.2	1106	C W L N V R S G A G V	1162.7
1041	C A S A S T V V V E A	1038.1	1107	C L N V R S G A G V D	1091.5
1042	C S A S T V V V E A G	1024.1	1108	C N V R S G A G V D H	1115.5
1043	C A S T V V V E A G D	1051.3	1109	C V R S G A G V D H S	1089.2
1044	C S T V V V E A G D T	1081.3	1110	C R S G A G V D H S I	1103.2
1045	C T V V V E A G D T L	1106.6	1111	C S G A G V D H S I L	1060.2
1046	C V V V E A G D T L W	1191.8	1112	C G A G V D H S I L T	1073.4
1047	C V V E A G D T L W G	1149.7	1113	C A G V D H S I L T S	1104.2
1048	C V E A G D T L W G I	1163.7	1114	C G V D H S I L T S I	1146.3
1049	C E A G D T L W G I A	1135.6	1115	C V D H S I L T S I K	1217.4
1050	C A G D T L W G I A Q	1134.7	1116	C D H S I L T S I K G	1175.3
1051	C G D T L W G I A Q S	1151.5	1117	C H S I L T S I K G G	1117.3
1052	C D T L W G I A Q S K	1222.6	1118	C S I L T S I K G G T	1081.2
1053	C T L W G I A Q S K G	1164.6	1119	C I L T S I K G G T K	1121.5
1054	C L W G I A Q S K G T	1164.6	1120	C L T S I K G G T K V	1107.5
1055	C W G I A Q S K G T T	1152.5	1121	C T S I K G G T K V T	1095.4
1056	C G I A Q S K G T T V	1065.4	1122	C S I K G G T K V T V	1093.5
1057	C I A Q S K G T T V D	1123.4	1123	C I K G G T K V T V E	1134.7
1058	C A Q S K G T T V D A	1081.3	1124	C K G G T K V T V E T	1122.6
1059	C Q S K G T T V D A I	1123.4	1125	C G G T K V T V E T T	1095.5
1060	C S K G T T V D A I K	1123.4	1126	C G T K V T V E T T E	1167.5
1061	C K G T T V D A I K K	1163.7	1127	C T K V T V E T T E S	1198.3
1062	C G T T V D A I K K A	1106.6	1128	C K V T V E T T E S N	1211.4
1063	C T T V D A I K K A N	1163.7	1129	C V T V E T T E S N G	1140.3
1064	C T V D A I K K A N N	1176.8	1130	C T V E T T E S N G W	1227.4
1065	R	174.2	1131	C V E T T E S N G W H	1263.5
1066	R	174.2	1132	C E T T E S N G W H K	1292.5
1067	C V D A I K K A N N L	1188.9	1133	C T T E S N G W H K I	1276.6
1068	C D A I K K A N N L T	1190.8	1134	C T E S N G W H K I T	1276.6
1069	C A I K K A N N L T T	1176.8	1135	C E S N G W H K I T Y	1338.7
1070	C I K K A N N L T T D	1220.8	1136	C S N G W H K I T Y N	1323.8
1071	C K K A N N L T T D K	1235.8	1137	C N G W H K I T Y N D	1351.0
1072	C K A N N L T T D K I	1220.8	1138	C G W H K I T Y N D G	1293.9
1073	C A N N L T T D K I V	1191.8	1139	C W H K I T Y N D G K	1365.0
1074	C N N L T T D K I V P	1217.9	1140	C H K I T Y N D G K T	1279.8
1075	C N L T T D K I V P G	1160.8	1141	C K I T Y N D G K T G	1199.7
1076	C L T T D K I V P G Q	1174.8	1142	C I T Y N D G K T G Y	1234.7
1077	C T T D K I V P G Q K	1189.8	1143	C T Y N D G K T G Y V	1220.7
1078	C T D K I V P G Q K L	1201.9	1144	C Y N D G K T G Y V N	1233.8
1079	C D K I V P G Q K L Q	1229.0	1145	C N D G K T G Y V N G	1127.7
1080	C K I V P G Q K L Q V	1213.1	1146	C D G K T G Y V N G K	1141.7
1081	C I V P G Q K L Q V N	1199.1	1147	C G K T G Y V N G K Y	1189.8
1082	C V P G Q K L Q V N E	1215.0	1148	C K T G Y V N G K Y L	1245.9
1083	C P G Q K L Q V N E V	1215.0	1149	C T G Y V N G K Y L T	1218.8
1084	C G Q K L Q V N E V A	1188.9	1150	C G Y V N G K Y L T D	1232.8
1085	C Q K L Q V N E V A T	1232.9	1151	C Y V N G K Y L T D K	1303.9
1086	C K L Q V N E V A T E	1233.8	1152	C V N G K Y L T D K A	1211.8
1087	C L Q V N E V A T E E	1234.7	1153	C N G K Y L T D K A T	1213.7
1088	C Q V N E V A T E E K	1249.7	1154	C G K Y L T D K A T S	1187.4
1089	C V N E V A T E E K A	1192.6	1155	C K Y L T D K A T S T	1231.4
1090	C N E V A T E E K A E	1222.5	1156	C Y L T D K A T S T P	1200.4

1157	C L T D K A T S T P V	1136.4	1223	C S G D T I W A L S V	1153.3
1158	C T D K A T S T P V V	1122.4	1224	C G D T I W A L S V K	1193.6
1159	C D K A T S T P V V K	1149.5	1225	C D T I W A L S V K Y	1299.7
1160	C K A T S T P V V K Q	1162.6	1226	C T I W A L S V K Y G	1241.7
1161	C A T S T P V V K Q E	1163.5	1227	C I W A L S V K Y G V	1239.8
1162	C T S T P V V K Q E V	1191.6	1228	C W A L S V K Y G V S	1214.5
1163	C S T P V V K Q E V K	1218.7	1229	C A L S V K Y G V S V	1127.4
1164	C T P V V K Q E V K K	1259.0	1230	C L S V K Y G V S V Q	1184.5
1165	C P V V K Q E V K K E	1287.0	1231	C S V K Y G V S V Q D	1186.4
1166	C V V K Q E V K K E T	1290.9	1232	C V K Y G V S V Q D I	1211.7
1167	C V K Q E V K K E T T	1292.8	1233	C K Y G V S V Q D I M	1243.8
1168	C K Q E V K K E T T Q	1321.8	1234	C Y G V S V Q D I M S	1203.5
1169	C Q E V K K E T T Q Q	1321.8	1235	C G V S V Q D I M S W	1226.6
1170	C E V K K E T T Q Q V	1292.8	1236	C V S V Q D I M S W N	1283.7
1171	C V K K E T T Q Q V K	1291.9	1237	C S V Q D I M S W N N	1298.7
1172	C K K E T T Q Q V K P	1289.9	1238	C V Q D I M S W N N L	1324.0
1173	C K E T T Q Q V K P A	1232.8	1239	C Q D I M S W N N L S	1312.7
1174	C E T T Q Q V K P A T	1205.7	1240	C D I M S W N N L S S	1272.4
1175	C T T Q Q V K P A T E	1205.7	1241	C I M S W N N L S S S	1245.2
1176	C T Q Q V K P A T E A	1175.7	1242	C M S W N N L S S S S	1219.9
1177	C Q Q V K P A T E A K	1202.8	1243	C S W N N L S S S S I	1201.8
1178	C Q V K P A T E A K T	1175.7	1244	C W N N L S S S S I Y	1277.1
1179	C V K P A T E A K T E	1176.6	1245	C N N L S S S S I Y V	1190.0
1180	C K P A T E A K T E V	1176.6	1246	C N L S S S S I Y V G	1132.9
1181	C P A T E A K T E V K	1176.6	1247	c L S S S S I Y V G Q	1146.9
1182	C A T E A K T E V K Q	1207.6	1248	c S S S S I Y V G Q K	1161.9
1183	C T E A K T E V K Q P	1233.7	1249	c S S S I Y V G Q K P	1171.2
1184	C E A K T E V K Q P T	1233.7	1250	c S S I Y V G Q K P A	1154.4
1185	C A K T E V K Q P T T	1205.7	1251	c S I Y V G Q K P A I	1179.7
1186	C K T E V K Q P T T Q	1262.8	1252	c I Y V G Q K P A I K	1220.0
1187	C T E V K Q P T T Q Q	1262.8	1253	c Y V G Q K P A I K Q	1235.0
1188	C E V K Q P T T Q Q T	1262.8	1254	c V G Q K P A I K Q P	1169.0
1189	C V K Q P T T Q Q T A	1204.8	1255	c G Q K P A I K Q P T	1170.9
1190	C K Q P T T Q Q T A P	1202.8	1256	c Q K P A I K Q P T K	1242.0
1191	C Q P T T Q Q T A P A	1145.7	1257	c K P A I K Q P T K T	1214.9
1192	C P T T Q Q T A P A P	1114.7	1258	c P A I K Q P T K T V	1185.9
1193	C T T Q Q T A P A P K	1145.7	1259	c A I K Q P T K T V A	1159.8
1194	C T Q Q T A P A P K A	1115.7	1260	c I K Q P T K T V A P	1185.9
1195	C Q Q T A P A P K A A	1085.7	1261	c K Q P T K T V A P K	1200.9
1196	C Q T A P A P K A A E	1086.6	1262	c Q P T K T V A P K A	1143.8
1197	C T A P A P K A A E T	1059.5	1263	c P T K T V A P K A E	1144.7
1198	C A P A P K A A E T K	1086.6	1264	c T K T V A P K A E T	1148.6
1199	C P A P K A A E T K E	1144.6	1265	c K T V A P K A E T K	1175.7
1200	C A P K A A E T K E A	1118.5	1266	c T V A P K A E T K T	1148.6
1201	C P K A A E T K E A P	1144.6	1267	c V A P K A E T K T Q	1175.7
1202	C K A A E T K E A P V	1146.6	1268	c A P K A E T K T Q A	1147.6
1203	C A A E T K E A P V V	1117.6	1269	c P K A E T K T Q A P	1173.7
1204	C A E T K E A P V V D	1161.6	1270	c K A E T K T Q A P A	1147.6
1205	C E T K E A P V V D Q	1218.7	1271	c A E T K T Q A P A A	1090.5
1206	C T K E A P V V D Q N	1203.8	1272	c E T K T Q A P A A E	1148.5
1207	C K E A P V V D Q N A	1173.8	1273	c T K T Q A P A A E K	1147.6
1208	C E A P V V D Q N A T	1146.7	1274	c K T Q A P A A E K Q	1174.7
1209	C A P V V D Q N A T T	1118.7	1275	c T Q A P A A E K Q T	1147.6
1210	C P V V D Q N A T T H	1184.8	1276	c Q A P A A E K Q T A	1117.6
1211	C V V D Q N A T T H N	1201.8	1277	c A P A A E K Q T A P	1086.6
1212	C V D Q N A T T H N V	1201.8	1278	c P A A E K Q T A P A	1086.6
1213	C D Q N A T T H N V K	1230.8	1279	c A A E K Q T A P A V	1088.6
1214	C Q N A T T H N V K S	1203.6	1280	c A E K Q T A P A V K	1145.7
1215	C N A T T H N V K S G	1132.5	1281	c E K Q T A P A V K E	1203.7
1216	C A T T H N V K S G D	1133.4	1282	c K Q T A P A V K E N	1188.8
1217	C T T H N V K S G D T	1163.4	1283	c Q T A P A V K E N S	1148.5
1218	C T H N V K S G D T I	1175.5	1284	c T A P A V K E N S N	1134.5
1219	C H N V K S G D T I W	1260.7	1285	c A P A V K E N S N A	1104.5
1220	C N V K S G D T I W A	1194.6	1286	c P A V K E N S N A N	1147.6
1221	C V K S G D T I W A L	1193.6	1287	c A V K E N S N A N T	1151.5
1222	C K S G D T I W A L S	1182.3	1288	c V K E N S N A N T A	1151.5

1289 c K E N S N A N T A T 1153.4
 1290 c E N S N A N T A T T 1126.3
 1291 c N S N A N T A T T E 1126.3
 1292 c S N A N T A T T E K 1140.3
 1293 c N A N T A T T E K K 1180.6
 1294 c A N T A T T E K K E 1195.5
 1295 c N T A T T E K K E T 1225.5
 1296 c T A T T E K K E T A 1182.4
 1297 c A T T E K K E T A T 1182.4
 1298 c T T E K K E T A T E 1240.4
 1299 c T E K K E T A T E Q 1267.5
 1300 c E K K E T A T E Q Q 1294.6
 1301 c K K E T A T E Q Q T 1266.6
 1302 c K E T A T E Q Q T T 1239.5
 1303 c E T A T E Q Q T T T 1212.4
 1304 c T A T E Q Q T T T K 1211.5
 1305 c A T E Q Q T T T K A 1181.5
 1306 c T E Q Q T T T K A P 1207.6
 1307 c E Q Q T T T K A P T 1207.6
 1308 c Q Q T T T K A P T Q 1206.7
 1309 c Q T T T K A P T Q A 1149.6
 1310 c T T T K A P T Q A A 1092.5
 1311 c T T K A P T Q A A K 1119.6
 1312 c T K A P T Q A A K P 1115.7
 1313 c K A P T Q A A K P A 1085.7
 1314 c A P T Q A A K P A P 1054.7
 1315 c P T Q A A K P A P A 1054.7
 1316 c T Q A A K P A P A P 1054.7
 1317 c Q A A K P A P A P S 1041.5
 1318 c A A K P A P A P S T 1014.4
 1319 c A K P A P A P S T N 1057.5
 1320 c K P A P A P S T N T 1087.5
 1321 c P A P A P S T N T N 1073.5
 1322 c A P A P S T N T N K 1104.5
 1323 c P A P S T N T N K T 1134.5
 1324 c A P S T N T N K T N 1151.5
 1325 c P S T N T N K T N T 1181.5
 1326 c S T N T N K T N T T 1185.4
 1327 c T N T N K T N T T N 1211.7
 1328 c N T N K T N T T N N 1224.8
 1329 c T N K T N T T N N N 1224.8
 1330 c N K T N T T N N N T 1224.8
 1331 c K T N T T N N N T N 1224.8
 1332 c T N T T N N N T N A 1167.7
 1333 c N T T N N N T N A S 1154.5
 1334 c T T N N N T N A S T 1141.4
 1335 c T N N N T N A S T P 1137.5
 1336 c N N N T N A S T P S 1124.3
 1337 c N N T N A S T P S K 1138.3
 1338 c N T N A S T P S K N 1138.3
 1339 c T N A S T P S K N T 1125.2
 1340 c N A S T P S K N T N 1138.3
 1341 c A S T P S K N T N T 1125.2
 1342 c S T P S K N T N T N 1168.3
 1343 c T P S K N T N T N T 1181.5
 1344 c P S K N T N T N T N 1194.6
 1345 c S K N T N T N T N T 1198.5
 1346 c K N T N T N T N T N 1224.8
 1347 c N T N T N T N T N T 1197.7
 1348 c T N T N T N T N T N 1197.7
 1349 c N T N T N T N T N T 1197.7
 1350 c T N T N T N T N T N 1197.7
 1351 c N T N T N T N T N T 1197.7
 1352 c T N T N T N T N T N 1197.7
 1353 c N T N T N T N T N T 1197.7
 1354 c T N T N T N T N T N 1197.7

1355 c N T N T N T N T N T 1197.7
 1356 c T N T N T N T N T N 1197.7
 1357 c N T N T N T N T N T 1197.7
 1358 c T N T N T N T N T N 1197.7
 1359 c N T N T N T N T N T 1197.7
 1360 c T N T N T N T N T N 1197.7
 1361 c N T N T N T N T N T 1197.7
 1362 c T N T N T N T N T N 1197.7
 1363 c N T N T N T N T N T 1197.7
 1364 c T N T N T N T N T N 1197.7
 1365 c N T N T N T N T N T 1197.7
 1366 c T N T N T N T N T N 1197.7
 1367 c N T N T N T N T N Q 1224.8
 1368 c T N T N T N T N T N Q G 1167.7
 1369 c N T N T N T N T N Q G S 1154.5
 1370 c T N T N T N Q G S T 1141.4
 1371 c N T N T N Q G S T N 1154.5
 1372 c T N T N Q G S T N N 1154.5
 1373 c N T N Q G S T N N A 1124.5
 1374 c T N Q G S T N N A S 1098.2
 1375 c N Q G S T N N A S A 1068.2
 1376 c Q G S T N N A S A S 1041.9
 1377 c G S T N N A S A S A 984.8
 1378 c S T N N A S A S A L 1040.9
 1379 c T N N A S A S A L I 1066.2
 1380 c N N A S A S A L I A 1036.2
 1381 c N A S A S A L I A E 1051.1
 1382 c A S A S A L I A E A 1008.0
 1383 c S A S A L I A E A Q 1065.1
 1384 c A S A L I A E A Q K 1105.4
 1385 c S A L I A E A Q K H 1171.5
 1386 c A L I A E A Q K H L 1196.8
 1387 c L I A E A Q K H L G 1182.8
 1388 c I A E A Q K H L G K 1197.8
 1389 c A E A Q K H L G K A 1155.7
 1390 c E A Q K H L G K A Y 1247.8
 1391 c A Q K H L G K A Y S 1206.6
 1392 c Q K H L G K A Y S W 1321.8
 1393 c K H L G K A Y S W G 1250.7
 1394 c H L G K A Y S W G G 1179.6
 1395 c L G K A Y S W G G N 1156.6
 1396 c G K A Y S W G G N G 1100.5
 1397 c K A Y S W G G N G P 1140.6
 1398 c A Y S W G G N G P T 1113.5
 1399 c Y S W G G N G P T T 1143.5
 1400 c S W G G N G P T T F 1127.5
 1401 c W G G N G P T T F D 1154.7
 1402 c G G N G P T T F D C 1071.6
 1403 c G N G P T T F D C S 1102.4
 1404 c N G P T T F D C S G 1102.4
 1405 c G P T T F D C S G F 1135.4
 1406 c P T T F D C S G F T 1179.4
 1407 c T T F D C S G F T K 1210.4
 1408 c T F D C S G F T K Y 1272.5
 1409 c F D C S G F T K Y V 1270.6
 1410 c D C S G F T K Y V F 1270.6
 1411 c C S G F T K Y V F A 1226.6
 1412 c S G F T K Y V F A K 1251.6
 1413 c G F T K Y V F A K S 1251.6
 1414 c F T K Y V F A K S G 1251.6
 1415 c T K Y V F A K S G I 1217.6
 1416 c K Y V F A K S G I S 1204.4
 1417 c Y V F A K S G I S L 1189.4
 1418 c V F A K S G I S L P 1123.4
 1419 c F A K S G I S L P R 1180.4
 1420 c A K S G I S L P R T 1134.3

1421	c	K	S	G	I	S	L	P	R	T	S	1151.1	1487	c	Y	D	N	I	H	G	A	G	W	G	1192.8
1422	c	S	G	I	S	L	P	R	T	S	G	1080.0	1488	c	D	N	I	H	G	A	G	W	G	K	1157.8
1423	c	G	I	S	L	P	R	T	S	G	A	1063.2	1489	c	N	I	H	G	A	G	W	G	K	F	1189.9
1424	c	I	S	L	P	R	T	S	G	A	Q	1134.3	1490	c	I	H	G	A	G	W	G	K	F	L	1188.9
1425	c	S	L	P	R	T	S	G	A	Q	Y	1184.3	1491	c	H	G	A	G	W	G	K	F	L	V	1174.9
1426	c	L	P	R	T	S	G	A	Q	Y	A	1167.5	1492	c	G	A	G	W	G	K	F	L	V	G	1094.8
1427	c	P	R	T	S	G	A	Q	Y	A	S	1142.2	1493	c	A	G	W	G	K	F	L	V	G	F	1184.9
1428	c	R	T	S	G	A	Q	Y	A	S	T	1146.1	1494	c	G	W	G	K	F	L	V	G	F	G	1170.9
1429	c	T	S	G	A	Q	Y	A	S	T	T	1091.0	1495	c	W	G	K	F	L	V	G	F	G	R	1270.0
1430	c	S	G	A	Q	Y	A	S	T	T	R	1146.1	1496	c	G	K	F	L	V	G	F	G	R	V	1182.9
1431	c	G	A	Q	Y	A	S	T	T	R	I	1171.4	1497	R											174.2
1432	c	A	Q	Y	A	S	T	T	R	I	S	1202.2	1498	R											174.2
1433	c	Q	Y	A	S	T	T	R	I	S	E	1260.2	1499	R											174.2
1434	c	Y	A	S	T	T	R	I	S	E	S	1219.9	1500	H	M	N	M	K	K	A	T	I	A	A	1216.0
1435	c	A	S	T	T	R	I	S	E	S	Q	1184.9	1501	H	N	M	K	K	A	T	I	A	A	T	1185.8
1436	c	S	T	T	R	I	S	E	S	Q	A	1184.9	1502	H	M	K	K	A	T	I	A	A	T	A	1142.7
1437	c	T	T	R	I	S	E	S	Q	A	K	1225.2	1503	H	K	K	A	T	I	A	A	T	A	G	1068.5
1438	c	T	R	I	S	E	S	Q	A	K	P	1221.3	1504	H	K	A	T	I	A	A	T	A	G	I	1053.5
1439	c	R	I	S	E	S	Q	A	K	P	G	1177.3	1505	H	A	T	I	A	A	T	A	G	I	A	996.4
1440	c	I	S	E	S	Q	A	K	P	G	D	1136.2	1506	H	T	I	A	A	T	A	G	I	A	V	1024.5
1441	c	S	E	S	Q	A	K	P	G	D	L	1136.2	1507	H	I	A	A	T	A	G	I	A	V	T	1024.5
1442	c	E	S	Q	A	K	P	G	D	L	V	1147.5	1508	H	A	A	T	A	G	I	A	V	T	A	982.4
1443	c	S	Q	A	K	P	G	D	L	V	F	1165.6	1509	H	A	T	A	G	I	A	V	T	A	F	1058.5
1444	c	Q	A	K	P	G	D	L	V	F	F	1224.9	1510	H	T	A	G	I	A	V	T	A	F	A	1058.5
1445	R											174.2	1511	H	A	G	I	A	V	T	A	F	A	A	1028.5
1446	R											174.2	1512	H	G	I	A	V	T	A	F	A	A	P	1054.6
1447	c	A	K	P	G	D	L	V	F	F	D	1211.8	1513	H	I	A	V	T	A	F	A	A	P	T	1098.6
1448	c	K	P	G	D	L	V	F	F	D	Y	1303.9	1514	H	A	V	T	A	F	A	A	P	T	I	1098.6
1449	c	P	G	D	L	V	F	F	D	Y	G	1232.8	1515	H	V	T	A	F	A	A	P	T	I	A	1098.6
1450	c	G	D	L	V	F	F	D	Y	G	S	1223.5	1516	H	T	A	F	A	A	P	T	I	A	S	1087.3
1451	c	D	L	V	F	F	D	Y	G	S	G	1223.5	1517	H	A	F	A	A	P	T	I	A	S	A	1057.3
1452	c	L	V	F	F	D	Y	G	S	G	I	1221.6	1518	H	F	A	A	P	T	I	A	S	A	S	1074.1
1453	c	V	F	F	D	Y	G	S	G	I	S	1196.3	1519	H	A	A	P	T	I	A	S	A	S	T	1028.0
1454	c	F	F	D	Y	G	S	G	I	S	H	1234.3	1520	H	A	P	T	I	A	S	A	S	T	V	1056.1
1455	c	F	D	Y	G	S	G	I	S	H	V	1186.3	1521	H	P	T	I	A	S	A	S	T	V	V	1084.2
1456	c	D	Y	G	S	G	I	S	H	V	G	1096.2	1522	H	T	I	A	S	A	S	T	V	V	V	1086.2
1457	c	Y	G	S	G	I	S	H	V	G	I	1094.3	1523	H	I	A	S	A	S	T	V	V	V	E	1114.2
1458	c	G	S	G	I	S	H	V	G	I	Y	1094.3	1524	R											174.2
1459	c	S	G	I	S	H	V	G	I	Y	V	1136.4	1525	R											174.2
1460	c	G	I	S	H	V	G	I	Y	V	G	1105.6	1526	R											174.2
1461	c	I	S	H	V	G	I	Y	V	G	N	1162.7	1527	H	A	S	A	S	T	V	V	V	E	A	1072.1
1462	c	S	H	V	G	I	Y	V	G	N	G	1106.6	1528	H	S	A	S	T	V	V	V	E	A	G	1058.1
1463	c	H	V	G	I	Y	V	G	N	G	Q	1146.9	1529	H	A	S	T	V	V	V	E	A	G	D	1085.3
1464	c	V	G	I	Y	V	G	N	G	Q	M	1141.0	1530	H	S	T	V	V	V	E	A	G	D	T	1115.3
1465	c	G	I	Y	V	G	N	G	Q	M	I	1155.0	1531	H	T	V	V	V	E	A	G	D	T	L	1140.6
1466	c	I	Y	V	G	N	G	Q	M	I	N	1212.1	1532	H	V	V	V	E	A	G	D	T	L	W	1225.8
1467	c	Y	V	G	N	G	Q	M	I	N	A	1170.0	1533	H	V	V	E	A	G	D	T	L	W	G	1183.7
1468	c	V	G	N	G	Q	M	I	N	A	Q	1135.0	1534	H	V	E	A	G	D	T	L	W	G	I	1197.7
1469	c	G	N	G	Q	M	I	N	A	Q	D	1150.9	1535	H	E	A	G	D	T	L	W	G	I	A	1169.6
1470	R											174.2	1536	H	A	G	D	T	L	W	G	I	A	Q	1168.7
1471	R											174.2	1537	H	G	D	T	L	W	G	I	A	Q	S	1185.5
1472	R											174.2	1538	H	D	T	L	W	G	I	A	Q	S	K	1256.6
1473	R											174.2	1539	H	T	L	W	G	I	A	Q	S	K	G	1198.6
1474	c	N	G	Q	M	I	N	A	Q	D	N	1208.0	1540	H	L	W	G	I	A	Q	S	K	G	T	1198.6
1475	c	G	Q	M	I	N	A	Q	D	N	G	1150.9	1541	H	W	G	I	A	Q	S	K	G	T	T	1186.5
1476	c	Q	M	I	N	A	Q	D	N	G	V	1193.0	1542	H	G	I	A	Q	S	K	G	T	T	V	1099.4
1477	c	M	I	N	A	Q	D	N	G	V	K	1193.0	1543	H	I	A	Q	S	K	G	T	T	V	D	1157.4
1478	c	I	N	A	Q	D	N	G	V	K	Y	1224.9	1544	H	A	Q	S	K	G	T	T	V	D	A	1115.3
1479	c	N	A	Q	D	N	G	V	K	Y	D	1226.8	1545	H	Q	S	K	G	T	T	V	D	A	I	1157.4
1480	c	A	Q	D	N	G	V	K	Y	D	N	1226.8	1546	H	S	K	G	T	T	V	D	A	I	K	1157.4
1481	c	Q	D	N	G	V	K	Y	D	N	I	1268.9	1547	H	K	G	T	T	V	D	A	I	K	K	1197.7
1482	c	D	N	G	V	K	Y	D	N	I	H	1277.9	1548	H	G	T	T	V	D	A	I	K	K	A	1140.6
1483	c	N	G	V	K	Y	D	N	I	H	G	1219.9	1549	H	T	T	V	D	A	I	K	K	A	N	1197.7
1484	c	G	V	K	Y	D	N	I	H	G	A	1176.8	1550	H	T	V	D	A	I	K	K	A	N	N	1210.8
1485	c	V	K	Y	D	N	I	H	G	A	G	1176.8	1551	R											174.2
1486	c	K	Y	D	N	I	H	G	A	G	W	1263.9	1552	R											174.2

1553	H V D A I K K A N N L	1222.9	1619	H T T E S N G W H K I	1310.6
1554	H D A I K K A N N L T	1224.8	1620	H T E S N G W H K I T	1310.6
1555	H A I K K A N N L T T	1210.8	1621	H E S N G W H K I T Y	1372.7
1556	H I K K A N N L T T D	1254.8	1622	H S N G W H K I T Y N	1357.8
1557	H K K A N N L T T D K	1269.8	1623	H N G W H K I T Y N D	1385.0
1558	H K A N N L T T D K I	1254.8	1624	H G W H K I T Y N D G	1327.9
1559	H A N N L T T D K I V	1225.8	1625	H W H K I T Y N D G K	1399.0
1560	H N N L T T D K I V P	1251.9	1626	H H K I T Y N D G K T	1313.8
1561	H N L T T D K I V P G	1194.8	1627	H K I T Y N D G K T G	1233.7
1562	H L T T D K I V P G Q	1208.8	1628	H I T Y N D G K T G Y	1268.7
1563	H T T D K I V P G Q K	1223.8	1629	H T Y N D G K T G Y V	1254.7
1564	H T D K I V P G Q K L	1235.9	1630	H Y N D G K T G Y V N	1267.8
1565	H D K I V P G Q K L Q	1263.0	1631	H N D G K T G Y V N G	1161.7
1566	H K I V P G Q K L Q V	1247.1	1632	H D G K T G Y V N G K	1175.7
1567	H I V P G Q K L Q V N	1233.1	1633	H G K T G Y V N G K Y	1223.8
1568	H V P G Q K L Q V N E	1249.0	1634	H K T G Y V N G K Y L	1279.9
1569	H P G Q K L Q V N E V	1249.0	1635	H T G Y V N G K Y L T	1252.8
1570	H G Q K L Q V N E V A	1222.9	1636	H G Y V N G K Y L T D	1266.8
1571	H Q K L Q V N E V A T	1266.9	1637	H Y V N G K Y L T D K	1337.9
1572	H K L Q V N E V A T E	1267.8	1638	H V N G K Y L T D K A	1245.8
1573	H L Q V N E V A T E E	1268.7	1639	H N G K Y L T D K A T	1247.7
1574	H Q V N E V A T E E K	1283.7	1640	H G K Y L T D K A T S	1221.4
1575	H V N E V A T E E K A	1226.6	1641	H K Y L T D K A T S T	1265.4
1576	H N E V A T E E K A E	1256.5	1642	H Y L T D K A T S T P	1234.4
1577	H E V A T E E K A E K	1270.5	1643	H L T D K A T S T P V	1170.4
1578	H V A T E E K A E K S	1229.3	1644	H T D K A T S T P V V	1156.4
1579	H A T E E K A E K S V	1229.3	1645	H D K A T S T P V V K	1183.5
1580	H T E E K A E K S V S	1246.1	1646	H K A T S T P V V K Q	1196.6
1581	H E E K A E K S V S A	1216.1	1647	H A T S T P V V K Q E	1197.5
1582	H E K A E K S V S A T	1188.1	1648	H T S T P V V K Q E V	1225.6
1583	H K A E K S V S A T W	1245.3	1649	H S T P V V K Q E V K	1252.7
1584	H A E K S V S A T W L	1230.3	1650	H T P V V K Q E V K K	1293.0
1585	H E K S V S A T W L N	1273.4	1651	H P V V K Q E V K K E	1321.0
1586	H K S V S A T W L N V	1243.5	1652	H V V K Q E V K K E T	1324.9
1587	H S V S A T W L N V R	1271.5	1653	H V K Q E V K K E T T	1326.8
1588	H V S A T W L N V R S	1271.5	1654	H K Q E V K K E T T Q	1355.8
1589	H S A T W L N V R S G	1229.4	1655	H Q E V K K E T T Q Q	1355.8
1590	H A T W L N V R S G A	1212.6	1656	H E V K K E T T Q Q V	1326.8
1591	H T W L N V R S G A G	1198.6	1657	H V K K E T T Q Q V K	1325.9
1592	H W L N V R S G A G V	1196.7	1658	H K K E T T Q Q V K P	1323.9
1593	H L N V R S G A G V D	1125.5	1659	H K E T T Q Q V K P A	1266.8
1594	H N V R S G A G V D H	1149.5	1660	H E T T Q Q V K P A T	1239.7
1595	H V R S G A G V D H S	1123.2	1661	H T T Q Q V K P A T E	1239.7
1596	H R S G A G V D H S I	1137.2	1662	H T Q Q V K P A T E A	1209.7
1597	H S G A G V D H S I L	1094.2	1663	H Q Q V K P A T E A K	1236.8
1598	H G A G V D H S I L T	1107.4	1664	H Q V K P A T E A K T	1209.7
1599	H A G V D H S I L T S	1138.2	1665	H V K P A T E A K T E	1210.6
1600	H G V D H S I L T S I	1180.3	1666	H K P A T E A K T E V	1210.6
1601	H V D H S I L T S I K	1251.4	1667	H P A T E A K T E V K	1210.6
1602	H D H S I L T S I K G	1209.3	1668	H A T E A K T E V K Q	1241.6
1603	H H S I L T S I K G G	1151.3	1669	H T E A K T E V K Q P	1267.7
1604	H S I L T S I K G G T	1115.2	1670	H E A K T E V K Q P T	1267.7
1605	H I L T S I K G G T K	1155.5	1671	H A K T E V K Q P T T	1239.7
1606	H L T S I K G G T K V	1141.5	1672	H K T E V K Q P T T Q	1296.8
1607	H T S I K G G T K V T	1129.4	1673	H T E V K Q P T T Q Q	1296.8
1608	H S I K G G T K V T V	1127.5	1674	H E V K Q P T T Q Q T	1296.8
1609	H I K G G T K V T V E	1168.7	1675	H V K Q P T T Q Q T A	1238.8
1610	H K G G T K V T V E T	1156.6	1676	H K Q P T T Q Q T A P	1236.8
1611	H G G T K V T V E T T	1129.5	1677	H Q P T T Q Q T A P A	1179.7
1612	H G T K V T V E T T E	1201.5	1678	H P T T Q Q T A P A P	1148.7
1613	H T K V T V E T T E S	1232.3	1679	H T T Q Q T A P A P K	1179.7
1614	H K V T V E T T E S N	1245.4	1680	H T Q Q T A P A P K A	1149.7
1615	H V T V E T T E S N G	1174.3	1681	H Q Q T A P A P K A A	1119.7
1616	H T V E T T E S N G W	1261.4	1682	H Q T A P A P K A A E	1120.6
1617	H V E T T E S N G W H	1297.5	1683	H T A P A P K A A E T	1093.5
1618	H E T T E S N G W H K	1326.5	1684	H A P A P K A A E T K	1120.6

1685	H P A P K A A E T K E	1178.6	1751	h K T V A P K A E T K	1209.7
1686	H A P K A A E T K E A	1152.5	1752	h T V A P K A E T K T	1182.6
1687	H P K A A E T K E A P	1178.6	1753	h V A P K A E T K T Q	1209.7
1688	H K A A E T K E A P V	1180.6	1754	h A P K A E T K T Q A	1181.6
1689	H A A E T K E A P V V	1151.6	1755	h P K A E T K T Q A P	1207.7
1690	H A E T K E A P V V D	1195.6	1756	h K A E T K T Q A P A	1181.6
1691	H E T K E A P V V D Q	1252.7	1757	h A E T K T Q A P A A	1124.5
1692	H T K E A P V V D Q N	1237.8	1758	h E T K T Q A P A A E	1182.5
1693	H K E A P V V D Q N A	1207.8	1759	h T K T Q A P A A E K	1181.6
1694	H E A P V V D Q N A T	1180.7	1760	h K T Q A P A A E K Q	1208.7
1695	H A P V V D Q N A T T	1152.7	1761	h T Q A P A A E K Q T	1181.6
1696	H P V V D Q N A T T H	1218.8	1762	h Q A P A A E K Q T A	1151.6
1697	H V V D Q N A T T H N	1235.8	1763	h A P A A E K Q T A P	1120.6
1698	H V D Q N A T T H N V	1235.8	1764	h P A A E K Q T A P A	1120.6
1699	H D Q N A T T H N V K	1264.8	1765	h A A E K Q T A P A V	1122.6
1700	H Q N A T T H N V K S	1237.6	1766	h A E K Q T A P A V K	1179.7
1701	H N A T T H N V K S G	1166.5	1767	h E K Q T A P A V K E	1237.7
1702	H A T T H N V K S G D	1167.4	1768	h K Q T A P A V K E N	1222.8
1703	H T T H N V K S G D T	1197.4	1769	h Q T A P A V K E N S	1182.5
1704	H T H N V K S G D T I	1209.5	1770	h T A P A V K E N S N	1168.5
1705	H H N V K S G D T I W	1294.7	1771	h A P A V K E N S N A	1138.5
1706	H N V K S G D T I W A	1228.6	1772	h P A V K E N S N A N	1181.6
1707	H V K S G D T I W A L	1227.6	1773	h A V K E N S N A N T	1185.5
1708	H K S G D T I W A L S	1216.3	1774	h V K E N S N A N T A	1185.5
1709	H S G D T I W A L S V	1187.3	1775	h K E N S N A N T A T	1187.4
1710	H G D T I W A L S V K	1227.6	1776	h E N S N A N T A T T	1160.3
1711	H D T I W A L S V K Y	1333.7	1777	h N S N A N T A T T E	1160.3
1712	H T I W A L S V K Y G	1275.7	1778	h S N A N T A T T E K	1174.3
1713	H I W A L S V K Y G V	1273.8	1779	h N A N T A T T E K K	1214.6
1714	H W A L S V K Y G V S	1248.5	1780	h A N T A T T E K K E	1229.5
1715	H A L S V K Y G V S V	1161.4	1781	h N T A T T E K K E T	1259.5
1716	H L S V K Y G V S V Q	1218.5	1782	h T A T T E K K E T A	1216.4
1717	H S V K Y G V S V Q D	1220.4	1783	h A T T E K K E T A T	1216.4
1718	H V K Y G V S V Q D I	1245.7	1784	h T T E K K E T A T E	1274.4
1719	H K Y G V S V Q D I M	1277.8	1785	h T E K K E T A T E Q	1301.5
1720	H Y G V S V Q D I M S	1237.5	1786	h E K K E T A T E Q Q	1328.6
1721	H G V S V Q D I M S W	1260.6	1787	h K K E T A T E Q Q T	1300.6
1722	H V S V Q D I M S W N	1317.7	1788	h K E T A T E Q Q T T	1273.5
1723	H S V Q D I M S W N N	1332.7	1789	h E T A T E Q Q T T T	1246.4
1724	H V Q D I M S W N N L	1358.0	1790	h T A T E Q Q T T T K	1245.5
1725	H Q D I M S W N N L S	1346.7	1791	h A T E Q Q T T T K A	1215.5
1726	H D I M S W N N L S S	1306.4	1792	h T E Q Q T T T K A P	1241.6
1727	H I M S W N N L S S S	1279.2	1793	h E Q Q T T T K A P T	1241.6
1728	H M S W N N L S S S S	1253.9	1794	h Q Q T T T K A P T Q	1240.7
1729	H S W N N L S S S S I	1235.8	1795	h Q T T T K A P T Q A	1183.6
1730	H W N N L S S S S I Y	1311.1	1796	h T T T K A P T Q A A	1126.5
1731	H N N L S S S S I Y V	1224.0	1797	h T T K A P T Q A A K	1153.6
1732	H N L S S S S I Y V G	1166.9	1798	h T K A P T Q A A K P	1149.7
1733	h L S S S S I Y V G Q	1180.9	1799	h K A P T Q A A K P A	1119.7
1734	h S S S S I Y V G Q K	1195.9	1800	h A P T Q A A K P A P	1088.7
1735	h S S S I Y V G Q K P	1205.2	1801	h P T Q A A K P A P A	1088.7
1736	h S S I Y V G Q K P A	1188.4	1802	h T Q A A K P A P A P	1088.7
1737	h S I Y V G Q K P A I	1213.7	1803	h Q A A K P A P A P S	1075.5
1738	h I Y V G Q K P A I K	1254.0	1804	h A A K P A P A P S T	1048.4
1739	h Y V G Q K P A I K Q	1269.0	1805	h A K P A P A P S T N	1091.5
1740	h V G Q K P A I K Q P	1203.0	1806	h K P A P A P S T N T	1121.5
1741	h G Q K P A I K Q P T	1204.9	1807	h P A P A P S T N T N	1107.5
1742	h Q K P A I K Q P T K	1276.0	1808	h A P A P S T N T N K	1138.5
1743	h K P A I K Q P T K T	1248.9	1809	h P A P S T N T N K T	1168.5
1744	h P A I K Q P T K T V	1219.9	1810	h A P S T N T N K T N	1185.5
1745	h A I K Q P T K T V A	1193.8	1811	h P S T N T N K T N T	1215.5
1746	h I K Q P T K T V A P	1219.9	1812	h S T N T N K T N T T	1219.4
1747	h K Q P T K T V A P K	1234.9	1813	h T N T N K T N T T N	1245.7
1748	h Q P T K T V A P K A	1177.8	1814	h N T N K T N T T N N	1258.8
1749	h P T K T V A P K A E	1178.7	1815	h T N K T N T T N N N	1258.8
1750	h T K T V A P K A E T	1182.6	1816	h N K T N T T N N N T	1258.8

1817	h	K	T	N	T	T	N	N	N	T	N		1258.8
1818	h	T	N	T	T	N	N	N	T	N	A		1201.7
1819	h	N	T	T	N	N	N	T	N	A	S		1188.5
1820	h	T	T	N	N	N	T	N	A	S	T		1175.4
1821	h	T	N	N	N	T	N	A	S	T	P		1171.5
1822	h	N	N	N	T	N	A	S	T	P	S		1158.3
1823	h	N	N	T	N	A	S	T	P	S	K		1172.3
1824	h	N	T	N	A	S	T	P	S	K	N		1172.3
1825	h	T	N	A	S	T	P	S	K	N	T		1159.2
1826	h	N	A	S	T	P	S	K	N	T	N		1172.3
1827	h	A	S	T	P	S	K	N	T	N	T		1159.2
1828	h	S	T	P	S	K	N	T	N	T	N		1202.3
1829	h	T	P	S	K	N	T	N	T	N	T		1215.5
1830	h	P	S	K	N	T	N	T	N	T	N		1228.6
1831	h	S	K	N	T	N	T	N	T	N	T		1232.5
1832	h	K	N	T	N	T	N	T	N	T	N		1258.8
1833	h	N	T	N	T	N	T	N	T	N	T		1231.7
1834	h	T	N	T	N	T	N	T	N	T	N		1231.7
1835	h	N	T	N	T	N	T	N	T	N	T		1231.7
1836	h	T	N	T	N	T	N	T	N	T	N		1231.7
1837	h	N	T	N	T	N	T	N	T	N	T		1231.7
1838	h	T	N	T	N	T	N	T	N	T	N		1231.7
1839	h	N	T	N	T	N	T	N	T	N	T		1231.7
1840	h	T	N	T	N	T	N	T	N	T	N		1231.7
1841	h	N	T	N	T	N	T	N	T	N	T		1231.7
1842	h	T	N	T	N	T	N	T	N	T	N		1231.7
1843	h	N	T	N	T	N	T	N	T	N	T		1231.7
1844	h	T	N	T	N	T	N	T	N	T	N		1231.7
1845	h	N	T	N	T	N	T	N	T	N	T		1231.7
1846	h	T	N	T	N	T	N	T	N	T	N		1231.7
1847	h	N	T	N	T	N	T	N	T	N	T		1231.7
1848	h	T	N	T	N	T	N	T	N	T	N		1231.7
1849	h	N	T	N	T	N	T	N	T	N	T		1231.7
1850	h	T	N	T	N	T	N	T	N	T	N		1231.7
1851	h	N	T	N	T	N	T	N	T	N	T		1231.7
1852	h	T	N	T	N	T	N	T	N	T	N		1231.7
1853	h	N	T	N	T	N	T	N	T	N	Q		1258.8
1854	h	T	N	T	N	T	N	T	N	Q	G		1201.7
1855	h	N	T	N	T	N	T	N	Q	G	S		1188.5
1856	h	T	N	T	N	T	N	Q	G	S	T		1175.4
1857	h	N	T	N	T	N	Q	G	S	T	N		1188.5
1858	h	T	N	T	N	Q	G	S	T	N	N		1188.5
1859	h	N	T	N	Q	G	S	T	N	N	A		1158.5
1860	h	T	N	Q	G	S	T	N	N	A	S		1132.2
1861	h	N	Q	G	S	T	N	N	A	S	A		1102.2
1862	h	Q	G	S	T	N	N	A	S	A	S		1075.9
1863	h	G	S	T	N	N	A	S	A	S	A		1018.8
1864	h	S	T	N	N	A	S	A	S	A	L		1074.9
1865	h	T	N	N	A	S	A	S	A	L	I		1100.2
1866	h	N	N	A	S	A	S	A	L	I	A		1070.2
1867	h	N	A	S	A	S	A	L	I	A	E		1085.1
1868	h	A	S	A	S	A	L	I	A	E	A		1042.0
1869	h	S	A	S	A	L	I	A	E	A	Q		1099.1
1870	h	A	S	A	L	I	A	E	A	Q	K		1139.4
1871	h	S	A	L	I	A	E	A	Q	K	H		1205.5
1872	h	A	L	I	A	E	A	Q	K	H	L		1230.8
1873	h	L	I	A	E	A	Q	K	H	L	G		1216.8
1874	h	I	A	E	A	Q	K	H	L	G	K		1231.8
1875	h	A	E	A	Q	K	H	L	G	K	A		1189.7
1876	h	E	A	Q	K	H	L	G	K	A	Y		1281.8
1877	h	A	Q	K	H	L	G	K	A	Y	S		1240.6
1878	h	Q	K	H	L	G	K	A	Y	S	W		1355.8
1879	h	K	H	L	G	K	A	Y	S	W	G		1284.7
1880	h	H	L	G	K	A	Y	S	W	G	G		1213.6
1881	h	L	G	K	A	Y	S	W	G	G	N		1190.6
1882	h	G	K	A	Y	S	W	G	G	N	G		1134.5
1883	h	K	A	Y	S	W	G	G	N	G	P		1174.6
1884	h	A	Y	S	W	G	G	N	G	P	T		1147.5
1885	h	Y	S	W	G	G	N	G	P	T	T		1177.5
1886	h	S	W	G	G	N	G	P	T	T	F		1161.5
1887	h	W	G	G	N	G	P	T	T	F	D		1188.7
1888	h	G	G	N	G	P	T	T	F	D	C		1105.6
1889	h	G	N	G	P	T	T	F	D	C	S		1136.4
1890	h	N	G	P	T	T	F	D	C	S	G		1136.4
1891	h	G	P	T	T	F	D	C	S	G	F		1169.4
1892	h	P	T	T	F	D	C	S	G	F	T		1213.4
1893	h	T	T	F	D	C	S	G	F	T	K		1244.4
1894	h	T	F	D	C	S	G	F	T	K	Y		1306.5
1895	h	F	D	C	S	G	F	T	K	Y	V		1304.6
1896	h	D	C	S	G	F	T	K	Y	V	F		1304.6
1897	h	C	S	G	F	T	K	Y	V	F	A		1260.6
1898	h	S	G	F	T	K	Y	V	F	A	K		1285.6
1899	h	G	F	T	K	Y	V	F	A	K	S		1285.6
1900	h	F	T	K	Y	V	F	A	K	S	G		1285.6
1901	h	T	K	Y	V	F	A	K	S	G	I		1251.6
1902	h	K	Y	V	F	A	K	S	G	I	S		1238.4
1903	h	Y	V	F	A	K	S	G	I	S	L		1223.4
1904	h	V	F	A	K	S	G	I	S	L	P		1157.4
1905	h	F	A	K	S	G	I	S	L	P	R		1214.4
1906	h	A	K	S	G	I	S	L	P	R	T		1168.3
1907	h	K	S	G	I	S	L	P	R	T	S		1185.1
1908	h	S	G	I	S	L	P	R	T	S	G		1114.0
1909	h	G	I	S	L	P	R	T	S	G	A		1097.2
1910	h	I	S	L	P	R	T	S	G	A	Q		1168.3
1911	h	S	L	P	R	T	S	G	A	Q	Y		1218.3
1912	h	L	P	R	T	S	G	A	Q	Y	A		1201.5
1913	h	P	R	T	S	G	A	Q	Y	A	S		1176.2
1914	h	R	T	S	G	A	Q	Y	A	S	T		1180.1
1915	h	T	S	G	A	Q	Y	A	S	T	T		1125.0
1916	h	S	G	A	Q	Y	A	S	T	T	R		1180.1
1917	h	G	A	Q	Y	A	S	T	T	R	I		1205.4
1918	h	A	Q	Y	A	S	T	T	R	I	S		1236.2
1919	h	Q	Y	A	S	T	T	R	I	S	E		1294.2
1920	h	Y	A	S	T	T	R	I	S	E	S		1253.9
1921	h	A	S	T	T	R	I	S	E	S	Q		1218.9
1922	h	S	T	T	R	I	S	E	S	Q	A		1218.9
1923	h	T	T	R	I	S	E	S	Q	A	K		1259.2
1924	h	T	R	I	S	E	S	Q	A	K	P		1255.3
1925	h	R	I	S	E	S	Q	A	K	P	G		1211.3
1926	h	I	S	E	S	Q	A	K	P	G	D		1170.2
1927	h	S	E	S	Q	A	K	P	G	D	L		1170.2
1928	h	E	S	Q	A	K	P	G	D	L	V		1181.5
1929	h	S	Q	A	K	P	G	D	L	V	F		1199.6
1930	h	Q	A	K	P	G	D	L	V	F	F		1258.9
1931	R												174.2
1932	R												174.2
1933	h	A	K	P	G	D	L	V	F	F	D		1245.8
1934	h	K	P	G	D	L	V	F	F	D	Y		1337.9
1935	h	P	G	D	L	V	F	F	D	Y	G		1266.8
1936	h	G	D	L	V	F	F	D	Y	G	S		1257.5
1937	h	D	L	V	F	F	D	Y	G	S	G		1257.5
1938	h	L	V	F	F	D	Y	G	S	G	I		1255.6
1939	h	V	F	F	D	Y	G	S	G	I	S		1230.3
1940	h	F	F	D	Y	G	S	G	I	S	H		1268.3
1941	h	F	D	Y	G	S	G	I	S	H	V		1220.3
1942	h	D	Y	G	S	G	I	S	H	V	G		1130.2
1943	h	Y	G	S	G	I	S	H	V	G	I		1128.3
1944	h	G	S	G	I	S	H	V	G	I	Y		1128.3
1945	h	S	G	I	S	H	V	G	I	Y	V		1170.4
1946	h	G	I	S	H	V	G	I	Y	V	G		1139.6
1947	h	I	S	H	V	G	I	Y	V	G	N		1196.7
1948	h	S	H	V	G	I	Y	V	G	N	G		1140.6

1949	h	H	V	G	I	Y	V	G	N	G	Q	1180.9
1950	h	V	G	I	Y	V	G	N	G	Q	M	1175.0
1951	h	G	I	Y	V	G	N	G	Q	M	I	1189.0
1952	h	I	Y	V	G	N	G	Q	M	I	N	1246.1
1953	h	Y	V	G	N	G	Q	M	I	N	A	1204.0
1954	h	V	G	N	G	Q	M	I	N	A	Q	1169.0
1955	h	G	N	G	Q	M	I	N	A	Q	D	1184.9
1956	R											174.2
1957	R											174.2
1958	R											174.2
1959	R											174.2
1960	h	N	G	Q	M	I	N	A	Q	D	N	1242.0
1961	h	G	Q	M	I	N	A	Q	D	N	G	1184.9
1962	h	Q	M	I	N	A	Q	D	N	G	V	1227.0
1963	h	M	I	N	A	Q	D	N	G	V	K	1227.0
1964	h	I	N	A	Q	D	N	G	V	K	Y	1258.9
1965	h	N	A	Q	D	N	G	V	K	Y	D	1260.8
1966	h	A	Q	D	N	G	V	K	Y	D	N	1260.8
1967	h	Q	D	N	G	V	K	Y	D	N	I	1302.9
1968	h	D	N	G	V	K	Y	D	N	I	H	1311.9
1969	h	N	G	V	K	Y	D	N	I	H	G	1253.9
1970	h	G	V	K	Y	D	N	I	H	G	A	1210.8
1971	h	V	K	Y	D	N	I	H	G	A	G	1210.8
1972	h	K	Y	D	N	I	H	G	A	G	W	1297.9
1973	h	Y	D	N	I	H	G	A	G	W	G	1226.8
1974	h	D	N	I	H	G	A	G	W	G	K	1191.8
1975	h	N	I	H	G	A	G	W	G	K	F	1223.9
1976	h	I	H	G	A	G	W	G	K	F	L	1222.9
1977	h	H	G	A	G	W	G	K	F	L	V	1208.9
1978	h	G	A	G	W	G	K	F	L	V	G	1128.8
1979	h	A	G	W	G	K	F	L	V	G	F	1218.9
1980	h	G	W	G	K	F	L	V	G	F	G	1204.9
1981	h	W	G	K	F	L	V	G	F	G	R	1304.0
1982	h	G	K	F	L	V	G	F	G	R	V	1216.9

9.2. Listeria P60 Aminosäuresequenz

```
EGD 1 MNMKKATIAAT-AGIAVTAFAPAFTIASASTVVVEAGDTLWGIAQSKGTTVD 50
Ga      «      Signalpeptid      »      i.....
Imm     «      Signalpeptid      »      ...+... +
Mack    .....-.....
In6b    .....-.....
Ivan     .....-.....D.....
Seel     .....-.....DN.....
Wels     .....-.....
Gray     .....VSAA.....SVV..N...AS.....SKT.....
Murr     .....VSA-.....SVV..N...AS.....SKT.....
```

```
EGD 51AIKKANNLTTDKIVPGQKLQVNNEVAAAEKTEKSVSATWLNVRSGAGVDN 100
Ga      .....i.....+.....
Imm     + .....++.....
Mack    .....T.....
In6b    .....-...TE..A.....H
Ivan     .L.....S.....IT-...-S.....T.....
Seel     .L....K.....T-...-S.....
Wels     .L.....S.....T-...-S.....
Gray     QL.QL.K.DS.R.....TIK-...-Q.V.....HAPDANE
Murr     QL.QL.K.DS.R.....TIK-...-Q.V.....HAPNANE
```

```
EGD 101 SIITSIKGGTKVTVETTESNGWHKITYNDGKTGFVNGKYLTDKAVSTPVA 150
Ga      . . . . .
Imm     . . . . .      +++++
Mack    .....
In6b    ..L.....Y.....T...V
Ivan     ..V..L.....S..A...Y..S.GE...Y.....G-TT.TSAP.
Seel     ..V..L.....S..A...N...GE...Y.....G-N..TSAPS
Wels     ..V..L.....AA...N...GE...Y.....G-..TSAPV
Gray     K.L..L..R.V.K..SS.A...N..SFDN...Y.....S.AK.AA..*
Murr     K.L..L..R.V.K..SS.A...N..SFDN...Y.....S.AK.AA..*
```

```
EGD 151 PTQEVKKETTTQ-QAAPAAETKTEVKQ-TTQATTPAPKVAETK-ETPVVDQNA 200
Ga      . .ii.i      iiii      iiii
Imm     . .+++..+++..      +++++.      .+++++++
Mack    .....-...V.....-.....-...I....
In6b    -K.....-.-VK..T.A.....P...Q.A...A...-A.....
Ivan     .--...E.....A.....P...-S.P..V-L.-...T...A..TT.
Seel     A.P...Q.E...--...QQ.....-A.P.A.TEKDAV...TTA.A..T..
Wels     AK...Q...K.-T.....-S.P.P.-...A...-TA...T..
Gray     ****.T.AV.HKAE.KV.A.STHA..*****.T..
Murr     ****.T.AV.HKAE.KV.A.STHA..*****.T..
```

```
EGD 201 TTHAVKSGDTIWALSVKYGVSVQDIMSWNNLSSSSIIYVGQKLAIKQTA-NT
Ga      .....w
Imm     .....+
Mack    .....-
In6b    ...N.....P...PT-K.
Ivan     S.YT.....S...T...N.....V..V..E.AK.
Seel     ...T.....A...L.....NI.V..S.AKN
Wels     ...T.....A...L.....I.V..S.AK.
Gray     S.YK.....P..KLIE.....TI.V.EA.AKA
Murr     S.YK.....P..KLIE.....TI.V.EA.AKA
```

EGD 251 ATPKAEVKTAPAAEKQ-AAPVVKENTNTNTATTEKKETATQQOTA-PKAPT 300
Ga i
Imm + i +
Mack -
In6b VA T Q - T A S A E T T
Ivan . S T VS Q * * A VTP . K N - TQ A
Seel TA A T S S T V T EK STT A
Wels . A V ETST * * V VT T NTT A
Gray . PTTVKQAAPAKV . P EVKQTAPAKQEQAAPAAKETVVKPAVSKPKAATPAP
Murr . PTTVKQAAPAKV . P EVKQTAPAKQEQAAPAAKETVVKPAVSKPKAATPAP

EGD 301 EAAKPAPAP/STNTNANKTNT 350
Ga / .
Imm / +++++ . + .
Mack / * *
In6b Q / KTN . TN . NTNASTPSKNTNTNTNTNT T
In6a / KTN . TN . NTNASTPSKNTNTNTNTNT T * *
Ivan Q / TA S . SNA . APT N . TS S . STPSK T . S . AS *
Seel Q / A T * * * A . APT N . TSSS STPSK . N . T . * *
Wels Q / T N . SNT . APT SN . N . SS STPSK T . T . * *
Gray TAKPAVEQK / - KPKTAAPAKPAVSKPATSTPAKVTPNTNTN . STPT V . N
Murr TAKPAVEQK / - KPKPAAPAKPAVSKPATSTPAKVTPNTNTN . STPT V . N

EGD 351 NSNTNAN--QGSSNNNSNSASAI IAEAQKHLGKAYSWGGNGPTTFDCSGYT 400
Ga /
Imm . + + + .
Mack - -
In6b . T T . TN T . * A L F .
In6a * * T . * A L F . S
Ivan * * S * * * TA SL F .
Seel * * S * S F .
Wels * * * SA L F .
Gray . TS * * S . * SA . F LY K P . T AR S F .
Murr . TS * * S . * SA . F LY K P . T AR S F .

EGD 401 KYVFAKAGISLPRTSQAQYASTTRISESQAKPGDLVFFDYGSGISHVGIY 450
Ga . s ii i
Imm . + ++ +
Mack
In6b S
Ivan S . VT S . K N . A
Seel S QS T KV E . Q A
Wels S S S A
Gray S NQV . L SGN . AT HSIK . K Q N K A
Murr S NQV . L SGN . AT NS . K K Q N A

EGD 451 VGNGQMINAQDNGVKYDNIHSGSWGKYL VGFGFRV*484
Ga
Imm
Mack *
In6b A F *
Ivan QF *
Seel Q *
Wels *
Gray I . G D SI Y . T *
Murr I . G D SI N Q *

Legende:

Ga: Bereiche die sich für gattungsspezifische Antikörper eignen:

„†“: immunogener Bereich, der die gesamte Gattung ohne *L. Grayi* (einschließlich *ssp. murray*) erkennt.

„i“: spezifisch für *L. monocytogenes* und *L. innocua* (ob Kreuzreaktionen mit den anderen Arten auftreten können wurde nicht untersucht)

„s“: spezifisch für alle Arten außer *L. Seeligeri* und *L. Grayi* (einschließlich *ssp. murray*)

“.”: relativ schwach positive Reaktion (wurde daher nicht weiter geprüft)

Imm: immunogener Bereich für *L. monocytogenes*

Insertion zwischen 309 und 310:

```
EGD 1 *****
Mack *****
In6b *****
In6a *****
Ivan AP--TVNTNASSYTVKSGDTLSKIATTFGTTVSKIKALNGLNSD-NLQVGQVLKVKGTVP
Seel AP--.....G...S.....T..-.....D.....
Wels APAP.....T.....S.....N....S.....N.T..-.....T.....
Gray VSTPA.D.S.AT.K.QN..S.G.IASL.KVS.ADLTNW.NK.ATSTIYA..E.S..ASAA
Murr ASTPA.D.S.AT.K.QN..S.G.IASL.KVS.ADLTNW.N..ATITIYA..E.S..ASAA
```

EGD: Wildtyp (X52268 nach GenBank Daten)

Mack: Mackaness (M80351, Serotyp)

In6a: *L. innocua* Sv6a (M80347)

Ivan: *L. ivanovii* (M80350)

Seel: *L. seeligeri* (M80353)

Wels: *L. welshimeri* (M80348)

Murr: *L. grayi* (M95579)

Punkte entsprechen identischen Aminosäuren, Bindestriche -> Lücken (um der Homologie gerecht zu werden) und Sterne stehen für Deletionsbereiche.

201 TTHAVKSGDTIWALSVKYGVSVQDIMSWNNLSSSSIIYVGQKLAIKQTANTATPKAEVKTAPAAEKQAAPVVKENTNTNTATTEKKETATQQQTAPKAPT

In6b N P PTK VA T Q T A S A E TT

EGDIY

INOIY

EGDK

INOK

Kan

Spe

Zie

EGDM

EGDP

INOM

INOP

H1

H2

H3

H4

H5

M1

M2

M3

M4

M5

M6

EGD 201 TTHAVKSGDTIWALSVKYGVSVQDIMSWNNLSSSSIIYVGQKLAIKQTA-NTATPKAEVKTAPAAEKQ-AAPVVKENTNTNTATTEKKETATQQQTA-PKAPT

Mack

In6b

Ivan

Seel

Wels

Gray

301 EAAKPAPAPSTNTNANKTNTNTNTNTNTNTNTNTNTNTNSKNTNTNSNTNTNTNSNTNAN--QGSSNNNSNSSASAI IAEAQKHLGKAYSWGNGPPTTFDCSGYT 400

In6b Q KTN TN NTNASTPSKNTNTNTNT T T TN T *** A L F

EGDIY

INOIY

EGDK

INOK

Kan

Spe

EGDM

EGDP

INOM

INOP

H1

H2

H3

H4

H5

M1

M2

M3

M4

M5

M6

EGD 301 EAAKPAPAP/STNTNANKTNTNTNTNTNTNTNTNTNTNTNSKNTNTNSNTNTNTNSNTNAN--QGSSNNNSNSSASAI IAEAQKHLGKAYSWGNGPPTTFDCSGYT

Mack

In6b

In6a

Ivan

Seel

Wels

Gray

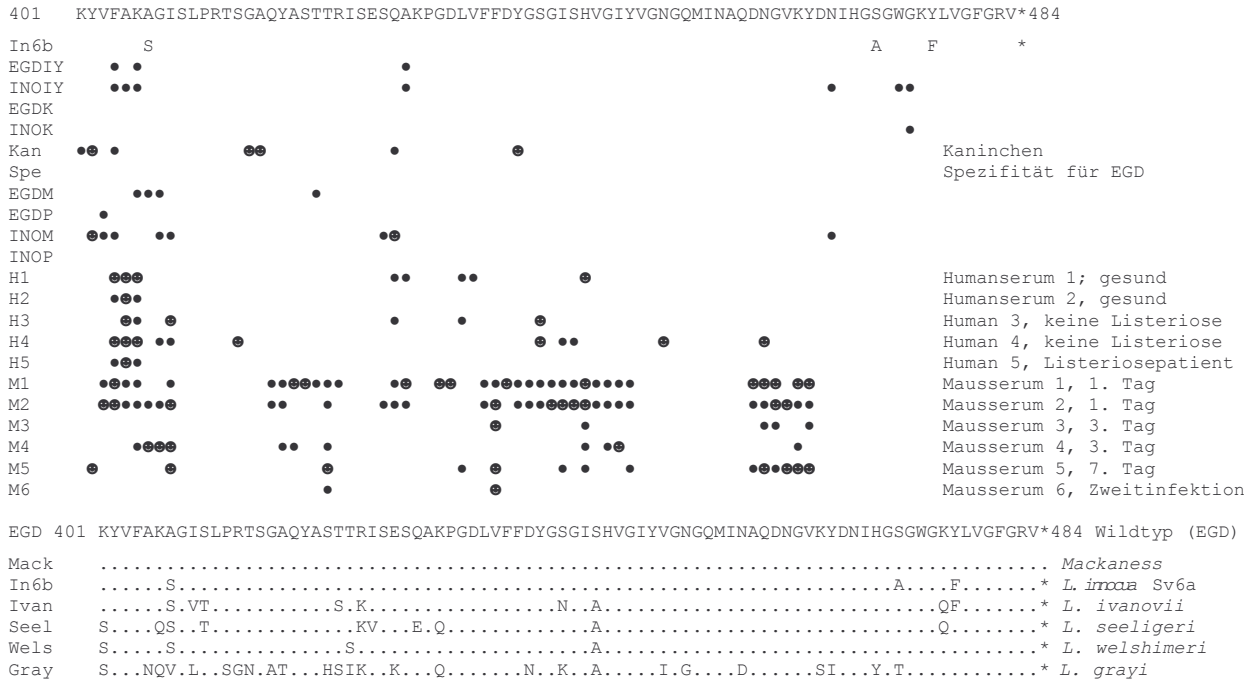


Abb. 50: Vergleich der Reaktivität aller Seren mit LM-P60. unter den Ergebnissen sind jeweils die Abweichungen der P60-Aminosäuresequenzen gegenüber der *L. monocytogenes*-Sequenz im Ein-Buchstabencode dargestellt. Die Buchstaben markieren immer die erste Aminosäure eines Dekapeptids der dazugehörige Aminosäuresequenz. Sterne ("*") stehen für Deletionsbereiche. Angegeben sind stark ("••") bzw. gut ("•") immunogener Bereiche. KA bzw. ZI steht für Kaninchen bzw. Ziege α-P60-Serum, während H1 bis 5 die Humansen und M1 bis M6 die Mausseren repräsentiert. Die von Bubert et al. (Bubert, A. et al. 1992b) 1992 mittels Epitopmapping untersuchten Bereiche "◇") wurden erst zuletzt zur Kontrolle synthetisiert. Daher liegen für diese Bereiche keine Ergebnisse für die Humansen vor. Herausgenommen wurde die Insertion, zwischen 309 und 310, da sie bei *L. monocytogenes* nicht vorkommt.

Mausseren			Humansen		
M1	PK 4	1. Tag nach Infektion mit <i>L. monocytogenes</i>	Spe	"\$"=Spezifität	<i>L. monocytogenes</i>
M2	PK 5	1. Tag nach Infektion mit <i>L. monocytogenes</i>	H1	AB	gesund
M3	P 4	3 Tage nach der Infektion mit <i>L. monocytogenes</i>	H2	GL	gesund
M4	P 5	3 Tage nach der Infektion mit <i>L. monocytogenes</i>	H3	76 C	keine Listeriose
M5	K 4	7. Tag nach der Infektion mit <i>L. monocytogenes</i>	H4	Großhadern	keine Listeriose
M6	B 4	nach 4 Wochen Belastungsinfektion 3. Tag	H5	Kinderserum	Patient mit Listeriose

••	++	stark immunogener Bereich	größte Intensität
•	+	gut immunogener Bereich	sehr intensiv

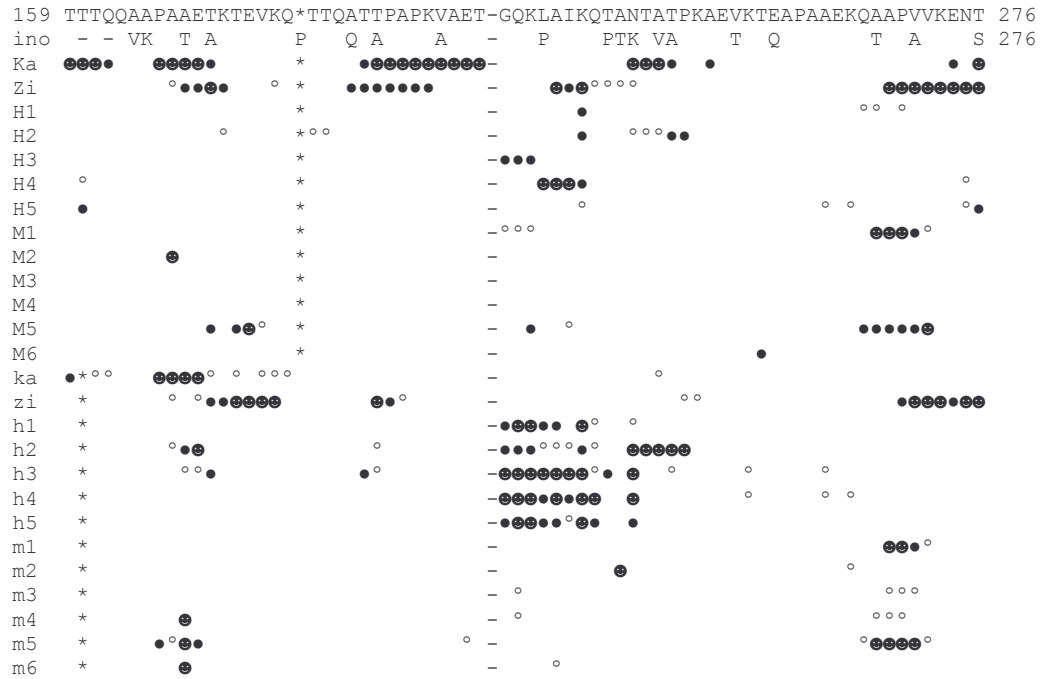


Abb. 51: Vergleich der Reaktivität aller Seren mit *L. monocytogenes*- und *L. innocua* -P60. Der Abschnitt von 191 bis 239 ("-") wurde ursprünglich ausgespart, da er bereits in einer vorhergehenden Arbeit untersucht worden war (Bubert et al. 1992). Die Ergebnisse aus den Versuchen mit Im-P60 sind in den Zeilen, die mit Großbuchstaben beginnen (KA, ZI, H und M), angegeben. Die Kleinbuchstaben zeigen die Ergebnisse die mit *L. innocua* erhalten wurden. Sterne ("*") stehen für Deletionsbereiche. Die Buchstaben in der ersten Zeile markieren immer die erste Aminosäure (im Ein-Buchstabencode) eines Dekapeptids der dazugehörige Aminosäuresequenz. Angegeben sind stark ("●") bzw. gut ("○"), sowie wenig ("○") immunogenen Bereiche. Die Numerierung bezieht sich auf *L. monocytogenes* -P60 beginnend mit der ersten Aminosäure des Signalpeptids. Die Buchstaben markieren immer die erste Aminosäure (im Ein-Buchstabencode) eines Dekapeptids.

CURRICULUM VITAE**Persönliche Daten**

Name: **Mio Lalic-Mülthaler**
 Geburtsdatum: 27. Januar 1969
 Geburtsort: Rosenheim/Obb.

nach dem Studium

Okt./2001 – Okt. 2003 Wissenschaftler (Molekularbiologe) in der F&E-Abteilung des Bio-tech Start-up Unternehmens nanotype GmbH, Lochhammer Schlag 12, 82166 Gräfelfing

April/2000 – Sept./2001 Elternzeit

Studium

März/1996 – März/2000 Promotion am LS f. Mikrobiologie der Uni. Würzburg (bei Prof. Dr. W. Goebel) Titel: Molekularbiologischer Nachweis und Immunologie des P60-Proteins, sowie *in vitro*-Transkription PrfA-abhängiger bzw. -unabhängiger Gene von *Listeria monocytogenes*

22. Januar 1996 Diplom - Biologie

Okt./1989 – Nov./1995 Biologie an der Julius-Maximilians-Universität

Wehrdienst

Sep./1988 – Sep./1989 Wehrdienst in Mazedonien als Führungsoffizier (Pionier)

Schulbildung

Juni/1988 Abitur

Sep./1978 – Juni/1988 Finsterwaldergymnasium in Rosenheim

Sep./1974 – Juli/1978 Grundschule an der Königsstraße in Rosenheim

Die experimentellen Arbeiten wurden von März 1996 bis März 2000 unter Anleitung von Dr. Andreas Bubert, Dr. Jutta Bohne und Prof. Dr. Werner Goebel am Lehrstuhl für Mikrobiologie (Theodor-Boveri-Institut) der Julius-Maximilians-Universität Würzburg durchgeführt.

Danke !

Bedanken möchte ich mich bei

Dr. Andreas Bubert und Dr. Jutta Bohne, die durch anregende Diskussionen und praktische Ratschläge wesentlich zur Durchführung der Arbeit beigetragen haben

Prof. Dr. Werner Goebel für die Bereitstellung des interessanten Themas, sein großes Interesse, die Betreuung und Unterstützung bei dieser Arbeit.

allen Forschern des Labors C 238 für stete Kooperationsbereitschaft

allen Mitarbeitern des Lehrstuhls für Mikrobiologie für die gute Zusammenarbeit

allen Kooperationspartnern, insbesondere Prof. Dieter Palm und Dr. Gernot Geginat, die alle großen Anteil am Gelingen dieser Arbeit hatten. Aber auch ganz herzlich bei Prof. Dr. Hof und Dr. Maiwald u.a. für die Bereitstellung humaner und muriner *L. monocytogenes*-Antiseren.

Dr. Birgit Bubert, Marion Dietrich, Eva Kleinwort und AMA Mülthaler für die Überlassung ihrer Muttermilch.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Frau AMA und meinem Sohn Amarin, sowie Dunja Lamatsch und Neville Moriabadi für die große Unterstützung und stete Aufmunterung.

Mio Lalic-Mülthaler