
Bayerische Julius-Maximilians-Universität Würzburg
Fakultät für Biologie
Lehrstuhl für Mikrobiologie

**Untersuchungen zur Rolle des
Phosphoproteins Stathmin in *Listeria
monocytogenes*-infizierten Säugerzellen
und
Molekulare Charakterisierung der listeriellen
Zweikomponentensysteme**

Dissertation

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

vorgelegt von

Tatjana Williams

aus Zell

Würzburg, 2005

Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. U. Scheer

1. Gutachter: PD Dr. Michael Kuhn

2. Gutachter: Prof. Dr. Georg Krohne

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Die vorliegende Arbeit wurde von Juni 2001 – Oktober 2004 am Lehrstuhl für Mikrobiologie der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität in Würzburg unter der Leitung von Herrn PD Dr. M. Kuhn angefertigt.

Ich versichere, dass die vorliegende Arbeit nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt und von mir selbständig durchgeführt und verfasst wurde. Neben dem akademischen Grad "Diplom-Biologin Univ." habe ich keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht. Diese Dissertation hat weder in gleicher, noch in ähnlicher Form in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen.

Würzburg, den

Vielen Dank...

In erster Linie meinem Betreuer Herrn PD Dr. Michael Kuhn für die Betreuung, Unterstützung und konstruktiven Diskussionen während dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Krohne danke ich für die Hilfe bei den elektronenmikroskopischen Aufnahmen und für die Übernahme der Zweitkorrektur.

Vielen Dank auch an Herrn Prof. Dr. Goebel für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes.

Bedanken möchte ich mich auch bei dem Sonderforschungsbereich SFB 479, dem Kompetenznetzwerk "PathoGenoMik" und dem Hochschulwissenschaftsprogramm "Chancengleichheit für Frauen in Forschung und Lehre" für die finanzielle Unterstützung.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Frau Susanne Bauer für ihre unerschöpfliche Hilfsbereitschaft und Unterstützung, die gute Zusammenarbeit und das sehr angenehme Arbeitsklima.

Vielen Dank auch an Frau Dr. Andrea Spory und Frau PD Dr. Dagmar Beier für ihre Hilfe bei diversen Experimenten und die vielen guten Ratschläge bei experimentellen Problemen. Ein Dankeschön auch an Frau Dr. U. Rdest für die freundliche Aufnahme im Labor. Herrn Dr. Biju Joseph und Barbara Gareiß vielen Dank für die Hilfe bei den Mikroarray-Analysen.

Ebenso ein herzliches Dankeschön an alle MitarbeiterInnen des Lehrstuhls, mit denen ich Tag für Tag gearbeitet habe.

Ein mehr als großes "Danke" geht an Alexa Frentzen, die mir nicht nur als Arbeitskollegin, sondern auch als wahre Freundin in guten wie in schlechten Zeiten mit Geduld, Humor und Energie zur Seite stand. Herrn Timo Hoppe danke ich für die Rund-um-die-Uhr-Betreuung bei Computerproblemen aller Art.

Der größte Dank gilt meinen Großeltern, Gisela und Adolf Winter, und meinen Eltern, Anneliese und Charles Williams, die mich in allen Bereichen unterstützt haben und dadurch wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Und schließlich danke ich Thomas. Für seine Liebe, sein Verständnis und seine Unterstützung bei allen Plänen und Entscheidungen.

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
	Summary	3
2	Einleitung	5
2.1	Allgemeine Charakterisierung des Genus <i>Listeria monocytogenes</i>	5
2.1.1	Pathogenese.....	6
2.1.2	Der intrazelluläre Lebenszyklus.....	7
2.1.3	Die Virulenzfaktoren.....	8
2.2	ActA.....	12
2.3	LaXp180.....	16
2.3	Stathmin.....	19
2.5	Bakterielle Zweikomponentensysteme.....	22
2.6	Zweikomponentensysteme von <i>L. monocytogenes</i>	24
2.7	Motilität und Flagellensynthese.....	27
2.8	Zielsetzung der Arbeit.....	29
3	Material	31
3.1	Bakterienstämme.....	31
3.2	Plasmide.....	31
3.3	Zelllinien.....	32
3.4	Oligonukleotide für PCR.....	32
3.5	Primäre und sekundäre Antikörper.....	34
3.6	Chemikalien, Enzyme und Antibiotika.....	35
3.7	Molekulargewichtsstandards.....	36
3.8	Allgemeine Puffer und Lösungen.....	37
3.9	Spezielle Puffer und Lösungen.....	38
3.9.1	Medien und Agarplatten für Bakterienkultur.....	38
3.9.2	Medien und Puffer für eukaryotische Zellen.....	38
3.9.3	Puffer und Lösungen für SDS-Polyacrylamidgele (SDS-PAGE).....	39
3.9.4	Puffer für Westernblot und Chloronaphtholentwicklung.....	40
3.9.5	Puffer und Lösungen für Proteinfärbungen.....	40
3.9.6	Puffer und Lösungen für die 2D Gelelektrophorese.....	41
3.9.7	Puffer und Lösungen für die Mikroarray-Technologie.....	42
3.10	Versuchstiere.....	43
3.11	Verbrauchsmaterial.....	43
3.12	Gebrauchsfertige Kits.....	43
3.13	Geräte.....	44

4	Methoden	46
4.1	Arbeiten mit Bakterien.....	46
4.1.1	Herstellung von Glycerinkulturen.....	46
4.1.2	Lebendzellzahlbestimmung von Listerien.....	46
4.1.3	Wachstum bei 20° C, 37° C und 43° C.....	46
4.1.4	Wachstum unter Stressbedingungen.....	46
4.1.5	Wachstum unter anaeroben Bedingungen.....	47
4.1.6	Motilitätstest.....	47
4.1.7	Hämolysestest.....	47
4.1.8	Antibiotikasensitivitätstest.....	47
4.1.9	Triton-X-100 Sensitivitäts-Test.....	47
4.1.10	Negativkontrast-Präparate für die Elektronenmikroskopie.....	48
4.2	Zellkultur mit eukaryotischen Zellen.....	48
4.2.1	Kultivieren und Passagieren adhärenter J774 Makrophagen	48
4.2.2	Trypsinisieren von Cos-1 und Caco-2 Zellen.....	48
4.2.3	Kultivieren von L929-Fibroblasten zur Gewinnung von L929- konditioniertem Medium.....	48
4.2.4	Bestimmung der Lebendzellzahl.....	49
4.2.5	Auftauen und Einfrieren von Zellen.....	49
4.3	Zellarretierung und Synchronisierung.....	49
4.3.1	G ₀ /G ₁ -Synchronisierung durch Serumentzug.....	50
4.3.2	Arretierung in der S-Phase durch einen Doppel-Thymidin- Block.....	50
4.3.3	Propidiumiodid-Färbung.....	51
4.4	Infektion von Säugerzellen mit Listerien.....	51
4.4.1	Invasionstest.....	52
4.4.2	Replikationstest.....	52
4.4.3	Überwachung einer <i>Listeria</i> -Infektion mittels GFP.....	52
4.5	Färbung von infizierten Gewebekulturzellen.....	53
4.5.1	Färbung von Zellen mit Giemsa.....	53
4.5.2	Färbung von Zellen mit FITC-Phalloidin.....	53
4.5.3	Immunfluoreszenzfärbung mit dem anti-Stathmin-Antikörper	54
4.5.4	Immunfluoreszenzfärbung mit dem anti-Tubulin-Antikörper...	54
4.6	Arbeiten mit Mäusen.....	54
4.6.1	Haltung und Zucht von Stathmin knock-out Mäusen.....	55
4.6.2	Genotypisierung von Mäusen.....	55
4.6.3	Infektion von Mäusen mit <i>L. monocytogenes</i>	55
4.6.4	Isolierung von Listerien aus Milz und Leber.....	56
4.6.5	Isolierung primärer Knochenmarksmakrophagen.....	56
4.6.6	Isolierung von Gesamtzellprotein aus Leber und Milz.....	57
4.7	Molekularbiologische Methoden.....	57
4.7.1	Isolierung chromosomaler DNA aus Listerien.....	57
4.7.2	Plasmidisolierung im kleinen Maßstab -"Minipräp".....	58
4.7.3	Plasmidisolierung im mittleren Maßstab -"Midipräp".....	58
4.7.4	Isolierung von RNA aus Listerien.....	58
4.7.5	Konzentrationsbestimmung von DNA.....	59
4.7.6	Konzentrationsbestimmung von RNA.....	59
4.7.7	Polymerase Kettenreaktion.....	59
4.7.8	Reinigung von PCR-Produkten und Abtrennung von Restriktionsfragmenten.....	60

4.7.9	Reamplifikation von PCR-Produkten.....	60
4.7.10	Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen.....	60
4.7.11	Dephosphorylierung linearer DNA.....	61
4.7.12	Ligation von DNA Fragmenten.....	62
4.7.13	Elektrophoretische Auftrennung von DNA in Agarose- Gelen.....	62
4.8	Transformation.....	63
4.8.1	Herstellung elektrokompetenter <i>E. coli</i>	63
4.8.2	Elektroporation in <i>E. coli</i>	63
4.8.3	Herstellung elektrokompetenter Listerien.....	63
4.8.4	Elektroporation in Listerien.....	63
4.9	Konstruktion von <i>L. monocytogenes</i> EGD Δ TCS RR- Mutanten.....	64
4.10	Proteinanalytische Methoden.....	66
4.10.1	Isolierung bakterieller Proteine für die SDS-PAGE.....	66
4.10.2	Bestimmung der Proteinkonzentration mit dem "Bio-Rad Assay".....	66
4.10.3	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	66
4.10.4	Westernblot.....	67
4.10.5	Färbung eines PAA-Gels mit kolloidalem Coomassie.....	68
4.10.6	Färbung eines PAA-Gels mit Silbernitrat.....	68
4.11	Zweidimensionale Gelelektrophorese 2DGE.....	68
4.11.1	Präparation zellulärer Proteine für die 2DGE.....	69
4.11.2	Präparation von Überstandsproteinen für die 2DGE.....	69
4.11.3	Auftrennung der Proteine in der ersten Dimension.....	70
4.11.4	Herstellung der PAA-Gele für die 2DGE.....	71
4.11.5	Auftrennung der Proteine in der zweiten Dimension.....	71
4.12	Analyse des Transkriptomts mittels Mikroarray-Technologie	71
4.12.1	Herstellung der Sonden, RT-PCR und Prähybridisierung der Objekträger.....	72
4.12.2	Hybridisierung der Proben mit den Objekträgern.....	73
5	Ergebnisse.....	74
5.1	Untersuchungen zur Rolle von Stathmin bei einer Infektion mit <i>L. monocytogenes</i>	74
5.1.1	Vorarbeiten.....	74
5.1.2	Arretierung von Kulturzellen in verschiedenen Phasen des Zellzyklus.....	74
5.1.3	Infektion synchronisierter Cos-1 Fibroblasten mit <i>L. mono- cytogenes</i>	76
5.1.4	Immunfluoreszenzanalyse mit einem anti-Tubulin-Antikörper	76
5.1.5	Genotypisierung von Stathmin knock-out Mäusen mittels PCR.....	80
5.1.6	Isolierung und Infektion primärer Knochenmarksmakro- phagen (BMM Φ) mit <i>L. monocytogenes</i> EGD.....	82
5.1.6.1	Untersuchung des Einflusses von Stathmin auf die phago- zytische Aktivität der BMM Φ	83
5.1.6.2	Einfluss von Stathmin auf das Überleben und Replizieren von <i>L. monocytogenes</i> im Zytoplasma der BMM Φ	84
5.1.6.3	Immunfluoreszenzanalysen infizierter BMM Φ mit einem anti-	

	Stathmin-Antikörper.....	85
5.1.7	Untersuchung des Einflusses von Stathmin auf die Kolonisierungsfähigkeit von <i>L. monocytogenes</i> im Maus-Modell.....	87
5.1.8	Intrazelluläres Verhalten von <i>L. monocytogenes</i> Δ actAPRR2/3 nach Infektion verschiedener Zelllinien.....	88
5.1.8.1	Invasion von <i>L. monocytogenes</i> Δ actAPRR2/3 in verschiedene Wirtszellen.....	89
5.1.8.2	Replikation und Überleben von <i>L. monocytogenes</i> Δ actAPRR2/3 im Zytoplasma von Fibroblasten.....	90
5.1.8.3	Intra- und interzelluläre Bewegung von <i>L. monocytogenes</i> Δ actAPRR2/3.....	92
5.1.9	Immunfluoreszenzanalysen zur Untersuchung der Interaktion von Stathmin und intrazellulären Listerien.....	94
5.2	Konstruktion und Charakterisierung von listeriellen Mutanten mit in frame Deletionen in individuellen Response Regulatorgenen.....	98
5.2.1	<i>In silico</i> Analyse der Zweikomponentensysteme von <i>L. monocytogenes</i>	98
5.2.2	Konstruktion von Deletionsmutanten der Response Regulatorgene in <i>L. monocytogenes</i> EGD.....	99
5.2.3	Untersuchungen zur Replikation der <i>L. monocytogenes</i> Δ TCS RR-Mutanten in BHI-Medium unter verschiedenen Bedingungen.....	101
5.2.4	Antibiotikasensitivitätstest.....	103
5.2.5	Motilitätstest der <i>L. monocytogenes</i> Δ TCS RR-Mutanten auf Weichagar.....	105
5.2.6	Elektronenmikroskopische Analyse von <i>L. monocytogenes</i> EGD, Δ degU und <i>L. monocytogenes</i> Δ cheY.....	106
5.2.7	Nachweis der Expression verschiedener Virulenzfaktoren in <i>L. monocytogenes</i> Δ TCS RR-Mutanten.....	107
5.2.8	Untersuchungen zum intrazellulären Verhalten der <i>L. monocytogenes</i> Δ TCS RR-Mutanten nach Infektion verschiedener Zelllinien.....	109
5.2.8.1	Invasionsverhalten der <i>L. monocytogenes</i> Δ TCS RR-Mutanten.....	109
5.2.8.2	Replikation der <i>L. monocytogenes</i> Δ TCS RR-Mutanten im Zytoplasma von Makrophagen.....	111
5.2.8.3	Intra- und interzelluläre Bewegung von <i>L. monocytogenes</i> Δ TCS RR-Mutanten.....	113
5.2.9	Infektion von BALB/c Mäusen mit <i>L. monocytogenes</i> Δ TCS RR-Mutanten.....	115
5.2.10	Vergleichende Proteomanalyse mittels 2D-Gelelektrophorese.....	116
5.2.10.1	Proteinmuster zellulärer Proteine aus <i>L. monocytogenes</i> EGD und <i>L. monocytogenes</i> Δ degU.....	116
5.2.10.2	Proteinmuster der Überstandsproteine aus <i>L. monocytogenes</i> EGD und <i>L. monocytogenes</i> Δ degU.....	119
5.2.11	Identifizierung von Zielgenen des Response Regulators DegU mittels Transkriptomanalyse.....	125

6	Diskussion	130
6.1	Untersuchungen zur Rolle von Stathmin bei einer Infektion mit <i>L. monocytogenes</i>	130
6.2	Konstruktion und Charakterisierung von <i>L. monocytogenes</i> Mutanten mit in frame Deletionen in individuellen Response Regulatorgenen.....	136
7	Literaturverzeichnis	148
8	Anhang	169
8.1	Nukleotidsequenzen der individuellen Response Regulatorgene von <i>L. monocytogenes</i> EGDe.....	169
8.2	Tabellarische Darstellung der bei 24° C durch DegU regulierten Gene.....	198
8.3	Abkürzungen.....	202
8.4	Publikationen.....	204
8.5	Lebenslauf.....	205

1 Zusammenfassung

Das fakultativ intrazelluläre Bakterium *Listeria monocytogenes* besitzt die Fähigkeit, eukaryotische Wirtszellen zu penetrieren, sich in diesen zu vermehren, fortzubewegen und zwischen den Zellen auszubreiten. Im Zuge des intrazellulären Lebenszyklus gehen Listerien Wechselwirkungen mit verschiedenen zellulären Proteinen ein. Als eines dieser Proteine konnte das zelluläre Phosphoprotein Stathmin identifiziert werden. Dieses Protein bindet an Untereinheiten des Tubulins und destabilisiert dadurch Mikrotubuli (MT). Es wird durch Phosphorylierung von vier spezifischen Serinresten in seiner MT-destabilisierenden Aktivität reguliert. Da Stathmin als Antwort auf externe Signale zelluläre Funktionen, z. B. Zell-Proliferation und Differenzierung reguliert, vermutet man seine Funktion in einer Art Relais welches verschiedene Signale aus dem Umfeld der Zelle integriert. In mit *L. monocytogenes* infizierten Wirtszellen wird Stathmin an die Oberfläche intrazellulärer Bakterien rekrutiert. Inwiefern diese Rekrutierung das Phosphorylierungsmuster von Stathmin und damit dessen Aktivität beeinflusst, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden. Unbekannt bleibt ebenfalls, ob an die Oberfläche der Listerien rekrutiertes Stathmin lokal das Mikrotubuligerüst der Wirtszelle depolymerisieren kann und somit die intra- und interzelluläre Fortbewegung der Bakterien begünstigt.

Stathmin knock-out Mäuse sollten sich gut eignen, um die Rolle von Stathmin während einer Infektion mit *L. monocytogenes* EGD *in vitro* und *in vivo* zu untersuchen. Es stellte sich heraus, dass in Stathmin^(-/-)-Makrophagen der intrazelluläre Lebenszyklus der Listerien nicht signifikant beeinflusst ist. Nach intravenöser Verabreichung von 5×10^3 *L. monocytogenes* waren drei Tage nach der Infektion in Leber und Milz der knock-out Mäuse allerdings signifikant mehr Listerien nachzuweisen, als in den Organen wildtypischer Mäuse.

Mittels Immunfluoreszenzmikroskopie und einem anti-Stathmin-Antiserum konnte an mit verschiedenen *L. monocytogenes*-Mutanten infizierten Zellen gezeigt werden, dass Stathmin mit der Oberfläche intrazellulärer Listerien kolokalisiert. Allerdings konnten dabei die Angaben in der Literatur nicht bestätigt werden, wonach für diese Kolokalisation die Expression von ActA notwendig ist. Die Ergebnisse dieser Arbeit sprechen im Gegensatz zu den publizierten Daten dafür, dass Stathmin über einen bisher noch unbekanntem Mechanismus ActA-unabhängig an intrazelluläre Listerien rekrutiert wird.

Zweikomponentensysteme ermöglichen Bakterien eine rasche Anpassung an sich verändernde Umweltbedingungen, da sie extra- und intrazelluläre Stimuli in zelluläre Signale umwandeln. Um die 16 in der Genomsequenz von *L. monocytogenes* EGDe identifizierten Zweikomponentensysteme charakterisieren zu können, wurden mittels Allelaustausch-Mutagenese individuelle Mutanten konstruiert, in denen die Gene für jeweils einen Response Regulator deletiert sind. Auf diese Weise wurden fünfzehn in frame Deletionsmutanten hergestellt. Lediglich das zu einem essentiellen Response Regulatorgen homologe Gen *yycG* (*Imo0287*) konnte nicht deletiert werden. Die erhaltenen Mutanten wurden *in vitro* und *in vivo* auf ihr Wachstumsverhalten hin untersucht. Es zeigte sich, dass unter den angewandten Kultur- und Versuchsbedingungen keines der

Zweikomponentensysteme eine signifikante Rolle bei der Anpassung an Temperatur, sowie an oxidativen oder osmotischen Stress spielt. Die Zugabe von 5 % Ethanol hatte einen stark hemmenden Effekt auf das Wachstum der *L. monocytogenes* $\Delta degU$ Mutante. Drei weitere Mutanten, *L. monocytogenes* $\Delta resD$, $\Delta phoP$ und *L. monocytogenes* $\Delta 1745$, waren ebenfalls deutlich in ihrem Wachstum beeinträchtigt, wohingegen *L. monocytogenes* $\Delta cesR$ und *L. monocytogenes* $\Delta lisR$ in Gegenwart des Alkohols deutlich besser wuchsen. Unter anaeroben Bedingungen konnte zwischen wildtypischen Listerien und den individuellen Mutanten kein Unterschied im Wachstum beobachtet werden.

Die Expression der fünf wichtigen Virulenzgene *hly*, *plcB*, *inlA*, *inlB* und *actA* war in keiner der untersuchten Mutanten im Vergleich zum Ausgangsstamm verändert. Die intrazelluläre Replikation sowie intrazelluläre Bewegung und Ausbreitung im Zellrasen waren durch die Deletion der Response Regulator-gene nicht beeinträchtigt. Abgesehen von geringen Unterschieden in der Invasivität einiger Deletionsmutanten für Cos-1 (*L. monocytogenes* $\Delta cheY$, $\Delta 1022$, $\Delta degU$, $\Delta lisR$, $\Delta 1507$) und Caco-2 Zellen (*L. monocytogenes* $\Delta agrA$, $\Delta lisR$) zeigte sich keiner der Response Regulatoren für den intrazellulären Lebenszyklus von *L. monocytogenes* erforderlich.

Es zeigte sich, dass der in der vorliegenden Arbeit verwendete *L. monocytogenes*-Wildstamm auch bei der für die Flagellenexpression normalerweise nicht-permissiven Temperatur von 37° C noch beweglich ist. Die *L. monocytogenes* $\Delta degU$ -Mutante war dagegen auf Weichagar temperaturunabhängig unbeweglich. Die elektronenmikroskopische Analyse ergab, dass dieser Stamm im Gegensatz zum Wildtyp auch bei 24° C keine Flagellen ausbildet. Durch vergleichende Proteomanalysen konnte gezeigt werden, dass *L. monocytogenes* $\Delta degU$ bei 24° C wesentliche Proteine des Flagellenapparates nicht synthetisiert. Mittels Transkriptomanalysen konnten die Ergebnisse der Proteomanalysen bestätigt werden. Es wurden neben Genen, die für Proteine der Flagellenbiosynthese und Chemotaxis codieren, noch weitere Gene identifiziert, die offensichtlich unter der transkriptionellen Kontrolle des Response Regulators DegU stehen.

Die Ergebnisse der *in vivo* Studien zeigten, dass nur für *L. monocytogenes* $\Delta degU$ eine deutliche Virulenzattenuation zu beobachten war. Es waren signifikant weniger Bakterien dieses Stammes in Milz und Leber infizierter Tiere nachzuweisen, als nach der Infektion mit dem wildtypischen Stamm *L. monocytogenes* EGD. Für die restlichen *L. monocytogenes* ΔTCS -Mutanten waren im Vergleich zum Wildtyp die Unterschiede in Leber und Milz nur leicht verändert und statistisch nicht signifikant.

Summary

The facultative intracellular pathogen *Listeria monocytogenes* is able to penetrate eukaryotic host cells, to multiply and move intracellularly and to spread between the cells. In the course of the intracellular lifecycle the listeriae interact with different cellular proteins. The cellular phosphoprotein stathmin was identified as one of these proteins. This protein binds to the tubulin subunits thereby destabilizing microtubules. It is regulated in its microtubule-destabilizing activity via phosphorylation of four specific serine residues. Since stathmin regulates cellular functions, i. e. cell proliferation and differentiation, its function is presumed in acting as a type of relay integrating different signals of the cell's environment. In *L. monocytogenes* infected host cells stathmin is recruited to the bacterial cell surface. Whether and to which extent this recruitment influences the phosphorylation pattern of stathmin and thereby its activity, could not be identified during this work. It is also still unclear, whether the recruited stathmin molecules can locally induce the depolymerization of the microtubule network hence favouring bacterial inter- and intracellular motility.

Stathmin knock-out mice should be valuable for experimentally testing the influence of stathmin in an infection with *L. monocytogenes* *in vitro* and *in vivo*. It appeared that the listerial intracellular lifecycle is not significantly influenced in stathmin^(-/-) macrophages. However, three days after intravenous application of 5×10^3 *L. monocytogenes* EGD the bacterial load in liver and spleen of stathmin knock-out mice was significantly higher than in organs of wildtype mice. By means of immunofluorescence microscopy with an anti-stathmin antiserum it could be revealed that within infected cells stathmin colocalizes with the listerial cell surface. Data from the literature, however, suggesting that this recruitment of stathmin is dependent upon the expression of ActA, could not be confirmed implicating stathmin to be recruited in an up to now unknown ActA-independent manner.

Two-component systems enable bacteria to efficiently adapt to changes in the environment by converting extra- and intracellular signals into cellular responses. In order to characterize the 16 identified two-component systems of *L. monocytogenes* EGD_e in detail individual mutants with deletions in each one of the response regulator genes were constructed. With the used two step integration/excision procedure 15 in frame deletion mutants were yielded. It was yet alone for *yycG* (*Imo0287*), a homologue to an essential response regulator gene, that a deletion mutant could not be obtained. The growth characteristics of the mutants were examined in *in vitro* and *in vivo* experiments. It appeared that under the culture and test conditions applied, neither one of the TCS plays a role for adapting to temperature, as well as oxidative or osmotic stress. The addition of 5 % ethanol severely impaired growth of *L. monocytogenes* Δ *resD*, Δ *phoP*, and *L. monocytogenes* Δ 1745, whereas growth of *L. monocytogenes* Δ *cesR* and *L. monocytogenes* Δ *lisR* was enhanced. The Δ *degU* mutant did not grow at all in the presence of the alcohol. No difference in growth between wildtype listeriae and the individual mutants was observed when the cells were grown anaerobically.

Expression of the five important virulence factor genes *hly*, *plcB*, *inA*, *inlB* and *actA* was not altered in the mutants tested compared to the wildtype strain. Intracellular replication as well as intracellular movement and spreading was not affected by either one of the response regulator gene deletions. Despite a slightly reduced invasiveness of a few deletion mutants for Cos-1 (*L. monocytogenes* $\Delta cheY$, $\Delta degU$, $\Delta 1022$, $\Delta lisR$, $\Delta 1507$) and Caco-2 cells (*L. monocytogenes* $\Delta agrA$, $\Delta lisR$) none of the response regulators appeared to be necessary for the intracellular lifecycle of *L. monocytogenes*.

The wildtype strain used throughout this work proved to be motile even at 37° C, a temperature usually non-permissive for flagellin expression. In contrast, the *L. monocytogenes* $\Delta degU$ mutant displayed a non-motile phenotype on semisolid agar irrespective of the temperature applied. Electron microscopical analysis demonstrated that, unlike the wildtype strain EGD, this deletion mutant did not produce flagella, not even at 24° C. Comparative proteomics revealed that at 24° C *L. monocytogenes* $\Delta degU$ did not produce the major components of the flagella apparatus. The results of transcriptome analysis were in line with the results of the proteome analysis and, aside of genes for flagella biosynthesis and chemotaxis, identified other genes obviously under transcriptional regulation by DegU.

In vivo studies revealed that only *L. monocytogenes* $\Delta degU$ showed a conspicuous virulence attenuation. There were significantly less bacteria in liver and spleen compared to an infection with the wildtype strain *L. monocytogenes* EGD. For the other *L. monocytogenes* ΔTCS -mutants the difference of bacterial counts in liver and spleen compared to the wildtype was slightly altered but not statistically significant.

2 Einleitung

2.1 Allgemeine Charakterisierung des Genus *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes, früher als *Listerella* oder *Corynebacterium infantisepticum* bezeichnet, ist die einzige für den Menschen pathogene Spezies des Genus *Listeria* (Pschyrembel, 1994). In der Natur ist das Bakterium weit verbreitet und kann im Boden, Wasser und Abwässern, auf Pflanzen, in kontaminierten Lebensmitteln, menschlichen und tierischen Fäkalien sowie im Darmtrakt von vielen Säugern nachgewiesen werden. Ca. 10 % der menschlichen Bevölkerung tragen Listerien als Bestandteil ihrer Darmflora ohne gesundheitlich beeinträchtigt zu sein (Gray und Killinger, 1966; Weis und Seeliger, 1975).

L. monocytogenes ist ein Gram-positives, sporenloses, kokkoides Kurzstäbchen mit Tendenz zur Kettenbildung, das in breiten pH- und Temperaturbereichen wachsen kann und hohe Salzkonzentrationen toleriert (O'Driscoll *et al.*, 1996; Walker *et al.*, 1990). Die Zellwand weist alle charakteristischen Eigenschaften einer Gram-positiven Zellwand auf, sie besteht aus einem Peptidoglykangerüst, Teichonsäuren und Lipoteichonsäuren. *L. monocytogenes* wird als Oxidase-negativ, Katalase-positiv, CAMP-positiv, und Voges-Proskauer-positiv bezeichnet und zeigt auf Blutplatten β -hämolytische Aktivität. Motilität und Flagellensynthese sind bei *L. monocytogenes* thermoregulierte Prozesse (Peel *et al.*, 1988). Bei Temperaturen zwischen 20° C und 27°C weisen die Listerien eine peritriche Begeißelung auf und sind sehr beweglich. Bei 37° C ist die Transkription des Flagellin-Gens *flaA* normalerweise reprimiert und die Bakterien sind unbeweglich (Dons *et al.*, 1992; Peel *et al.*, 1988). Es gibt jedoch laboradaptierte Stämme, die auch bei 37°C noch Flagellin exprimieren und beweglich sind (Way *et al.*, 2004; Williams *et al.*, 2005).

Die Gattung *Listeria* umfasst bisher sechs charakterisierte Arten: *L. ivanovii*, *L. innocua*, *L. grayi*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri* und *L. monocytogenes*. Letztere ist fakultativ pathogen für Tier und Mensch, *L. ivanovii* gilt als ausschließlich tierpathogen. *L. monocytogenes* und *L. ivanovii* sind fakultativ intrazellulär und fähig, eukaryotische Zellen zu penetrieren und sich in ihnen zu vermehren (Moulder, 1985). Bei den übrigen vier Arten handelt es sich um apathogene Vertreter der Gattung, die als harmlose Saprophyten gelten. Listerien sind eng mit den Gattungen *Bacillus* spp., *Enterococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Brochothrix* spp. und *Staphylococcus* spp. verwandt (Vázquez-Boland *et al.*, 2001) und sind der Gruppe Gram-positiver Bakterien mit niedrigem GC-Gehalt zugeordnet (Madigan *et al.*, 1997).

Aufgrund der Fähigkeit, einen weiten Temperaturbereich zu tolerieren und sich auch bei hohen Salzkonzentrationen und niedrigen pH-Werten noch zu vermehren, stellt *L. monocytogenes* als potentieller Nahrungsmittelkeim ein großes Problem für die Nahrungsmittelindustrie dar. Selbst längere Zeitabschnitte des Trocknens und Gefrierens mit anschließendem Auftauen werden von den Listerien toleriert, so dass sie gängige nahrungsmittelkonservierende

Techniken überleben können (Lammerding und Doyle, 1990; Donnelly, 1990). Eine thermale Prozessierung von Lebensmitteln überleben die Organismen jedoch nicht. Eine Kontaminierung thermal prozessierter Waren ist meist auf den Kontakt mit kontaminierten Arbeitsflächen, Verpackungsmaterialien oder Geräten vor, während und nach der Verpackung zurückzuführen, oder auf den Zusatz bereits kontaminierter, weniger prozessierter Zutaten (Schirm *et al.*, 2004). Wie viele andere Bakterien, darunter *Salmonella* spp., *Klebsiella* spp., *Pseudomonas* spp., *Campylobacter* spp. und enterohaemorrhagische *E. coli* (EHEC), können auch Listerien biotische und abiotische Oberflächen mit einem dreidimensionalen Netz aus extrazellulären polymeren Substanzen (EPS) überziehen. Diese so genannten Biofilme ermöglichen den Bakterien, außerhalb eines Wirtes zu überleben. Sie bieten optimalen Schutz gegen UV-Licht und Austrocknung, sowie gegen bestimmte Desinfektionsmittel und antibakterielle Agenzien (Bower und Daeschel, 1999; Joseph *et al.*, 2001). Die Widerstandsfähigkeit von im Biofilm gewachsenen Zellen gegenüber antibakteriellen Reinigern ist dabei abhängig von der Oberflächenbeschaffenheit der besiedelten Flächen.

2.1.1 Pathogenese

Der Spezies *L. monocytogenes* werden 13 verschiedene Serovarianten zugeordnet, von denen lediglich die Varianten 1/2a, 1/2b und 4b ernsthafte Erkrankungen auslösen (Farber und Peterkin, 1991). Es sind nur die Stämme von *L. monocytogenes* pathogen, die durch die Produktion des porenbildenden Toxins Listeriolysin O (LLO) auf Blutplatten β -hämolytisch sind (Vázquez-Boland *et al.*, 2001). Ahämolytische Mutanten dagegen erscheinen im Tiermodell avirulent.

L. monocytogenes verursacht das Krankheitsbild einer Listeriose, was meistens auf den Verzehr kontaminierter Lebensmittel zurückzuführen ist. Obwohl die Listeriose beim Menschen relativ selten ist, stellt sie mit einer Mortalitätsrate von 20-30 % eine ernstzunehmende bakterielle Infektion dar (Vázquez-Boland *et al.*, 2001). Empfänglich sind hauptsächlich Menschen mit einer geschwächten T-Zell vermittelten Immunabwehr sowie Krebs-, HIV- und Transplantations-Patienten bzw. insgesamt Menschen mit einem geschwächten Immunsystem. Eine Listerien-Infektion führt oft zu Entzündungen des zentralen Nervensystems wie Meningitis, Meningoenzephalitis oder Enzephalitis. In einigen wenigen Fällen wurden auch Hepatitis oder Endokarditis beschrieben. Ein diaplazentaler Übertritt der Erreger von der infizierten Schwangeren auf den Fötus während der letzten Wochen der Schwangerschaft kann pränatale Infektionen mit Sepsis zur Folge haben, die häufig zu Tot- oder Frühgeburt führen. Lebende Neugeborene zeigen infolge der Überschwemmung ihres Körpers mit dem Erreger Bakterien-Embolien in Haut und inneren Organen. Auch eine Schädigung des Nervensystems kann die Folge einer pränatalen Infektion sein (Schuchat *et al.*, 1991; Pschyrembel, 1994). Bei gesunden Erwachsenen hingegen verläuft eine Infektion mit Listerien oft nur stumm mit Influenza-ähnlichen Symptomen und wird meist nicht als Listeriose diagnostiziert. Wird eine Listeriose rechtzeitig, d. h. innerhalb von 96 Stunden als solche erkannt, kann mit einer Kombination aus Penicillin G oder Ampicillin mit einem Aminoglykosid oder Sulfomethaxazol/Trimethoprim therapiert werden (Hof *et al.*, 1997; Sheehan *et al.*, 1994).

Da bei Mensch und Tier eine Infektion mit Listerien meistens mit der Aufnahme kontaminierter Lebensmittel einhergeht, stellt der Gastrointestinaltrakt die

wichtigste Eintrittsstelle der Bakterien in den Wirt dar. Die Bakterien gelangen über das Darmepithel in die phagozytischen Zellen der darunter liegenden Lamina propria (Racz *et al.*, 1972). Über den Blutkreislauf werden sie zu ihren primären Zielorganen, Leber und Milz, transportiert. Hier wird ein Großteil der Bakterien von residierenden Makrophagen und Neutrophilen aufgenommen und abgetötet (Cossart und Mengaud, 1989; Sheehan *et al.*, 1994). Überlebende Listerien können in Monozyten proliferieren und über den Blutkreislauf im ganzen Körper verteilt werden.

2.1.2 Der intrazelluläre Lebenszyklus

In den meisten infizierten Geweben liegen Listerien intrazellulär vor. Als Wirtszellen können sowohl professionell phagozytierende Zellen wie Makrophagen (MΦ), als auch nicht-professionell phagozytierende Zellen wie Epithelzellen (Gaillard *et al.*, 1987), Fibroblasten (Kuhn *et al.*, 1988), Hepatozyten (Wood *et al.*, 1993), Endothelzellen (Drevets *et al.*, 1995) und verschiedenste Typen von Nervenzellen (Dramsı *et al.*, 1998) in Frage kommen. Die Infektion einer Wirtszelle beginnt mit der Aufnahme der Listerien entweder durch Phagozytose bei MΦ, oder aber durch eine rezeptorvermittelte Phagozytose im Falle von nicht-professionell phagozytierenden Zellen. Abgesehen von diesem ersten Schritt unterscheidet sich der Lebenszyklus der Listerien in phagozytisch aktiven und nicht-aktiven Säugerzellen kaum. Das Eindringen in eine Wirtszelle wird durch die Interaktion mit Rezeptoren in der Zytoplasmamembran induziert, gefolgt von der schrittweisen Einhüllung des Bakteriums durch die Membran. Dieser Aufnahmemechanismus der Listerien, der dem Invasin-vermittelten Eindringen von *Yersinia* spp. ähnelt, wird als "zipper"- Mechanismus bezeichnet und unterscheidet sich vom "membrane ruffling" von *Salmonella* spp. und *Shigella* spp. beim Eintreten in eine Wirtszelle (Mengaud *et al.*, 1996; Ireton und Cossart, 1998).

Die Bakterien liegen nach der Aufnahme in die Zelle zunächst in einer primären Vakuole vor, deren Membran durch die Ausscheidung spezifischer Enzyme innerhalb von 30 Minuten lysiert wird und befinden sich dadurch frei im Zytosol. Dort vermehren sich mit einer Verdoppelungszeit von ca. 1 Stunde (Gaillard *et al.*, 1987; Alberts *et al.*, 1993). Bakterien, die dem Phagosom nicht entkommen können, werden abgetötet und verdaut. Zytoplasmatische Bakterien werden zunächst von einem ungeordneten Aktin-Saum umgeben, der innerhalb von ca. 2 Stunden zu einem so genannten Aktinschweif umgeordnet wird. Dieser Schweif von bis zu 40 µm Länge befindet sich dabei immer nur an einem Pol der Listerien. Polymerisiertes Aktin besteht aus langen, axial angeordneten Filamenten, die durch kurze, zufällig angeordnete Filamente vernetzt sind. Durch Einfügung von Aktinmonomeren (G-Aktin) zwischen Schweif und Bakterium entsteht eine Kraft, die die Listerien durch das Zytoplasma der Wirtszelle schiebt. Dabei verbleibt der Schweif immer an derselben Position im Zytoplasma, während das Bakterium nur durch die ständige Neupolymerisation von Aktin vorwärts geschoben wird (Vázquez-Boland *et al.*, 2001). Gelangen die Listerien während dieser ungerichteten Vorwärtsbewegung zur Zytoplasmamembran und treten mit dieser in Kontakt, bilden sich pseudopodienartige Fortsätze mit den Bakterien in der Spitze in die Nachbarzelle hinein, was ihre Endozytose durch diese zur Folge hat. Innerhalb der neuinfizierten Nachbarzelle befinden sich die Bakterien in einer von zwei Membranen umgebenen sekundären Vakuole. Mit der Lyse der Doppelmembran beginnt der Infektionszyklus von neuem (Tilney

und Portnoy, 1989). Einige der Phasen des listeriellen Lebenszyklus sind in Abb.1 dargestellt.

Durch diese Art der interzellulären Ausbreitung können sich Listerien, einmal im Zytoplasma angekommen, ohne weitere extrazelluläre Phase innerhalb eines Gewebes ausbreiten. Auf diese Weise entgehen die pathogenen Keime dem humoralen Immunsystem und können dann nur noch durch einer T-Zell vermittelten, zellulären Immunantwort eliminiert werden (Tilney und Portnoy, 1990).

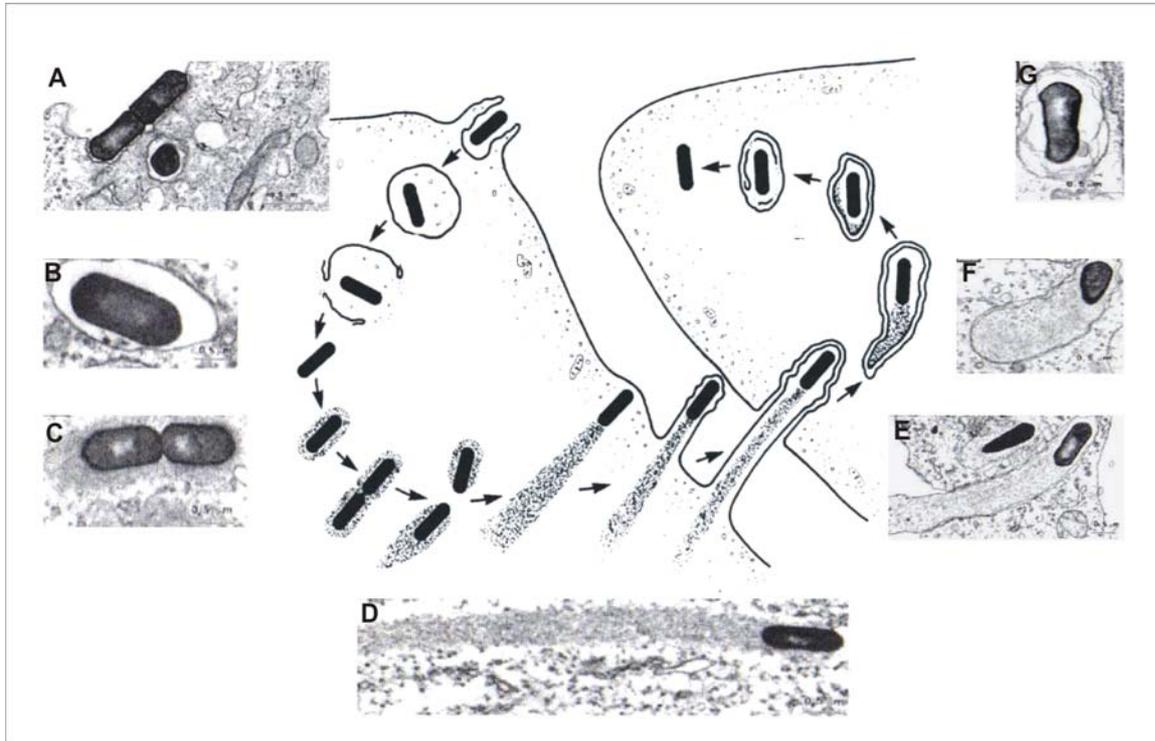


Abb. 1: Schematische Darstellung des intrazellulären Infektionszyklus von *L. monocytogenes* (aus Tilney und Portnoy, 1989) mit elektronenmikroskopischen Aufnahmen charakteristischer Stadien (aus Cossart und Lecuit, 1998).

A: Adhäsion. **B:** Lyse der Vakuolenmembran. **C:** Intrazelluläre Replikation. **D:** Intrazelluläre Bewegung. **E:** Ausbreitung in die Nachbarzelle. **F:** Bildung der sekundären Vakuole. **G:** Lyse der Doppelmembran.

2.1.3 Die Virulenzfaktoren

An einem erfolgreichen Durchlaufen des Infektionszyklus von *L. monocytogenes* sind verschiedene Virulenzfaktoren beteiligt. Sie werden von den so genannten Virulenzgenen codiert und sind größtenteils in einem Cluster angeordnet. Dieses Virulenzgencluster (VGC) stellt eine kompakte genetische Einheit dar und wird deswegen auch als *Listeria* Pathogenitätsinsel 1 (LIPI-1) bezeichnet (Kreft und Vázquez-Boland, 2001). Die wichtigsten listeriellen Virulenzgene werden durch das Regulatorgen *prfA* ("positive regulatory factor A"), das selbst Bestandteil des Clusters ist, koordiniert reguliert. LIPI-1 ist in ähnlicher Form auch im Genom von *L. ivanovii* und *L. seeligeri* anzutreffen (Schmid *et al.*, 2005). Während *L. monocytogenes* und *L. ivanovii* ein sehr ähnliches VGC besitzen, weist die apathogene Spezies *L. seeligeri* ein größeres Cluster mit fünf zusätzlichen Genen auf.

LIPI-1 (Abb. 2) umfasst bei *L. monocytogenes* einen ca. 10 kb großen Bereich auf dem Chromosom und enthält 6 für Virulenzfaktoren codierende Gene: Das

prfA-plcA Operon, *hly*, das Lecithinase-Operon mit den Genen *mpl*, *actA*, *plcB* und zwei weitere offene Leseraster *vcIX* und *vcIY* noch unbekannter Funktion (Kreft und Vázquez-Boland, 2001; Schmid *et al.*, 2005). LIPI-1 wird upstream von *prs*, das für eine Phosphoribosyl-Pyrophosphat-Synthase codiert, und downstream von dem Lactatdehydrogenasegen *ldh* flankiert. Die beiden ORFs *vcIA* und *vcIB*, die innerhalb der *plcB-ldh*-Region liegen, codieren für Proteine noch unbekannter Funktion. *prs*, *ldh*, *vcIA* und *vcIB* sind bis auf *vcIA* bei *L. grayii* in allen sechs *Listeria*-Spezies aufzufinden (Schmid *et al.*, 2005).

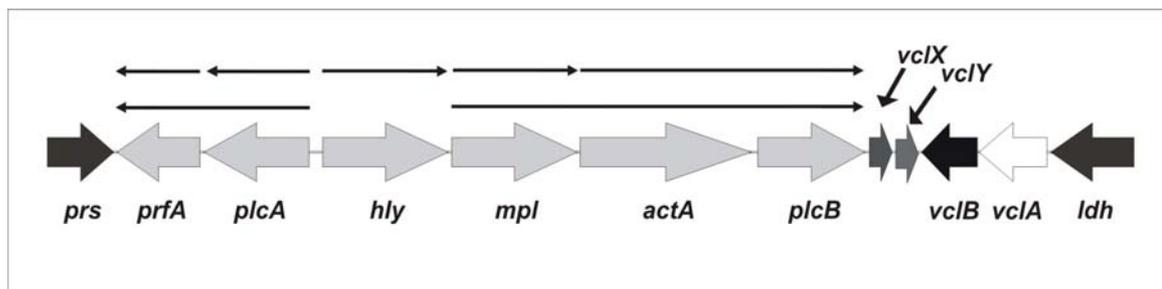


Abb. 2: Schematische Darstellung des zentralen Virulenzgenclusters LIPI-1 (modifiziert nach Vázquez-Boland *et al.*, 2001) von *L. monocytogenes*.

Die zu LIPI-1 zählenden Gene sind hellgrau, die flankierenden ORFs, die in allen *Listeria* spp. vorkommen, schwarz dargestellt. Die schwarzen Linienpfeile oberhalb der LIPI-1 Gene stellen bekannte Transkripte dar.

PrfA reguliert aber auch außerhalb des Clusters liegende Virulenzgene, nämlich die der Internaline *inIA/B* und *inIC*. Die Expression des Hexose-Phosphat-Transportergens *hpt* (Chico-Calero *et al.*, 2002) und des Gallensalz-Hydrolasegens *bsh* (Dussurget *et al.*, 2002) unterliegen ebenfalls der positiven Regulation durch PrfA. Kürzlich konnten mittels Transkriptomanalysen eine Reihe weiterer Gene identifiziert werden, die von PrfA reguliert werden (Milohanic *et al.*, 2003). Inwiefern diese Gene virulenzassoziiert sind, ist noch nicht eingehend untersucht worden.

PrfA ist ein 27 kDa-Protein aus 233 AS und Mitglied der Familie der Crp/Fnr-Transkriptionsregulatoren. Prototypen dieser Familie sind das Cro-Protein des λ -Phagen und das Crp- bzw. Fnr-Protein von *E. coli* (Lampidis *et al.*, 1994; Kreft *et al.*, 1995). Die von PrfA regulierten Gene besitzen in ihrer -41 Region eine PrfA-Box mit der Konsensussequenz 5'-TTAACANNTGTNAN-3', die über ein putatives Helix-turn-Helix Motiv von PrfA-Dimeren erkannt wird (Sheehan *et al.*, 1996). Die Expression von *prfA* ist ein thermoregulierter Prozess (Johansson *et al.*, 2002). Der Grund hierfür ist eine posttranslationale Regulation. Das *prfA*-Transkript enthält einen untranslatierten Bereich (UTR). Dieser bildet bei niedrigen Temperaturen ($\leq 30^{\circ}\text{C}$) eine Sekundärstruktur, wodurch die Shine-Dalgarno Sequenz sterisch inhibiert und eine Translation der downstream liegenden *prfA*-codierenden Region verhindert wird. Bei Temperaturen ab 37°C kann das Leader-Transkript aufgrund der Temperatursensitivität der RNA diese inhibitorische Sekundärstruktur nicht mehr bilden und die Translation des *prfA*-Transkripts kann erfolgen. PrfA induziert sodann die Expression des bicistronischen *plcA/prfA*-Transkripts und somit seine eigene Synthese. Ab einer gewissen Konzentration an PrfA werden außerdem die übrigen Virulenzgene aktiviert. Durch diese thermoregulierte Expression von *prfA* wird verhindert, dass die Virulenzgene unnötig außerhalb eines Wirtes, sondern erst während einer Infektion exprimiert werden (Johansson *et al.*, 2002).

Adhärenz an und Invasion in normalerweise nicht-phagozytische Zellen wird von mindestens zwei bakteriellen Oberflächenproteinen vermittelt: Internalin (InIA) und InIB. Diese Proteine gehören zur Familie der Internaline und sind durch die Anwesenheit leucinreicher Sequenzwiederholungen (LRR) charakterisiert (Cabanes *et al.*, 2002). Internalin wird von *inIA* codiert und trägt die für Oberflächenproteine charakteristische N-terminale Signalsequenz, gefolgt von einer Region aus 15 LRR mit je 22 AS. Diese LRR-Region wird von einer N-terminalen "Cap"-Domäne und einer C-terminalen IR-Region mit Immunglobulin-ähnlicher Faltung flankiert (Schubert *et al.*, 2001). Der C-Terminus weist ein LPXTG-Motiv auf, mit dem InIA kovalent in der Peptidoglykanschicht der Zellwand gebunden ist. Die LRR und IR-Region sind notwendig, um eine Aufnahme der Listerien in humane Epithelzellen zu induzieren (Lecuit *et al.*, 1997). Als zellulärer Rezeptor für InIA wurde Humanes E-Cadherin identifiziert (Mengaud *et al.*, 1996). Man geht davon aus, dass durch die Interaktion von InIA und humanem E-Cadherin eine intrazelluläre Reorganisation des Aktingerüsts induziert wird, die letztlich zur Endozytose des adhärenen Bakteriums führt. InIB, ein 65 kDa Protein von 630 AS, wird von *inIB* codiert und weist mit einer aminoterminalen Signalsequenz und 8 LRR aus je 22 AS strukturelle Homologie zu InIA auf. Die C-terminale Domäne weist drei Tandemwiederholungen mit je 80 AS auf, die mit der Sequenz GW beginnen und InIB über nicht-kovalente Interaktionen mit den Lipoteichonsäuren in der bakteriellen Zellwand verankern (Jonquieres *et al.*, 1999). Diese Interaktionen scheinen jedoch relativ schwach zu sein, da größere Mengen InIB im Überstand von *L. monocytogenes* aufzufinden sind (Braun *et al.*, 1997). Der Hauptrezeptor von InIB auf seinen Zielzellen ist die Met Rezeptor Tyrosin Kinase (Shen *et al.*, 2002). Als zweiter Rezeptor wurde der zelluläre Ligand des Komplementfaktors C1q, gC1q-R, identifiziert (Braun *et al.*, 2000).

Neben dem InIA/B Operon gibt es in *L. monocytogenes* noch 19 weitere Gene, die für putative oberflächenassoziierte Internaline codieren (Glaser *et al.*, 2001). Von diesen wurden bisher jedoch nur sieben beschreiben (Dramsı *et al.*, 1997; Raffelsbauer *et al.*, 1998). InIC2, InID, InIE, InIF, InIG und InIH zählen aufgrund ihrer InIA/B ähnlichen Größe und Struktur zusammen mit diesen zur Gruppe der großen Internaline. InIC, auch IrpA genannt (Luo *et al.*, 2004), ist deutlich kleiner und wird deswegen auch als kleines Internalin bezeichnet.

Am Entkommen aus dem primären und sekundären Phagosom durch Lyse der Phagosomenmembran(en) sind mindestens drei in LIPI-1 codierte Genprodukte beteiligt: Listeriolysin O (LLO), in geringerem Maße die Phosphatidylinositol-spezifische Phospholipase C (PI-PLC) und die Phosphatidylcholin-spezifische Phospholipase C (PC-PLC). LLO ist Mitglied der Familie porenbildender cholesterinabhängiger Zytolysine, deren Prototyp das Streptolysin O von *Streptococcus pyogenes* ist (Mengaud *et al.*, 1987; Geoffroy *et al.*, 1987). Dieses sekretierte 60 kDa Protein wird von *hly* codiert und ist einer der wichtigsten Virulenzfaktoren von *L. monocytogenes*. Seine Transkription wird durch PrfA reguliert. Da es aufgrund seiner lytischen Aktivität potentiell zytotoxisch für die Wirtszelle ist, weist es spezifische molekulare Anpassungen auf, um diesen Effekt zu minimieren. Seine volle Wirkungskraft entfaltet LLO erst bei pH-Werten zwischen 5,5 und 6, wodurch seine Aktivität auf das angesäuerte Phagosom beschränkt ist. LLO ist im Zytoplasma der Wirtszelle äußerst instabil, da es durch eine spezielle PEST-Sequenz für den proteolytischen Abbau markiert ist (Decatur und Portnoy, 2000). PI-PLC wird von *plcA* codiert und ist spezifisch für Phosphatidylinositol (PI) und glykosilierte Membranproteine. Es ist ein 34 kDa

großes sekretorisches Protein und in einem geringen Ausmaß zusammen mit LLO an der Lyse der Phagosomenmembran beteiligt (Mengaud *et al.*, 1991). PC-PLC dagegen besitzt ein breites Substratspektrum und hydrolysiert die meisten in biologischen Membranen vorkommenden Phospholipide, darunter auch Sphingomyelin (Geoffroy *et al.*, 1991; Vázquez-Boland *et al.*, 1992). PC-PLC wird von *plcB* codiert und als inaktives Propeptid mit einem MW von 32 kDa sezerniert. Durch die Metalloprotease Mpl wird es in seine enzymatisch aktive, Zn^{2+} -abhängige Form überführt und liegt dann mit einem MW von 29 kDa vor (Ravenau *et al.*, 1992; Niebuhr *et al.*, 1993).

Die ebenfalls Zn^{2+} -abhängige Metalloprotease Mpl wird vom *mpl*-Gen codiert und ist ein 57 kDa großes Protein. Es gehört wie die Metalloproteasen von *Clostridium* spp. zur Familie der Zn^{2+} -Metalloproteasen (Titball, 1993). Mpl wird als inaktives Pro-Enzym sezerniert und extrazellulär durch Spaltung in seine autokatalytischaktive 35 kDa Form überführt (Domann *et al.*, 1991; Mengaud *et al.*, 1991). Neben der proteolytischen Spaltung von PC-PLC scheint Mpl auch an der Prozessierung des *actA*-Genproduktes ActA beteiligt zu sein.

Nach Lyse der Phagosomenmembran induzieren zytoplasmatische Listerien die Polymerisierung von Aktinfilamenten, mit deren Hilfe sie sich intra- und interzellulär fortbewegen. Diese Aktivität wird von dem listeriellen Oberflächenprotein ActA induziert. Es wird von *actA* codiert und ist zusammen mit *mpl*, *plcB* und *vcIA/B* im Lecithinase-Operon angeordnet (Vázquez-Boland *et al.*, 1992). ActA ist ein 639 AS großes Protein mit einem theoretischen MW von 67 kDa, das in SDS-Gelen auf der Höhe von 92 kDa läuft. ActA weist eine für Oberflächenproteine typische Signalsequenz am N-Terminus auf und ist über eine Sequenzfolge in seinem C-terminalen Bereich in der Membran verankert. Im zentralen Bereich von ActA befinden sich vier prolinreiche Sequenzwiederholungen (PRR), die mit zellulären Proteinen in Wechselwirkung treten können. Aufbau und Funktion von ActA werden unter 2.2 detaillierter beschrieben.

Über den Nährstoffbedarf zytosolischer Listerien bzw. über welchen Mechanismus die Bakterien Nährstoffe aus dem Wirtszellzytoplasma beziehen, ist bis heute nur wenig bekannt. *L. monocytogenes* verwertet als Kohlenstoff- und Energiequelle unter anderem das in Wirtszellen reichlich vorkommende Glukose-1-Phosphat. Dieser Prozess basiert auf der PrfA-abhängigen Expression des Hexose-Phosphat-Transporters Hpt. Hpt ermöglicht die intrazelluläre Replikation und ist notwendig für die Proliferation von *L. monocytogenes* im Mausmodell (Chico-Calero *et al.*, 2002). Es ist der erste identifizierte Virulenzfaktor, der an der Replikationsphase eines fakultativ intrazellulären Pathogens beteiligt ist.

Die Gallensalz-Hydrolase BSH ist eine neue Art von Virulenzfaktor, die am Überstehen der intestinalen und hepatischen Phasen pathogener Listerien mitwirkt. BSH ist ein Enzym, das unter den sauerstoffarmen Bedingungen in Darm und Leber konjugierte Gallensalze spaltet und somit die Bakterien vor deren Toxizität schützt (Dussurget, 2002; Sue *et al.*, 2003; Milohanic *et al.*, 2003).

2.2 ActA

Verschiedene Forschungsgruppen fanden heraus, dass F-Aktin für die intrazelluläre Fortbewegung der bakteriellen Pathogene *L. monocytogenes* (Tilney und Portnoy, 1989) und *L. ivanovii* (Karunasagar *et al.*, 1997); *Shigella flexneri* (Bernardini *et al.*, 1989), *Rickettsiae* spp. (Teyssere *et al.*, 1992; Heinzen *et al.*, 1999), *Mycobacterium marinum* (Stamm *et al.*, 2003) und *Burkholderia pseudomallei* (Breitbach *et al.*, 2003) verantwortlich ist. Für das Vaccinia Virus wurde ebenfalls diese Art der Fortbewegung nachgewiesen (Cudmore *et al.*, 1995).

L. monocytogenes hat einen effizienten Mechanismus entwickelt sich durch Aktinpolymerisation fortzubewegen. Sobald sich intrazelluläre Listerien aus dem Phagosom befreit haben und im Zytoplasma der Wirtszelle vorliegen, werden sie zunächst von einem Netzwerk aus Aktin und Aktin-bindenden Proteinen umgeben. (Tilney und Portnoy, 1989). Dieser Aktinbaum wird innerhalb von ca. 2 Stunden nach Internalisierung zu einem asymmetrischen Aktin-Schweif umgeordnet. Polymerisiertes Aktin weist eine dynamische Instabilität in Form eines schneller wachsenden "barbed end" und einem relativ inaktivem, langsam wachsenden "pointed end" auf. Die schneller polymerisierenden "barbed ends" sind dabei zum Bakterium hin orientiert woraus die Vermutung entstand, dass die Polymerisation von Aktin am hinteren Ende der Listerien stattfindet. Abbildung 3 B zeigt eine fluoreszenzmikroskopische Aufnahme *L. monocytogenes*-infizierter Caco-2 Zellen die mit FITC-Phalloidin (Flourescin Isothiocyanat-markiertes Phalloidin) markiert wurden, einem Farbstoff der filamentöses Aktin anfärbt. Dadurch sind das Aktin-Zytoskelett der Wirtszelle sowie die von den intrazellulären Bakterien gebildeten Aktinschweife deutlich zu erkennen (weiße Pfeile). Es sind nicht bei allen intrazellulären Listerien Schweife zu erkennen. Bei Einigen beschränkt sich die Anfärbung durch FITC-Phalloidin auf den die Bakterien umgebenden Aktinbaum.

Mit videomikroskopischen Aufnahmen *L. monocytogenes*-infizierter Zellen konnte durch die Mikroinjektion fluoreszierender Aktin-Monomere gezeigt werden, dass die Aktinpolymerisation nur an einem Pol der Bakterien stattfindet, der Schweif stationär im Zytosol verbleibt und schließlich depolymerisiert wird, während sich die Listerien weiterbewegen (Dabiri *et al.*, 1990; Sanger *et al.*, 1992; Theriot *et al.*, 1992).

Für die Aktin-vermittelte intra- und interzelluläre Bewegung von *L. monocytogenes* ist deren Oberflächenprotein ActA verantwortlich. Es wurde aufgrund von Mutanten identifiziert, die kein Aktin mehr polymerisieren können (Kocks *et al.*, 1992; Domann *et al.*, 1992). Diese *actA*-Mutanten sind nicht mehr fähig sich intrazellulär fortzubewegen und bilden typische Mikrokolonien in der Nähe des Zellkerns aus, anstatt sich wie der Wildtyp im infizierten Gewebe auszubreiten (Abb. 3, C und D). Mit Transfektionsexperimenten wurde überprüft, ob ActA alleine ausreicht um eine Aktinpolymerisation zu induzieren. Dazu wurde das *actA*-Gen in Säugerzellen exprimiert. Da ActA in seinem C-terminalen Bereich Homologie zur Transportsignalsequenz eukaryotischer Proteine aufweist, aufgrund derer diese zu den Mitochondrien transportiert werden, wurde auch ActA zu diesen Zellorganellen transportiert. Dort angelangt wurde es in die Membran eingelagert und begann dort, das Aktingerüst der Zelle neu zu orientieren indem es die Polymerisation von G-Aktin zu F-Aktin auf der Oberfläche der Mitochondrien induzierte (Pistor *et al.*, 1994; Friedrich *et al.*,

1995). Die Expression von ActA in der apathogenen Spezies *L. innocua* führte dazu, dass dieses normalerweise unbewegliche Bakterium Aktin polymerisieren und sich fortbewegen konnte (Kocks *et al.*, 1995). Diese Versuche haben gezeigt, dass ActA als einziger listerieller Faktor ausreicht, um eine Aktinpolymerisation zu induzieren und die Fortbewegung zu ermöglichen.

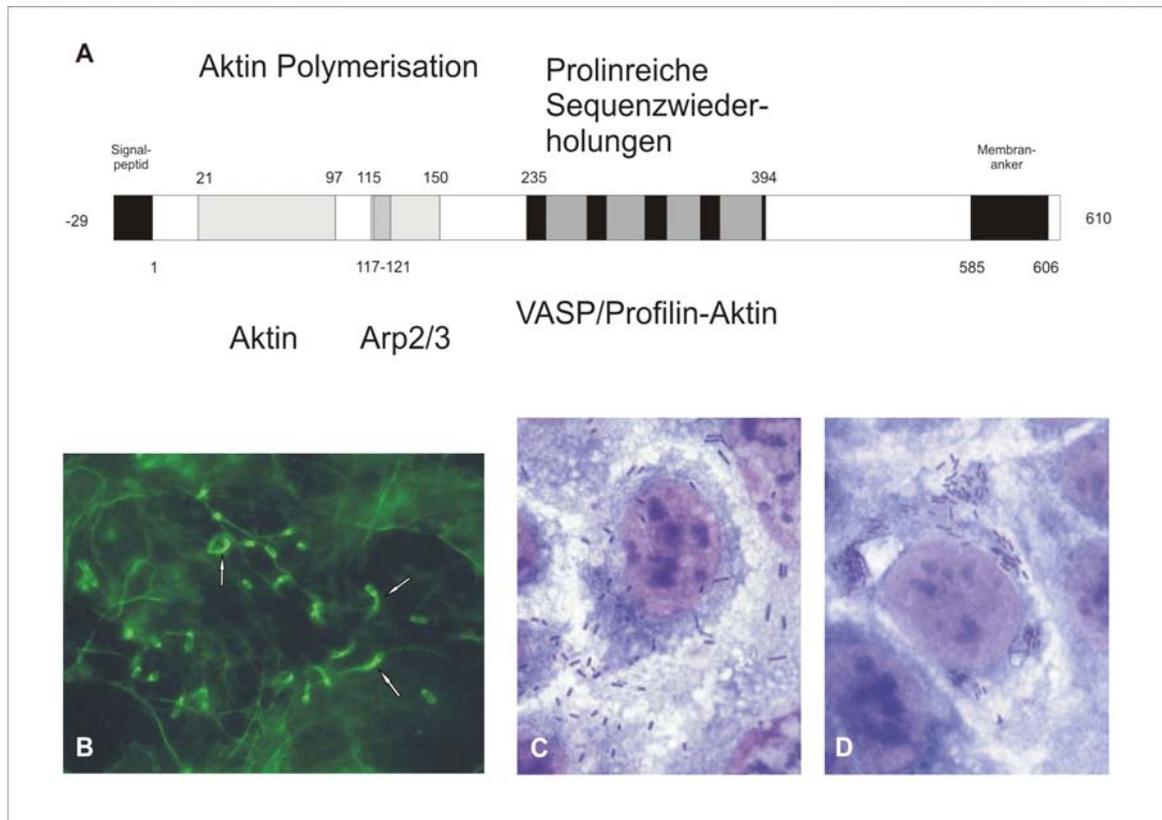


Abb. 3: Aktin-basierende intrazelluläre Motilität.

A: Schematische Darstellung der Struktur und funktionaler Motive von ActA (die Angaben der Aminosäurepositionen beziehen sich auf Kocks *et al.*, 1992 und Vázquez-Boland *et al.*, 1992); **B:** Immunfluoreszenzaufnahme FITC-Phalloidin gefärbter, *L. monocytogenes* EGD infizierter Caco-2 Zellen 4 h p. i. (aus Pfeuffer *et al.*, 2000). Das Aktingerüst der Zelle und die Aktinschweife (Pfeile) sich bewegender Listerien sind grün dargestellt. Bei manchen Bakterien ist lediglich der Aktinsaum angefärbt. **C** und **D:** Giemsa-Färbung *L. monocytogenes* EGD (**C**) und A49 (**D**) infizierter Caco-2 Zellen 4 h p. i. Bakterien des Stammes *L. monocytogenes* A49 können sich nicht bewegen und in benachbarte Zellen eindringen, sie bilden typische Mikrokolonien in der Nähe des Zellkerns.

ActA wird vom *actA*-Gen codiert und zunächst als 639 AS großes Vorläuferprotein mit einem theoretischen MW von 67 kDa gebildet. In SDS-Gelen trennt sich das Protein in drei Banden auf, wobei die Hauptbande bei 90 kDa läuft. Diese Beobachtung ist wohl darauf zurückzuführen, dass ActA in der Wirtszelle auch phosphoryliert vorliegt, wodurch sich Unterschiede im Molekulargewicht ergeben. Welche Funktion diese Phosphorylierung ausübt, konnte bis heute noch nicht geklärt werden. Sie findet im C-terminalen Bereich des Proteins statt, scheint aber für die Funktion von ActA keine Rolle zu spielen da, *actA*-Mutanten, bei denen der C-Terminus deletiert wurde, trotzdem beweglich sind (Lasa *et al.*, 1995). Das reife ActA-Protein (Abb. 3 A) weist nur noch 610 AS auf und wird aufgrund seiner Aminosäuresequenz unterteilt in eine N-terminale Domäne, die viele positiv geladene AS-Reste aufweist, einen charakteristischen zentralen Bereich mit vier prolinreichen Sequenzwieder-

holungen (PRR) und den C-Terminus, über dessen hydrophoben Abschnitt das Protein in der Zellmembran verankert ist. Der prolinreiche Bereich und der C-Terminus von ActA weisen starke strukturelle und funktionale Ähnlichkeiten zu Zyxin auf, einem zellulären Protein, das mit Fokalkontakten und Aktin-Stressfasern assoziiert ist. Zyxin könnte daher als eukaryotisches Homolog zu dem listeriellen Oberflächenprotein betrachtet werden (Goldsteyn *et al.*, 1997). Der N-terminale Bereich von ActA hingegen besitzt eine 25 %-ige Homologie mit der C-terminalen Region von Vinculin, einem zellulären Aktin bindenden Protein. Der N-Terminus ist ausschließlich für den Aktinfaser-Aufbau verantwortlich, da in diesem Bereich die notwendigen Strukturelemente enthalten sind, um eine Polymerisierung von G-Aktin zu F-Aktin zu induzieren. Mit Hilfe von Deletionsanalysen wurde der N-Terminus als der für die Funktion von ActA absolut essentielle Bereich identifiziert (Lasa *et al.*, 1995; Lasa *et al.*, 1997). Außerdem konnte gezeigt werden, dass Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) und Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PIP₃) ebenfalls im N-terminalen Bereich von ActA binden. Diese Interaktionen gehen mit einer deutlichen Veränderung der Sekundärstruktur dieses Proteins einher (Cicchetti *et al.*, 1999). Genauere Analysen erlaubten die Eingrenzung der für die Aktinpolymerisation wichtigen Region in zwei kleine Bereiche, die C- (AS 21-97) und die T-Region (117-121). Diese beiden Abschnitte sind weniger an der Initiation der Polymerisierung, als an der eigentlichen Schweifbildung selbst beteiligt, da Ersteres auch bei Deletion beider Bereiche noch abläuft. Die T-Region ist wichtig für die Filament-Elongation, während die C-Region für die Ausbildung kontinuierlicher Schweife notwendig ist (Lasa *et al.*, 1997). Auf der Oberfläche von *L. monocytogenes* kommt ActA als Dimer oder Tetramer vor. Für die Dimerisierung ist ein AS Bereich am N-terminalen Ende des Proteins verantwortlich (AS 126-155) (Mourrain *et al.*, 1997; Cicchetti *et al.*, 1999).

Frühe Ansätze, eine direkte Interaktion zwischen ActA und F-Aktin nachzuweisen scheiterten was die Vermutung aufwarf, dass neben ActA noch mindestens ein weiteres zelluläres Protein an der Aktinpolymerisierung beteiligt sein muss. Um dieses zu identifizieren wurden an fixierten Zellen Immunfluoreszenzanalysen mit Antikörpern (AK) durchgeführt, die gegen bereits bekannte mit dem Zytoskelett interagierende Proteine gerichtet waren. Mit dieser Methode wurden α -Aktinin, Tropomyosin, Vinculin, Villin, Talin, Ezrin/ Radixin, Fimbrin (Plastin), Filamin, ADF (Cofilin), Gelsolin, Coronin, Rac, CapZ, Arp3, Profilin und VASP (vasodilator stimulated phosphoprotein) im und entlang des Aktin-Schweifs identifiziert, Profilin und VASP auch zwischen Schweif und Bakterienpol (Vázquez-Boland *et al.*, 2001).

VASP war das erste eukaryotische Protein, für das eine direkte Bindung an ActA nachgewiesen werden konnte. Es bindet als Homotetramer (Bachmann *et al.*, 1999) in der zentralen PRR-Region von ActA, genau an der Stelle des Aktin-Einbaus (Chakraborty *et al.*, 1995). VASP gehört zur Familie der Ena/VASP-Proteine, zu der auch das *Drosophila*-Protein Ena (Enabled), dessen Säuger-Homologes Mena (mammalian Ena) und das murine Evi (Ena-VASP-like) gehören (Niebuhr *et al.*, 1997; Cicchetti *et al.*, 1999). Normalerweise ist es mit Fokalkontakten und Aktin-Stressfasern der Zelle assoziiert. Es interagiert mit dem Regulatorprotein Profilin, welches wiederum eine direkte Bindung mit G-Aktin eingehen kann (Reinhard *et al.*, 1995; Pollard, 1994). Durch die Bindung von VASP in der zentralen prolinreichen Region von ActA wird auch Profilin und daran gebundenes G-Aktin an die Oberfläche der Listerien rekrutiert. Diese

Aktinmonomere werden von hier aus an den N-terminalen Teil von ActA weitergegeben, wo sie polymerisieren und von weiteren Proteinen durch "capping" vor der Depolymerisierung geschützt werden (Cicchetti *et al.*, 1999). Durch die ActA-VASP-Profilin Bindung gibt es also eine direkte Verbindung zwischen intrazellulären Listerien und dem Zytoskelett der Wirtszelle (Gertler *et al.*, 1996). *L. monocytogenes*-Mutanten, denen die PRR-Region und somit die VASP-Bindestelle von ActA fehlt, sind zwar noch fähig Aktin an die bakterielle Oberfläche zu rekrutieren und Schweife auszubilden, bewegen sich jedoch deutlich langsamer fort als wildtypische Listerien. Diese Ergebnisse implizieren, dass der PRR-Bereich von ActA für dessen Funktion zwar nicht essentiell ist, aber durch die Rekrutierung von VASP und Profilin für die Fortbewegungsgeschwindigkeit der Listerien eine Rolle spielt (Chakraborty *et al.*, 1995; Pistor *et al.*, 1995; Lasa *et al.*, 1997; diese Arbeit).

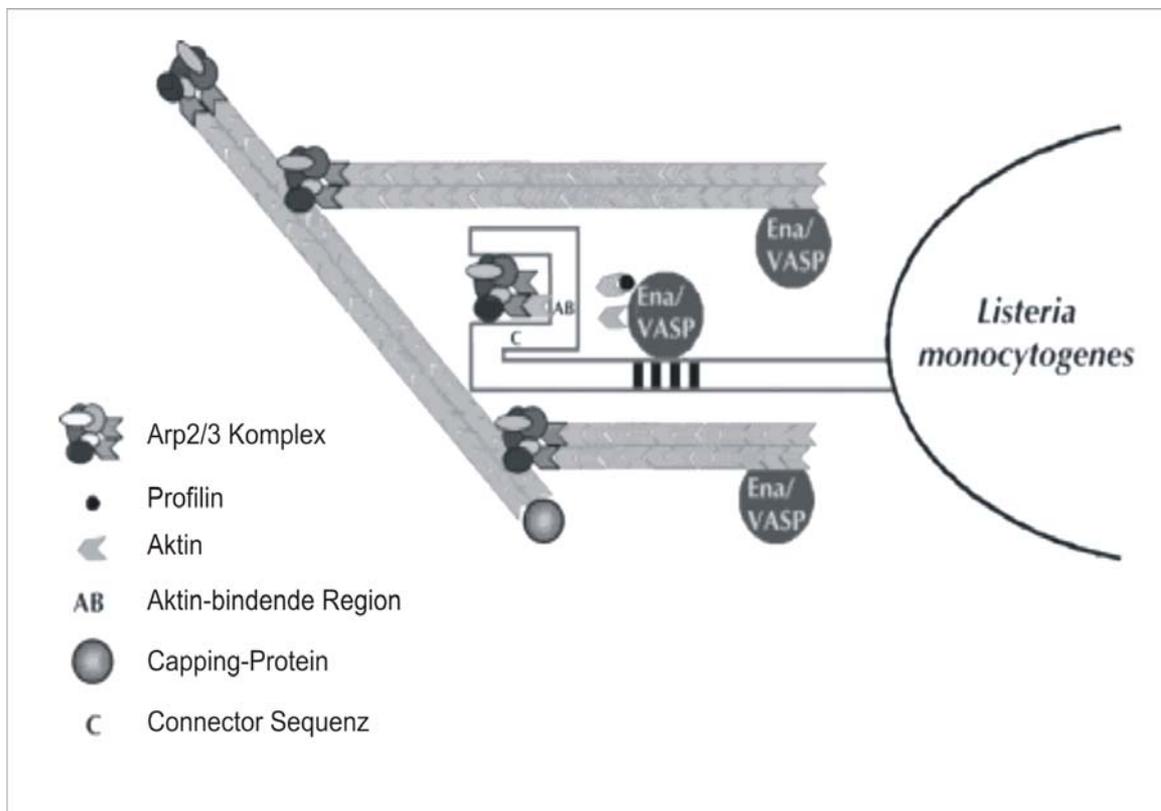


Abb. 4: Vereinfachte schematische Darstellung der Aktin-basierenden intrazellulären Bewegung (nach Portnoy *et al.*, 2002).

Für eine bessere Übersicht sind auf der Oberfläche gebundenes ActA, VASP und Bindungspartner als Monomere dargestellt. ActA, Mena/VASP-Proteine und Profilin tragen alle zur Arp2/3 vermittelten Nukleation der Aktinfilamente bei, indem sie G-Aktin in die Nähe der Bakterienoberfläche bringen.

Die Aktinpolymerisation wird von einem Komplex aus sieben Proteinen, dem so genannten Arp2/3-Komplex induziert. Hierzu gehören die Aktin-verwandten Proteine Arp2 und Arp3 sowie die 5 Untereinheiten p16-Arc, p20-Arc, p21-Arc, p34-Arc und p41-Arc (Welch *et al.*, 1997; Welch *et al.*, 1998). Der Arp2/3-Komplex initiiert die Nukleation von Aktinfilamenten, sobald er von ActA auf der Oberfläche der Listerien aktiviert wurde. Dabei interagieren der Arp2/3-Komplex und der N-Terminus von ActA im Bereich von AS 115-150, wobei hauptsächlich der positiv geladene AS-Abschnitt 117 -121 (KKRRK), die so genannte

"connector Sequenz" bzw. T-Region eine Rolle spielt. Der Arp2/3-Komplex bindet außerdem mit hoher Affinität an die "pointed-ends" der Aktinfilamente und kann diese quervernetzen. Dadurch ist er über den gesamten Aktin-Schweif verteilt nachzuweisen (Mullins *et al.*, 1998; Cossart, 2000).

Normalerweise wird der Arp2/3-Komplex durch die Interaktion mit Proteinen der WASP (Wiskott-Aldrich-Syndrom Protein)/Scar Familie aktiviert, die Signaltransduktionskaskaden und die Organisation des Zytoskeletts miteinander koppeln (Machesky *et al.*, 1999; Rohatgi *et al.*, 1999). WASP und ActA weisen eigentlich keine Sequenzhomologie auf, besitzen jedoch beide die den Arp2/3-Komplex bindende "connector-Sequenz". Versuche in denen Scar-1, ein Mitglied der WASP/Scar-Familie, überexprimiert wurde zeigten, dass der Arp2/3-Komplex für die Induktion der Aktinpolymerisation absolut essentiell ist: Listerien konnten in Scar-1 überexprimierenden Zellen nur noch Aktinwolken ausbilden, eine Schweifbildung blieb völlig aus, da Scar-1 anstelle von ActA mit dem Multiprotein-Komplex interagiert (May *et al.*, 1999). ActA stimuliert demnach die intrinsische Aktinfilament Nukleations-Aktivität von Arp2/3, indem es das Verhalten der WASP-Proteine imitiert (Welch *et al.*, 1998; Pistor *et al.*, 2000. Skoble *et al.*, 2000; Boujeema-Paterski *et al.*, 2001; Zalevsky *et al.*, 2001).

Neben dem aktivierten Arp2/3-Komplex und G-Aktin sind zusätzlich das Capping-Protein (CP) und ADF ("actin depolymerizing factor", auch Cofilin genannt) für die Aktin-basierende Fortbewegung notwendig. Diese Proteine sorgen für eine ausreichende Konzentration freien G-Aktins an der Bakterienoberfläche (Loisel *et al.*, 1999). Abbildung 4 zeigt eine vereinfachte schematische Darstellung der Aktin-basierenden Motilität mit Einigen an der Aktinpolymerisation beteiligten Proteinen. ATP-Aktin-Monomere binden über Profilin und VASP/Mena an die PRR-Region von ActA und werden so in die Nähe des am N-Terminus, über die "connector Sequenz" gebundenen und aktivierten Arp2/3-Komplexes gebracht. Die Nukleation eines Filamentes erzeugt neue "barbed ends" die ständig wachsen, da hier ATP-G-Aktin angelagert wird. An den "pointed ends" erfolgt eine ständige Depolymerisation. Sobald eine Neubildung erfolgt ist, erhöht Profilin die Geschwindigkeit der Verlängerung (Elongation), während ADF die Depolymerisation bestehender CP-gebundener Filamente induziert. Das CP bindet an freie "barbed ends" und markiert dadurch diese Filamente für den Abbau durch ADF. Durch das capping von "barbed ends" wird nach der Depolymerisation an den "pointed ends" ADP-G-Aktin frei. Mena/VASP-Proteine binden auch an "barbed ends" und kompetieren dabei mit dem CP. Das hat zur Folge, dass diese Aktinfilamente nicht durch das CP markiert und durch ADF depolymerisiert werden. Mena/VASP sind jedoch ausschließlich zwischen Bakterienpol und Aktin-Schweif konzentriert, während das CP im ganzen Schweif verteilt vorkommt (Bear *et al.*, 2002). Durch diese asymmetrische Verteilung wird gewährleistet, dass die Aktinfilamente gezielt nur an einem Bakterienpol verlängert werden.

2.3 LaXp180

Die Hauptaufgabe des Oberflächenproteins ActA besteht darin, als Gerüstprotein Bindungsstellen für eukaryotische Proteine zur Verfügung zu stellen. Um neben den bereits bekannten Interaktionspartnern weitere an ActA bindende Proteine zu identifizieren wurde über ein Yeast Two-Hybrid Systems mit ActA als Köder eine embryonale Maus cDNA Bank durchsucht (Pfeuffer *et al.*, 2000). Dabei

wurden drei unterschiedliche Proteinfragmente identifiziert, die mit ActA interagieren und starke Homologie zu bereits bekannten Proteinen aufweisen. Bei einem dieser Proteinfragmente handelte es sich um die letzten 227 AS von LaXp180.

LaXp180 ist ein 1591 AS umfassendes Protein mit einem Molekulargewicht von 180 kDa. Da über die genaue Funktion des Proteins nichts bekannt ist, außer dass es sich dabei eventuell um einen Transkriptionsfaktor handeln könnte (Chano *et al.*, 2002), wurde die AS-Sequenz dieses Proteins analysiert (Bauer *et al.*, 2003). Computergestützte Analysen ergaben, dass LaXp180 in seinem N-terminalen Bereich die typische Kernlokalisationssequenz KRPK (Lys-Arg-Pro-Lys) aufweist (Hicks und Reikhel, 1995). LaXp180 besitzt außerdem sehr viele Phosphorylierungsstellen für verschiedene Kinasen, wobei die meisten von ihnen in der N-terminalen Hälfte des Proteins zu finden sind (Abb. 5, hellgraue Fläche). Der C-Terminus (Abb. 5, dunkelgraue Fläche) ist durch "coiled-coil"-Strukturen, über die er vermutlich mit anderen Proteinen interagiert, und ein Leucin-Zipper Motiv charakterisiert (Lupas, 1996; Landschulz *et al.*, 1988). Er trägt zudem die Bindungsstellen für das listerielle ActA und Stathmin, einem zellulären Phosphoprotein.

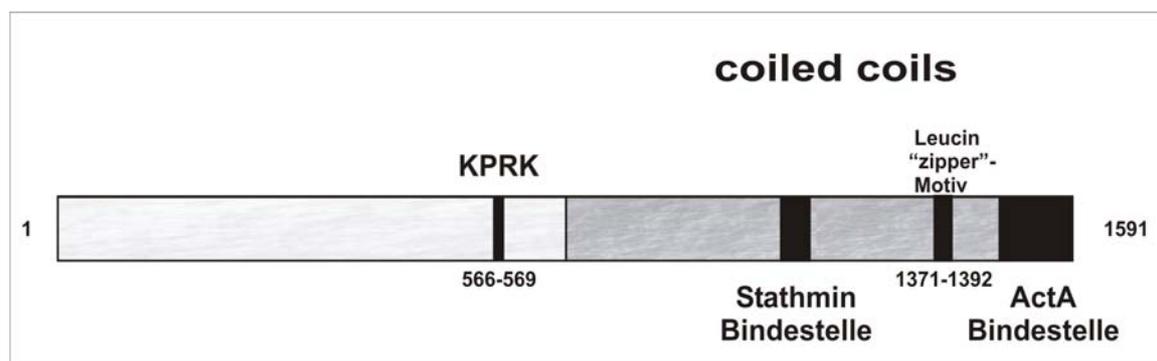


Abb. 5: Schematische Struktur des zellulären Kernproteins LaXp180 (aus Bauer *et al.*, 2003). Im N-Terminus befindet sich die Kernimportsequenz KRPK. Im C-terminalen Bereich liegen die Bindestellen für ActA und Stathmin, einem zellulären Phosphoprotein. Hellgraue Fläche: N-terminale Hälfte. Dunkelgraue Fläche: C-terminale Hälfte.

Immunfluoreszenzanalysen zur intrazellulären Verteilung von LaXp180 mit einem anti-LaXp180-Antiserum ergaben, dass LaXp180, wie für ein putatives Kernprotein zu erwarten, im Kern lokalisiert ist. Es konnte jedoch auch in geringen Mengen im Zytoplasma der Zelle nachgewiesen werden (Pfeuffer *et al.*, 2000). Das Aktingerüst wurde von dem Antiserum nicht erkannt. Immunfluoreszenzanalysen *L. monocytogenes*-infizierter Zellen zeigten, dass LaXp180 mit intrazellulären Bakterien kolokalisiert (Abb. 7 A). Dass diese Interaktion von der *actA*-Expression der Listerien abhängt, wurde mit Hilfe einer Mutante gezeigt, der das *actA*-Gen fehlt. Bakterien dieses $\Delta actA$ -Stammes (A49) konnten zwar intrazellulär wachsen, wurden jedoch vom anti-LaXp180-Antiserum nicht angefärbt (Pfeuffer *et al.*, 2000). Extrazelluläre Listerien bzw. Listerien in Flüssigkultur wurden von dem anti-LaXp180-Antiserum nicht gebunden. In Doppelimmunfluoreszenzanalysen mit einem anti-LaXp180-Antiserum und FITC-Phalloidin wurden sowohl LaXp180, als auch F-Aktin angefärbt. In der Überlagerung der beiden Färbungen zeigte sich deutlich, dass beide Proteine an die Oberfläche der Listerien rekrutiert werden, sich aber gegenseitig

ausschließen. LaXp180 interagiert nur dort mit der listeriellen Oberfläche, an der kein F-Aktin rekrutiert ist, also an dem Bakterienpol, der dem Aktin-Schweif gegenüberliegt (Pfeuffer *et al.*, 2000; Abb. 6 B).

Mit Hilfe von ActA- und LaXp180-Deletionsanalysen wurde untersucht, welche Regionen des jeweiligen Proteins für eine Interaktion der beiden Proteine essentiell sind (Bauer *et al.*, 2003). LaXp180 interagiert über die letzten 137 AS seines C-Terminus mit der PRR-Region des listeriellen Proteins wobei hauptsächlich die PRR 2 und 3 eine Rolle spielen. Für VASP wurde ebenfalls diese Region von ActA als Interaktionsdomäne beschrieben (Ball *et al.*, 2000). Offensichtlich konkurrieren LaXp180 und VASP um die gleiche Bindestelle. Dadurch könnte die asymmetrische Verteilung und wechselseitige Ausschließung der beiden Proteine LaXp180 und F-Aktin auf der Oberfläche intrazellulärer Listerien erklärt werden. Es ist bekannt, dass ActA auf der gesamten Bakterienoberfläche verteilt ist und in der Wirtszelle phosphoryliert wird (Brundage *et al.*, 1993). Die Affinität von VASP könnte sich auf phosphoryliertes bzw. nicht-phosphoryliertes ActA beschränken, wodurch es nur an dem Bakterienpol bindet, an dem die Aktin-Polymerisation erfolgt (Chakraborty *et al.*, 1995). Da VASP als Tetramer bindet, wird diskutiert dass die Bindung von LaXp180 an dieser Stelle sterisch inhibiert sein könnte und nur dort erfolgen kann, wo kein VASP gebunden ist. Diese These setzt jedoch voraus, dass es Unterschiede zwischen den ActA Molekülen auf der Oberfläche der Listerien gibt, was bislang noch nicht nachgewiesen werden konnte.

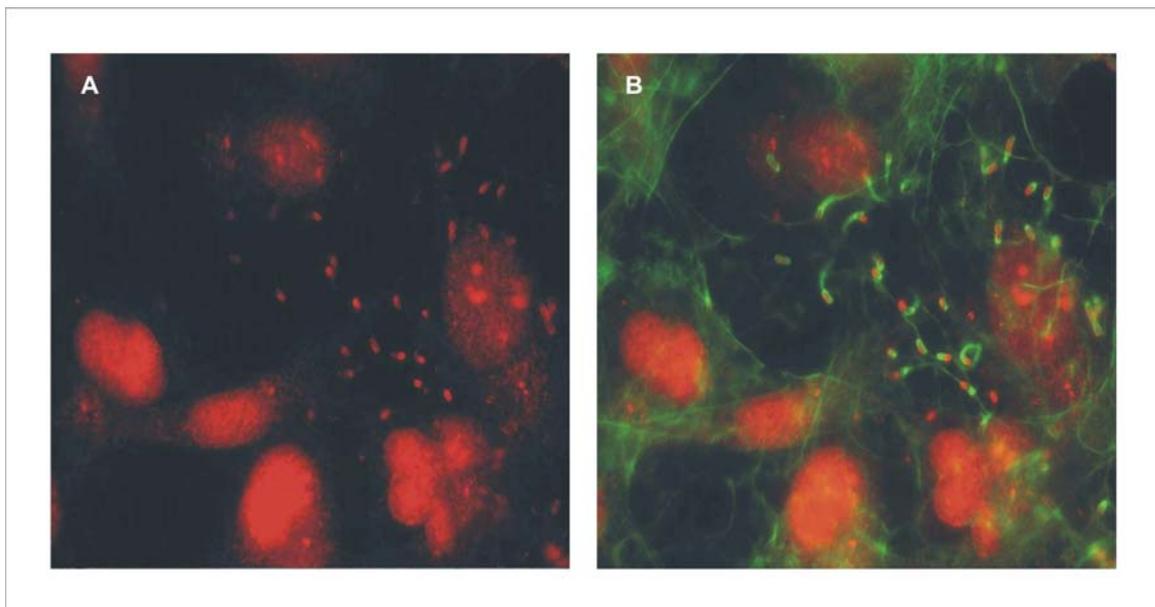


Abb. 6: Immunfluoreszenzanalysen der intrazellulären Verteilung von LaXp180 in *L. monocytogenes* EGD-infizierten Cos-1 Fibroblasten 4 h p. I.

A: Färbung mit dem anti-LaXp180-Serum in der Rotfluoreszenz. Wie deutlich zu sehen, färbt das anti-LaXp180-Antiserum die Zellkerne sowie definierte Bereiche neben den Kernen. Im Zytoplasma sind intrazelluläre Listerien angefärbt **B:** Überlagerung der Rotfluoreszenz des anti-LaXp180-Anti-serums und der FITC-Phalloidin-Färbung. Die Zellkerne, das Aktingerüst der Zelle sowie intrazelluläre Listerien, mit und ohne Aktin-Schweif, sind deutlich zu erkennen (aus Pfeuffer *et al.*, 2000),

Yeast Two-Hybrid Analysen haben ergeben, dass LaXp180 über einen kurzen Bereich seiner coiled-coils an das Phosphoprotein Stathmin bindet (Maucuer *et al.*, 1995).

2.4 Stathmin

Das zelluläre Phosphoprotein Stathmin, auch p18, 19K, Metablastin, Onkoprotein18, LAP18 oder Op18 genannt (Marklund *et al.*, 1996), spielt eine wichtige Rolle für den korrekten Durchlauf des Zellzyklus. Es ist der Prototyp einer Familie Mikrotubuli-regulierender Proteine, zu der auch die neuronalen Proteine SCG10, SCLIP, RB3 und dessen Spleißvarianten RB3' und RB3'' gehören. Seine Hauptfunktion liegt darin, über die Polymerisation und Depolymerisation von Mikrotubuli (MT) die Prozesse der Mitose zu regulieren (Ozon *et al.*, 1997; Riederer *et al.*, 1997; Gavet *et al.*, 1998). Abgesehen von ihrer Rolle bei der Mitose sind MT während der Interphase unter anderem bedeutend für den zellulären Transport, Zell-Motilität, Zell-Polarität und Zell-Stabilität. Inwiefern Stathmin an diesen Prozessen durch Regulation der Interphase-MTs beteiligt ist, konnte bislang nicht gezeigt werden (Rubin und Atweh, 2004). Es konnte außerdem sowohl in gesunden, als auch in malignen Zellen eine Verbindung zwischen der Stathmin-Expression und Zell-Proliferation nachgewiesen werden (Hanash *et al.*, 1988; Luo *et al.*, 1991; Rubin und Atweh, 2004).

Stathmin spielt nicht nur im Zusammenhang mit Mikrotubuli eine Rolle. Mehrere Beobachtungen weisen darauf hin, dass es die Hormonsekretion der Hirnanhangsdrüse bei Nagetieren reguliert. Eine Rolle während der Spermatogenese wird ebenfalls diskutiert, da hohe Stathmin-Mengen im Hoden auf bestimmte Entwicklungsstadien der Keimzellen beschränkt sind (Rubin und Atweh, 2004). Während des Neuriten-Wachstums und der Synapsen-Bildung wurde eine deutlich erhöhte Stathmin-Konzentration nachgewiesen. Demnach hat Stathmin auch eine Funktion während der neuronalen Differenzierung (Di Paolo *et al.*, 1997). Interessanterweise und trotz aller wichtigen entwicklungsbiologischen Funktionen, die Stathmin zugeschrieben werden, entwickeln sich die von Schubart *et al.* konstruierten Stathmin knock-out Mäuse, abgesehen von leichter Wachstumsverzögerung im Vergleich zu wild-typischen C57BL/6 Mäusen, normal (Schubart *et al.*, 1996; diese Arbeit).

Stathmin besteht aus zwei Domänen: der N-terminalen regulatorischen Domäne mit vier phosphorylierbaren Serinresten (Ser16, Ser25, Ser38 und Ser63) und einer C-terminalen α -helikalen Interaktionsdomäne, die über so genannte coiled-coils Wechselwirkungen mit anderen Proteinen eingeht (Gavet *et al.*, 1998, Abb. 7). Die Hauptfunktion von Stathmin besteht darin, die Mikrotubuli-Dynamik im Verlauf des Zellzyklus zu regulieren, indem es an polymerisiertes oder unpolymerisiertes Tubulin bindet und so entweder die Polymerisierung der $\alpha\beta$ -Tubulinheterodimere hemmt oder die Depolymerisierung der MT fördert. Zwei separate Studien konnten zeigen, dass Stathmin mit zwei parallel angeordneten $\alpha\beta$ -Tubulinheterodimeren einen trimeren Komplex bildet. Die Interaktion von Stathmin und $\alpha\beta$ -Tubulinheterodimeren erfolgt dabei jeweils mit der α -Tubulin-Untereinheit (Mitchison *et al.*, 1996; Howell *et al.*, 1999). Der Aktivitätszustand von Stathmin wird in Abhängigkeit von externen und internen Signalen mittels Phosphorylierung reguliert. Als Antwort auf externe Signale wie Calcium, Hitzeschock oder chemischen Stress wird Stathmin durch spezifische Kinasen in bestimmten Kombinationen phosphoryliert und dadurch inaktiviert (Lovric *et al.*, 1998; Marklund *et al.*, 1994). Zu diesen Kinasen gehören unter anderem Mitglieder der Familie von MAP-Kinasen ("mitogen activated protein") (Beretta *et*

al., 1993), Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Kinasen (Marklund *et al.*, 1994), cAMP-abhängige Proteinkinasen (Gradin *et al.*, 1998) und Proteinkinase A (PKA) (Schubart *et al.*, 1987; Beretta *et al.*, 1993). Interne Signale führen beim Durchlaufen des Zellzyklus zur Aktivierung mehrerer Kinasen, darunter die Kinase p34^{cdc2} , was ebenfalls die Phosphorylierung aller vier Serin-Reste zur Folge hat (Beretta *et al.*, 1993; Luo *et al.*, 1994). Durch diese Hyperphosphorylierung wird ermöglicht, dass Zellen von der G_1 -Phase in die Mitose-Phase übergehen und sich die Mitosespindel ausbildet (Larsson *et al.*, 1997). Entsprechend führt eine Dephosphorylierung und die dadurch erfolgende Reaktivierung von Stathmin durch eine okadainsäuresensitive Phosphatase zur Auflösung der mitotischen Spindel und zum Abschluss der Zellteilung.

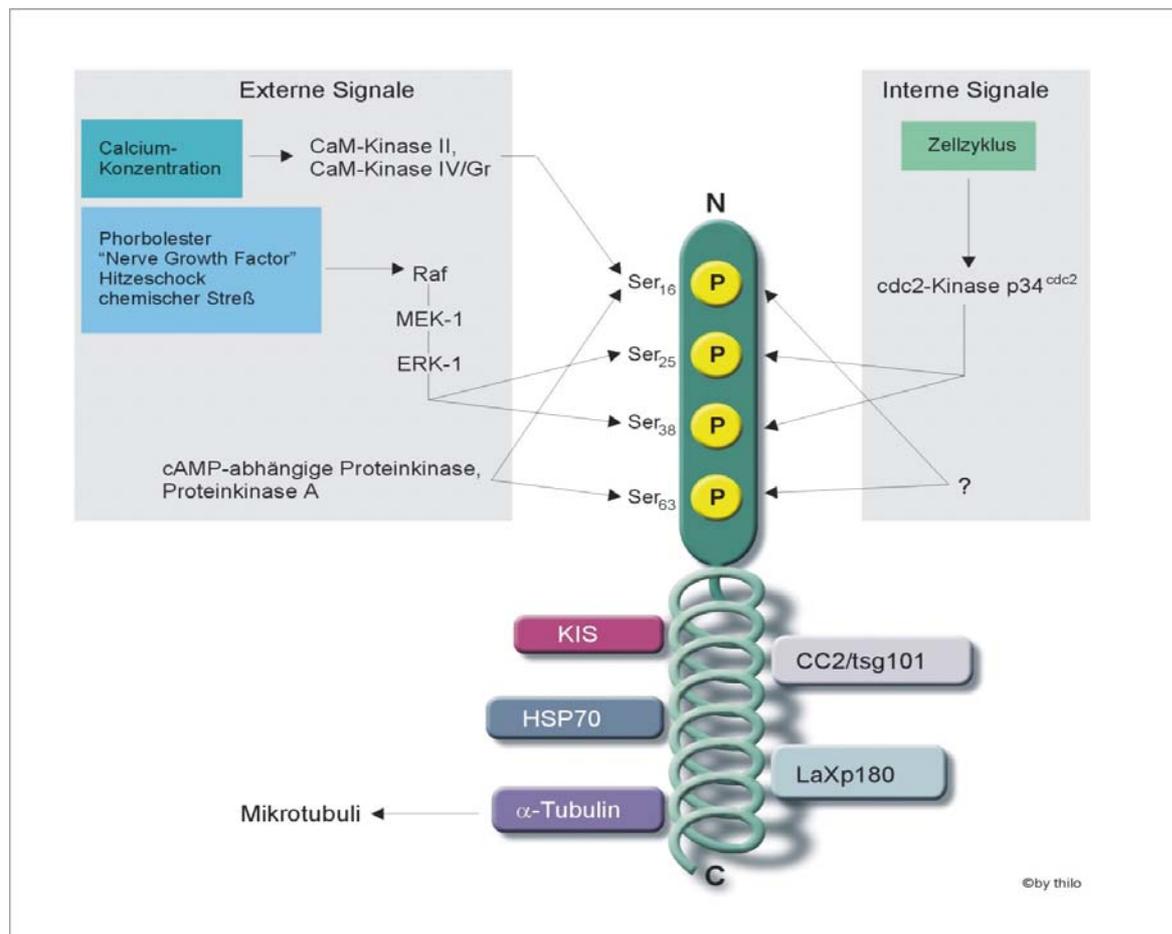


Abb. 7: Schematische Darstellung von Stathmin (aus Pfeuffer, 2000). Die Phosphorylierung der vier Serinreste im N-Terminus kann sowohl über Externe, als auch über interne Signale erfolgen. Wechselwirkungen mit anderen Proteinen erfolgen über die coiled-coil Struktur des C-Terminus. KIS: "kinase interacting with stathmin"; CC2/tsg101: "tumor susceptibility protein"; HSP70: "heat shock protein 70";

Wie wichtig Stathmin für ein erfolgreiches Durchlaufen des Zellzyklus ist, wurde anhand mehrerer Arbeiten ersichtlich. Die Expression einer konstitutiv aktiven Form von Stathmin arretiert Zellen in frühen Stadien der Mitose: Die Chromosomen werden in diesen Zellen nicht in der Metaphase-Platte angeordnet, sondern sind willkürlich verteilt, da sich der Spindelapparat nicht ausbilden kann. Eine Hemmung der Stathmin-Aktivität hingegen beeinträchtigt die Funktion der Spindel erst in späteren Stadien der Mitose, wodurch der Austritt

aus der M-Phase und die anschließende Zytokinese verhindert werden (Rubin und Atweh, 2004).

Da Stathmin und LaXp180 als Interaktionspartner identifiziert wurden, wurde an mit *L. monocytogenes* EGD infizierten Cos-1 Fibroblasten überprüft, ob Stathmin *in vitro* wie LaXp180 an die Oberfläche intrazellulärer Listerien rekrutiert wird. Die Immunfluoreszenzanalyse mit einem anti-Stathmin-Antikörper ergab, dass Stathmin wahrscheinlich über die Interaktion mit ActA-gebundenem LaXp180 mit den intrazellulären Bakterien kolokalisiert (Pfeuffer *et al.*, 2000; Abb. 8 A). Es wurde, wie auch schon bei der Färbung mit dem anti-LaXP180-Antikörper, keine symmetrische Anfärbung der Bakterien beobachtet. Die Rekrutierung von Stathmin an die bakterielle Oberfläche wurde als ActA-abhängig befunden, da für eine *actA* Deletionsmutante keine Kolokalisation mit Stathmin nachzuweisen war (Pfeuffer *et al.*, 2000; Abb. 8 B).

Aufgrund der Annahme, dass Stathmin über LaXp180 indirekt mit ActA und somit mit den Listerien interagiert wurde postuliert, dass die Bakterien nicht nur einen Einfluss auf die Aktinpolymerisation haben, sondern auch in die Dynamik der MT eingreifen. Es ist bekannt, dass die Aufnahme von *L. monocytogenes* in Endothelzellen (Greiffenberg *et al.*, 1998), Makrophagen (Kuhn, 1998) und Dendritische Zellen (Guzman *et al.*, 1995) durch MT-destabilisierende Agenzien wie Nocodazol gehemmt wird. In Fibroblasten führt eine Nocodazol-Behandlung zum schnellen Abbau des MT-Gerüsts und zur Bildung lamellipodienartiger Membranausstülpungen (Mikhailov und Gundersen, 1998). Unbekannt ist jedoch nach wie vor, ob und welche Rolle Stathmin hierbei spielt.

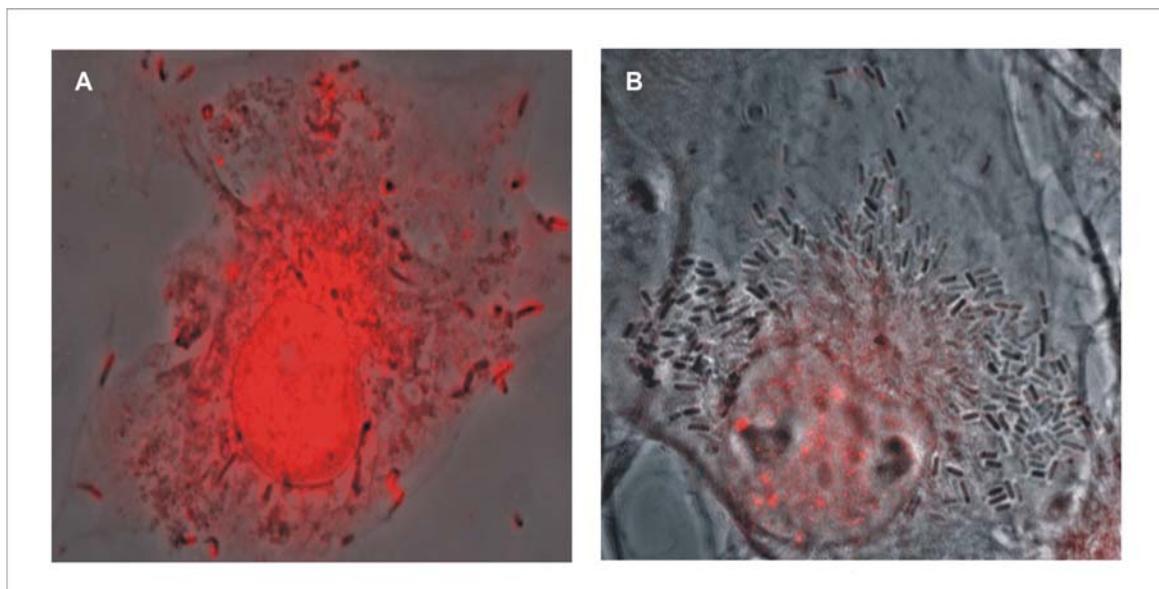


Abb. 8: Immunfluoreszenzanalyse der intrazellulären Verteilung von Stathmin in infizierten Cos-1 Fibroblasten.

A: *L. monocytogenes* EGD; **B:** *L. monocytogenes* A49 (aus Pfeuffer, 2000). Beide Abbildungen zeigen die Überlagerung von Phasenkontrast- und Rotfluoreszenz-Aufnahme.

Aufgrund dieser Daten wurde von Pfeuffer *et al.* folgende Hypothese über die Funktion von *L. monocytogenes*-gebundenem Stathmin aufgestellt: Stathmin bindet am vorderen Pol über LaXp180 an ActA und damit auf der dem Aktin-Schweif gegenüberliegenden Seite. Durch diese lokale Rekrutierung könnte Stathmin während der intra- und interzellulären Fortbewegung mit den Mikrotubuli interagieren und durch deren lokale Depolymerisation eine

effizientere Fortbewegung der Listerien ermöglichen. Bei eventuellem Kontakt mit der Zytoplasmamembran der Wirtszelle würde das submembrane MT-Gerüst lokal depolymerisiert und so die Ausbildung lamellipodienartiger Ausstülpungen mit den Bakterien an der Spitze in die Nachbarzelle hinein ermöglicht. (Pfeuffer *et al.*, 2000)

2.5 Bakterielle Zweikomponentensysteme

Bakterien besitzen die Fähigkeit, verschiedenste spezifische Umweltsignale wie die Verfügbarkeit von Stickstoff, Temperatur- und pH-Schwankungen, mangelndes Nährstoffangebot und eine abfallende Sauerstoffkonzentration in ihrem Umfeld zu registrieren und darauf zu reagieren. Diese Reaktionen resultieren meistens in einer veränderten Transkription verschiedener Gene. Ein Weg, mit dem Bakterien solche externen Stimuli in zelluläre Signale umwandeln, wird über Zweikomponentensysteme (TCS) vermittelt. Sie sind charakterisiert durch ein spezifisches Sensorprotein und einen dazugehörigen Response Regulator (RR). Das Sensorprotein besitzt Kinase-Aktivität und wird auch als Sensorkinase oder Histidinkinase (HK) bezeichnet (Hoch, 2000). Die sensorischen Komponenten der meisten Histidinkinasen sind sehr heterogen, um eine Vielzahl von Umweltstimuli wahrnehmen zu können. Sie besitzen zumeist eine Inputdomäne mit einem extrazellulären Teil und zwei Transmembrandomänen (TMD) sowie eine Autokinasedomäne, die oftmals auch als Transmitterdomäne bezeichnet wird. Es gibt jedoch auch zytoplasmatische HK wie CheA (Mutoh und Simon, 1986) und NtrB (MacFarlane und Merrick, 1985), die keine Transmembrandomänen enthalten. Diese Kinasen nehmen eingehende Reize über andere sensorische Komponenten wie z.B. PAS-Domänen auf.

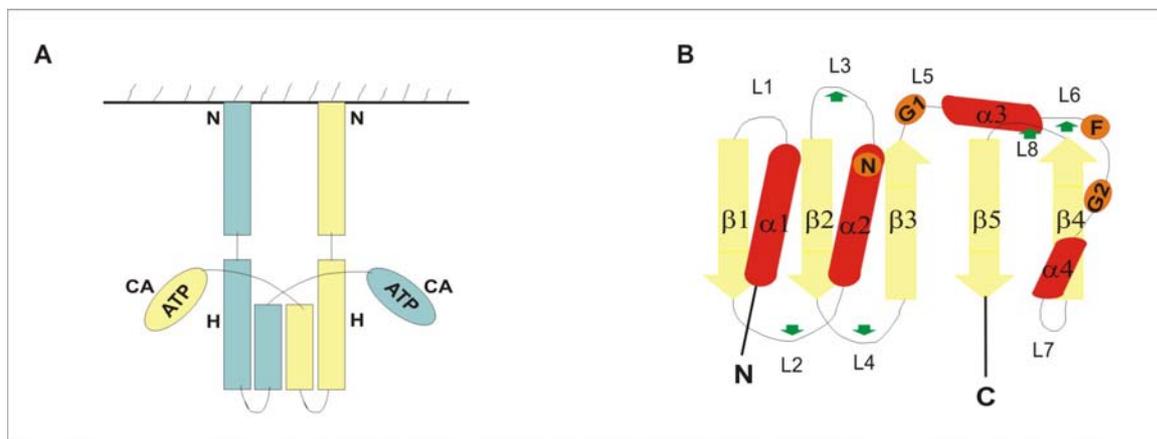


Abb.9: Schematische Modelle der Domänen-Organisation von Histidinkinasen (nach Dutta *et al.*, 1999).

A: Modell der zytoplasmatischen Autokinasedomäne. Die Phosphotransferdomäne bildet die Dimerisierungszone und ist Stelle der trans-Autophosphorylierung. Die beiden Monomere sind in unterschiedlichen Farben dargestellt **B:** α/β -Sandwich-Motiv der katalytisch aktiven ATP-bindenden Domäne eines HK-Monomers aus 5 antiparallelen β -Strängen (gelb) und 4 α -Helices (rot). N, G1, F und G2 (orange) repräsentieren konservierte Regionen, die für die ATP Bindung wichtig sind. Die mit grünen Pfeilen markierten Loops können strukturell variieren.

Eine Autokinasedomäne weist ca. 240 AS auf und besteht aus zwei Subdomänen, der den konservierten Histidin-Rest tragenden Phosphotransmitterdomäne, die meistens auch der Dimerisierungsdomäne entspricht und der

katalytischen ATP-Bindungsdomäne (Ronson *et al.*, 1997). Durch die Dimerisierung des Phosphotransmitters wird ein Bündel aus 4 α -Helices und zwei Histidinresten gebildet, wobei pro Transmitter jeweils zwei α -Helices und ein Histidinrest beigesteuert werden (Abb.9 A). Die Autophosphorylierung eines Histidins erfolgt durch Transphosphorylierung, d.h. jeweils durch die katalytische Aktivität der ATP-Bindungsdomäne der HK des anderen Monomers. Diese Domäne ist hoch konserviert und weist ein α/β -Sandwichstruktur aus 5 antiparallelen β -Strängen und 4 α -Helices auf (Tanaka *et al.*, 1998, Abb. 9 B). Die als N, G1, F und G2 bezeichneten Bereiche des α/β -Sandwich sind konserviert und enthalten Aminosäuren, die für die ATP-Bindung wichtig sind. Es gibt auch Histidinkinasen, wie im Falle des BvgS Systems von *Bordetella* spp., die mehr als nur eine Phosphodonor- und Phosphoakzeptorstelle aufweisen. Diese so genannten hybriden oder unorthodoxen HK führen einen mehrstufigen Phosphorelais aus (Foussard *et al.*, 2001).

Response Regulatoren weisen am N-Terminus eine regulatorische Receiverdomäne aus ca. 120 AS auf. Sie trägt den für die Signalübertragung durch Phosphorylierung wichtigen konservierten Aspartat-Rest und ist über einen Linker mit der C-terminalen, variablen Outputdomäne verbunden. Neben dem Aspartat befinden sich noch weitere konservierte Reste in der regulatorischen Domäne, meistens ein weiteres Aspartat (D), Threonin (T) oder Lysin (K). Sie bilden das aktive Zentrum des Response Regulators. Der Receiver besitzt eine α/β -Struktur aus 5 α -Helices, die um ein β -Faltblatt aus 5 parallelen β -Strängen angeordnet sind (Foussard *et al.*, 2001; Abb. 10). Manche RR wie CheY bestehen lediglich aus der Receiverdomäne ohne weitere Komponenten.

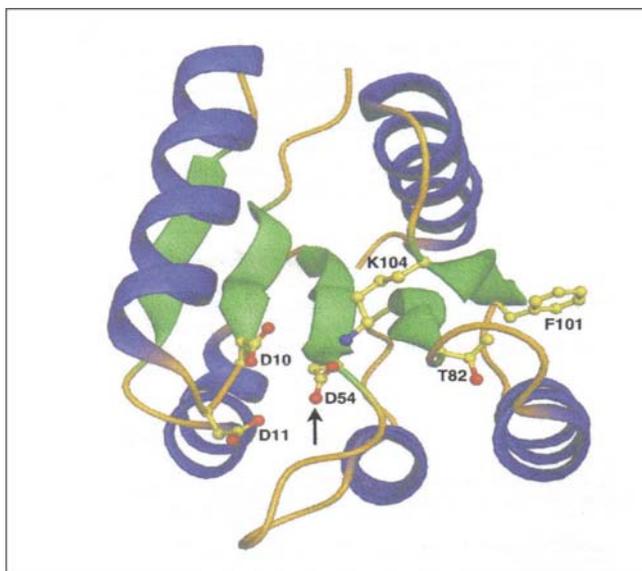


Abb. 10: Schematische Darstellung einer Receiver Domäne (aus Foussard *et al.*, 2001).

Die Seitenketten der 5 konservierten AS-Reste des aktiven Zentrums (D10, D11, D54, T82 und K104) sind dargestellt. Der Pfeil weist auf das phosphorylierbare Aspartat. α -Helices sind blau, β -Stränge grün und beide Motive verbindende Loops sind gelb dargestellt. D: Aspartat; K: Lysin; T: Threonin; F: Phenylalanin.

In Abb. 11 ist ein einfaches Zweikomponentensystem schematisch dargestellt. Wird von der Inputdomäne der HK ein externer Stimulus, wie z. B. ein verändertes Nährstoffangebot wahrgenommen, wird ATP an die ATP-bindende Untereinheit der Autokinase- bzw. Transmitterdomäne gebunden. Es kommt zur Hydrolyse des ATP und zur Autophosphorylierung des konservierten Histidins in der Phosphotransferdomäne der Autokinase. Die Phosphorylgruppe wird sodann auf einen konservierten Aspartat-Rest in der Receiverdomäne des Response Regulators übertragen. Im unphosphorylierten Zustand des Receivers ist die Outputdomäne des RR normalerweise sterisch inhibiert. Durch Phosphorylierung

der Regulatordomäne erfährt der RR eine Konformationsänderung, wodurch die Outputdomäne aktiviert wird und je nach System als Aktivator oder Repressor wirken kann. In den meisten Fällen wirken Response Regulatoren als Transkriptionsfaktoren und aktivieren die Expression von Genen, deren Produkte für das Überleben der Bakterien unter den veränderten Umweltbedingungen notwendig sind. RR wirken aber nicht nur als Transkriptionsaktivatoren. Sie können auch direkt mit anderen Proteinen interagieren und dadurch deren Aktivität regulieren oder, wie im Falle von CheY, die Rotationsrichtung der Flagelle beeinflussen (Hoch *et al.*, 2000). Inaktiviert wird ein Response Regulator durch Dephosphorylierung mittels einer Phosphatase. In vielen Fällen wirkt der RR selbst als Phosphatase, in anderen Systemen ist ein drittes, unabhängiges Protein beteiligt (Madigan *et al.*, 1997). Im Falle des Sporulationssystems von *Bacillus subtilis* wird Spo07 sogar von drei verschiedenen Phosphatasen inaktiviert (Perego *et al.*, 1994).

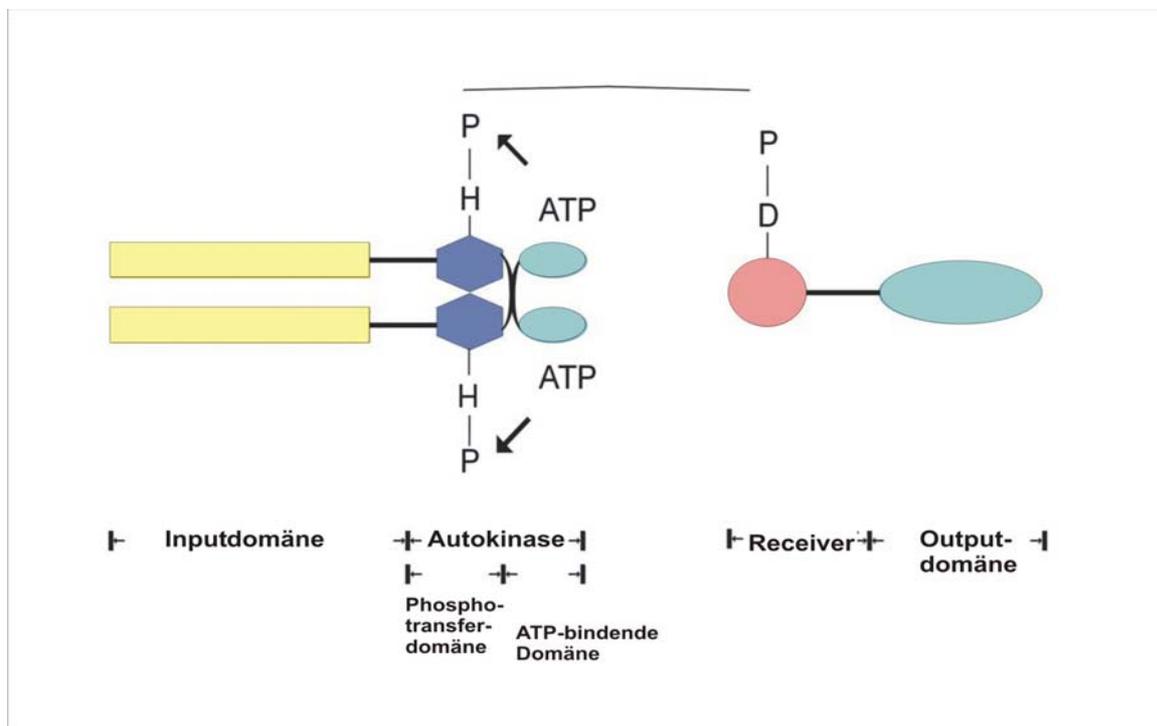


Abb. 11: Schematische Darstellung eines prokaryotischen Zweikomponentensystems (nach Hoch *et al.*, 2000).

Ein an der Inputdomäne eingehender Stimulus führt zur Aktivierung der Autokinase. Das führt zur Hydrolyse von ATP und Phosphorylierung des konservierten Histidins (H) der Phosphotransferase-Subdomäne. Die Phosphorylgruppe wird auf den konservierten Aspartatrest (D) der Receiverdomäne des RR übertragen, wodurch dessen Outputdomäne eine Konformationsänderung erfährt und aktiviert wird.

2.6 Zweikomponentensysteme von *L. monocytogenes*

Durch die Entschlüsselung der kompletten genomischen Sequenz von *L. monocytogenes* (Glaser *et al.*, 2001) wurden 2853 für Proteine codierende Gene identifiziert, von denen viele eine Homologie zu Genen von *Bacillus subtilis* aufweisen. Ausgehend davon wurden die listeriellen Gene nach für *B. subtilis* definierten, funktionellen Kategorien klassifiziert. Das Genom weist mit 7,3 % einen sehr hohen Anteil an Transkriptionsregulatoren auf. Bisher konnte nur für

Pseudomonas aeruginosa ein höherer Anteil an regulatorischen Genen identifiziert werden (Stover *et al.*, 2000).

L. monocytogenes besitzt insgesamt 15 bzw. 16 offene Leseraster (ORFs), die für Histidinkinasen und korrespondierende Response Regulatoren kodieren (Glaser *et al.*, 2001; s. Tab. 1). Zieht man die Genomgröße in Betracht so besitzt *L. monocytogenes* mit 2,944,528 bp in etwa so viele Zweikomponentensysteme wie *B. subtilis* (4.214.810 bp; 34 TCS; Kunst *et al.*, 1997) und *E. coli* (4.639.221 bp; 35 TCS; Blattner *et al.*, 1997). Es weist dagegen deutlich mehr TCS auf als Pathogene mit einem engeren Wirtsspektrum wie z. B. *Mycobacterium tuberculosis* (4,411,529 bp; 11 TCS; Cole *et al.*, 1998) oder *Neisseria meningitidis* (4,214,810 bp; 5 TCS; Tettelin *et al.*, 2000). Diese hohe Zahl an Signaltransduktionssystemen spiegelt die hohe Anpassungsfähigkeit von *L. monocytogenes* an verschiedenste ökologische Nischen und Umwelteinflüsse wieder.

Listerielle Zweikomponentensysteme wurden bisher nicht eingehend untersucht. In Tabelle 1 sind alle identifizierten HK und RR aufgelistet. Die Nomenklatur beruht dabei, wie bei vielen anderen listeriellen Proteinen auch, auf der großen Sequenzhomologie einzelner Response Regulatoren und Histidinkinasen zu bereits charakterisierten Zweikomponentensystemen anderer Spezies. Die bisher beschriebenen RR und HK von *L. monocytogenes* wurden von verschiedenen Arbeitsgruppen identifiziert und charakterisiert. Einige Gene und somit auch deren Produkte wurden inzwischen umbenannt. Die in dieser Arbeit verwendeten Bezeichnungen für Zweikomponentensysteme und Identifikationsnummern der einzelnen Gene entsprechen, insofern nicht anders angegeben, der zum Zeitpunkt der Erstellung dieser Arbeit in ListiList angegebenen Bezeichnung (<http://genolist.pasteur.fr/ListiList/>).

Histidin Kinase	Response Regulator	Homologe TCS
AgrC (<i>Imo0050</i>)	AgrA (<i>Imo0051</i>)	AgrA/AgrC <i>Staphylococcus aureus</i>
YycG (<i>Imo0288</i>)	YycF (<i>Imo0287</i>)	YycG/YycF <i>B. subtilis</i>
CheA (<i>cheA</i>)	CheY (<i>cheY</i>)	CheA/CheY
Lmo1021 (<i>Imo1021</i>)	Lmo1022 (<i>Imo1022</i>)	
Lmo1061 (<i>Imo1061</i>)	Lmo1060 (<i>Imo1060</i>)	
Lmo1173 (<i>Imo1173</i>)	Lmo1172 (<i>Imo1172</i>)	
LisK (<i>Imo1378</i>)	LisR (<i>lisR</i>)	CssK/CssR <i>Lactococcus pyogenes</i>
Lmo1508 (<i>Imo1508</i>)	Lmo1507 (<i>Imo1507</i>)	
Lmo1741 (<i>Imo1741</i>)	Lmo1745 (<i>Imo1745</i>)	
ResE (<i>Imo1947</i>)	ResD (<i>Imo1948</i>)	ResE/ResD <i>B. subtilis</i>
Lmo2011 (<i>Imo2011</i>)	Lmo2010 (<i>Imo2010</i>)	
CesK (<i>Imo2421</i>)	CesR (<i>Imo2422</i>)	VanS/VanR <i>Enterococcus faecium</i>
PhoR (<i>phoR</i>)	PhoP (<i>phoP</i>)	PhoR/PhoP <i>E. coli</i>
	DegU (<i>Imo2515</i>)	DegS/DegU <i>B. subtilis</i>
Lmo2582 (<i>Imo2582</i>)	Lmo2583 (<i>Imo2583</i>)	
KdpD (<i>Imo2679</i>)	KdpE (<i>Imo2678</i>)	KdpD/KdpE <i>E.coli</i>

Tab. 1: Übersicht über Histidin Kinasen und Response Regulatoren von *L. monocytogenes* EGD. In Spalte drei sind die TCS anderer Bakterien angegeben, zu denen starke Homologie besteht. Die HK und RR sind mit den Bezeichnungen versehen, die im Laufe dieser Arbeit verwendet werden. In Klammern steht jeweils die Bezeichnung des entsprechenden codierenden Gens, wie sie zum Zeitpunkt der Erstellung dieser Arbeit in ListiList annotiert war (<http://genolist.pasteur.fr/ListiList/>).

Die ersten listeriellen TCS sind bereits vor der Entschlüsselung des Genoms identifiziert und charakterisiert worden. Zu diesen zählen die Zweikomponentensysteme CheA/Y (Dons *et al.*, 1994) und LisR/K (Cotter *et al.*, 1999). CheA/Y reguliert die Chemotaxis der Bakterien. Durch die Interaktion von phosphoryliertem CheY mit den Mot-Proteinen der Flagelle wird die Rotationsrichtung der Flagelle reguliert und dadurch das Schwimmverhalten der Bakterien beeinflusst. Das LisR/K-System reguliert Gene, die Toleranz für Säure und Alkohol vermitteln. Die Deletion des Gens, welches für die HK LisK codiert, führt zu einem avirulenten Phänotyp dieses Deletionsstammes in der Maus, was impliziert, dass das LisR/K-System eine Rolle für die Virulenz von *L. monocytogenes* in der Maus spielt (Cotter *et al.*, 1999).

Kallipolitis *et al.* konnten in einem auf PCR basierenden Ansatz neben den bereits beschriebenen RR-Genen *lisR* und *cheY* neue putative RR-Gene identifizieren, die starke Homologie zu bereits bekannten RR von *E. coli*, *Bacillus spp.* oder *Enterococcus spp.* aufweisen wie z. B. *ycyF*, *kdpE*, *phoP*, *cesR* und die Teilsequenz eines *resD*-Homologs (Kallipolitis *et al.*, 2001). Für die RR KdpE und CesR konnte gezeigt werden, dass sie für die Virulenz und das Wachstum der Listerien unter Stressbedingungen eine Rolle spielen. Das listerielle *kdpE*-Genprodukt ist homolog zum KdpE-Protein von *E. coli*, wo es mit seiner HK als Osmoregulator fungiert und die Expression eines hoch-affinen Kalium-Transportsystems reguliert (Polarek *et al.*, 1992). Inwiefern es auch bei *L. monocytogenes* an der Osmoregulation beteiligt ist, wurde noch nicht genauer untersucht. CesR ist homolog zum *vanR*-Genprodukt von *Enterococcus faecalis*, wo es unter anderem die Vancomycin-Resistenz reguliert (Morel-Deville *et al.*, 1998). In *L. monocytogenes* scheint CesR jedoch eine andere Rolle zu übernehmen, da für eine *cesR*-Mutante nur eine geringfügig veränderte Toleranz gegenüber Vancomycin nachgewiesen werden konnte (Kallipolitis *et al.*, 2001).

Das listerielle YcyF/G-TCS ist homolog zum gleichnamigen System von *B. subtilis*. Es ist in *B. subtilis* essentiell und wahrscheinlich daran beteiligt, die Expression des Operons *ftsAZ* zu regulieren (Fukuchi *et al.*, 2000). *ftsAZ* kodiert für Proteine, die an der Zellteilung beteiligt sind. *ycyF* scheint auch in *L. monocytogenes* eine Rolle für die Lebensfähigkeit zu tragen da sich der Versuch, dieses Gen zu inaktivieren, als letal für die Bakterien erwies (Kallipolitis *et al.*, 2001; Williams *et al.*, 2005).

Die AS-Sequenz von PhoP ist zu 67 % identisch mit der Sequenz von *B. subtilis* PhoP, bei dem es zusammen mit seiner HK PhoS als Phosphatsensor fungiert und die Expression des *phoD*-Operons reguliert (Müller *et al.*, 1997). Bisher konnte noch nicht geklärt werden, ob dieser RR in *L. monocytogenes* ebenfalls an der Regulation der zellulären Antwort auf Phosphat-Mangelbedingungen beteiligt ist.

Der listerielle *agr*-Lokus konnte kürzlich über Transposon-Mutagenese identifiziert und charakterisiert werden (Autret *et al.*, 2003). Das RR-Gen *agrA* kodiert für ein Protein, das zum RR AgrA aus *Staphylococcus aureus* stark homolog ist. Dieser RR wurde zusammen mit seiner HK in *S. aureus* schon eingehend untersucht. Er ist dort an der Virulenzregulation beteiligt und an der Vermittlung des Quorum-Sensings (Autret *et al.*, 2003). In *L. monocytogenes* führte die Inaktivierung von *agrA* zu einer reduzierten Virulenz in der Maus, ohne jedoch das intrazelluläre Überleben in Zellkultur zu beeinträchtigen. Demnach scheint dieser Locus die Pathogenität der Listerien nur indirekt zu beeinflussen.

Der isolierte Response Regulator DegU von *L. monocytogenes* ist stark homolog zum gleichnamigen RR des TCS DegU/S aus *B. subtilis*, wo es neben der Regulation der Expression von Genen für Abbauenzyme und natürliche Kompetenz die Expression des *fla-che* Operons reprimiert. Das *fla-che* Operon kodiert für Proteine, die die Motilität der Bakterien regulieren und an der Synthese der Flagelle beteiligt sind. Außerdem reguliert das TCS DegU/S bei *B. subtilis* die Transkription der späten Kompetenz-Gene und die Produktion von Exoenzymen (Amati *et al.*, 2004). In *L. monocytogenes* ist DegU ebenfalls an der Regulation der Motilität beteiligt. Es konnte gezeigt werden, dass es einen großen Einfluss auf die Synthese von Flagellen ausübt und zur Virulenz der Bakterien beiträgt (Knudsen *et al.*, 2004; Williams *et al.*, 2005). Im Gegensatz zum DegU von *B. subtilis* ist dieser RR in *L. monocytogenes* jedoch nicht mit einer HK gekoppelt, da *degU* nicht in unmittelbarer Nähe zu einem für eine HK codierenden Gen liegt.

2.7 Motilität und Flagellensynthese

In *L. monocytogenes* sind Virulenz und Motilität wie auch bei vielen anderen pathogenen Bakterien thermoregulierte Prozesse (Dons *et al.*, 1992; Johansson *et al.*, 2002). Bei Temperaturen $\leq 30^\circ \text{C}$, die meist ein Vorkommen außerhalb eines Wirtes repräsentieren, werden bei den meisten *L. monocytogenes*-Stämmen die PrfA-regulierten Virulenzgene nicht exprimiert. Der Grund für die Inaktivität des Virulenzgenclusters bei niederen Temperaturen ist dessen bereits angesprochene posttranslationale Regulation durch einen untranslatierten mRNA-Bereich des *prfA*-Transkriptes. Bei höheren Temperaturen hingegen wird dieser inhibitorische Effekt aufgehoben und die Virulenzgene können exprimiert werden (Leimeister-Wächter *et al.*, 1992; Johansson *et al.*, 2002). Auf die Motilität wirkt sich die Temperatur genau andersherum aus: bei Temperaturen $< 30^\circ \text{C}$ sind die meisten Stämme von *L. monocytogenes* mehrfach peritrich flagelliert und beweglich, während sie bei 37°C normalerweise unbeweglich sind (Gründling *et al.*, 2004; Dons *et al.*, 2004). Dies ist darauf zurückzuführen, dass bei Temperaturen, die der Körpertemperatur eines Säugetier-Wirtes entsprechen, die Transkription von *flaA* herunterreguliert wird. *flaA* codiert für Flagellin, dem Hauptstrukturprotein der Flagelle. Es wird spekuliert, dass die Regulation von *flaA* *in vivo* ein adaptiver Mechanismus der Bakterien ist, um der Erkennung durch das Immunsystem des Wirtes zu entgehen (Way *et al.*, 2004). Flagelline verschiedener Bakterien besitzen oft proinflammatorische Aktivität, die durch die Aktivierung des Toll Like Rezeptors 5 (TLR5) eine entsprechende Reaktion des Immunsystems nach sich ziehen (Way *et al.*, 2004). Es gibt jedoch auch laboradaptierte *L. monocytogenes*-Stämme, bei denen die Temperatursensitivität bezüglich der Flagellinsynthese weniger stringent ist. Diese Stämme sind auch bei 37°C beweglich und unterscheiden sich nicht von bei 24°C gezogenen Listerien. Sie weisen jedoch weniger Flagellen auf ihrer Oberfläche auf (Way *et al.*, 2004; Williams *et al.*, 2005).

Die apathogene Spezies *L. innocua*, die in ihrem Genom kein zu PrfA homologes Gen besitzt (Glaser *et al.*, 2001), weist ebenfalls eine temperaturabhängige Flagellensynthese auf. Demnach dürfte die Expression von *flaA* in *Listeria* spp. PrfA-unabhängig erfolgen. Als regulatorisches Protein der Flagellensynthese bei *L. monocytogenes* wird MogR (in ListList als Lmo0674 annotiert) diskutiert, da bei einer *L. monocytogenes* Δ *mogR*-Deletionsmutante eine drastisch veränderte

Expression von *flaA* beobachtet werden kann. Mittels Affinitätsreinigung wurde MogR als ein mit der Promotorregion von *flaA* interagierendes Protein identifiziert. Durch die Deletion von *mogR* unterbleibt in der Mutante eine Interaktion von MogR mit der Promotorregion von *flaA*. Dadurch erfolgt dessen Transkription temperaturunabhängig und ist gegenüber der des wildtypischen Stammes *L. monocytogenes* EGD deutlich erhöht (Gründling *et al.*, 2004).

Flagellen erstrecken sich sowohl bei Gram-positiven als auch bei Gram-negativen Bakterien von der Zytoplasmamembran ausgehend weit in den extrazellulären Raum hinein. Sie bestehen aus mehreren Untereinheiten, die zum Teil sehr komplex aufgebaut sind (Jones und Macnab, 1990). Flagellen fungieren zugleich als Fortbewegungsorganell und Protein-Export/Aufbau-Apparat. Der helikale Flagellenfaden befindet sich am Weitesten vom Zellkörper entfernt. Er besteht bei den meisten Bakterien aus mehr als 20.000 Molekülen eines einzigen Proteins, dem Flagellin. Eine Ausnahme hierzu stellen die Flagellen von *Caulobacter crescentus* dar. Sie bestehen aus mindestens 3 Arten von Flagellin (Ely *et al.*, 2000). Der Flagellenfaden ist über einen so genannten Knotenpunkt mit dem Flagellenhaken und über diesen mit dem Rotationsmotor der Zelle, dem Basalkörper, verbunden (Jones und Macnab, 1990; Ely *et al.*, 2000). Dieser verankert die Flagelle in der zytoplasmatischen Membran und dient gleichzeitig als Motor, der die Flagelle dreht. Er weist mit seiner hohlen, zylindrischen Form starke strukturelle Homologie zu Typ III Sekretionsapparaten pathogener Organismen auf und wird wie diese als putativer Exportapparat für Proteine diskutiert (Macnab, 2004). Flagellen werden in einer Folge komplizierter Schritte zusammengesetzt. Es sind bei *Salmonella* spp. und *E. coli* mehr als 40 Proteine am Aufbau einer funktionellen Flagelle beteiligt (Ely *et al.*, 2000; Abb. 12). Die als erstes synthetisierte Struktur des Flagellenapparates ist der MS-Ring des Basalkörpers, der sowohl bei Gram-negativen als auch bei Gram-positiven Bakterien vorkommt und in die zytoplasmatische Membran eingebettet ist. Um diesen MS-Ring herum wird der übrige Teil des Basalkörpers zusammengefügt. Die dafür nötigen strukturellen Einheiten werden über einen sec-abhängigen Transportweg über die innere Membran transportiert. Bei Gram-negativen Bakterien werden zwei weitere Ringe um den Stab eingebaut, die der Flagelle als Stütze dienen sollen. Bei Gram-positiven Flagellen sind dieser LPS- (L-) und Periplasma- (P-) Ring nicht notwendig, da die Flagelle hier durch die Dicke der Mureinschicht genug gestützt und stabilisiert wird. Sobald der Rotationsmotor komplett ist, werden die externen Elemente der Flagelle angefügt. Proteinuntereinheiten, die am Aufbau von Haken, Flagellenfaden und Filamentkappe beteiligt sind, fließen über den zentralen Kanal des Basalkörpers vom Zytoplasma nach Außen und verbinden sich in einem so genannten "self-assembly-Prozess" von selbst miteinander (Macnab, 2003). Am distalen Ende wird das Flagellenfilament durch ein Kappenprotein abgeschlossen. Für die Länge des Flagellenfadens gibt es im Gegensatz zum Haken keinen Kontrollmechanismus, die Anfügung von Flagellin an den bereits bestehenden Flagellenfaden geht kontinuierlich weiter. Mit dem Aufsetzen des Kappenproteins ist die Flagellen-synthese beendet und der Exportkanal nach außen verschlossen. So wird ein willkürliches Austreten von Proteinen aus der Zelle verhindert. Sollten durch Scherkräfte oder mechanische Fremdeinwirkung die Flagellen abbrechen, ist der Exportkanal wieder geöffnet und die Flagellensynthese bzw. Reparatur setzt ein bis erneut ein Kappenprotein aufgesetzt wird (Ely *et al.*, 2000; Macnab, 2004).

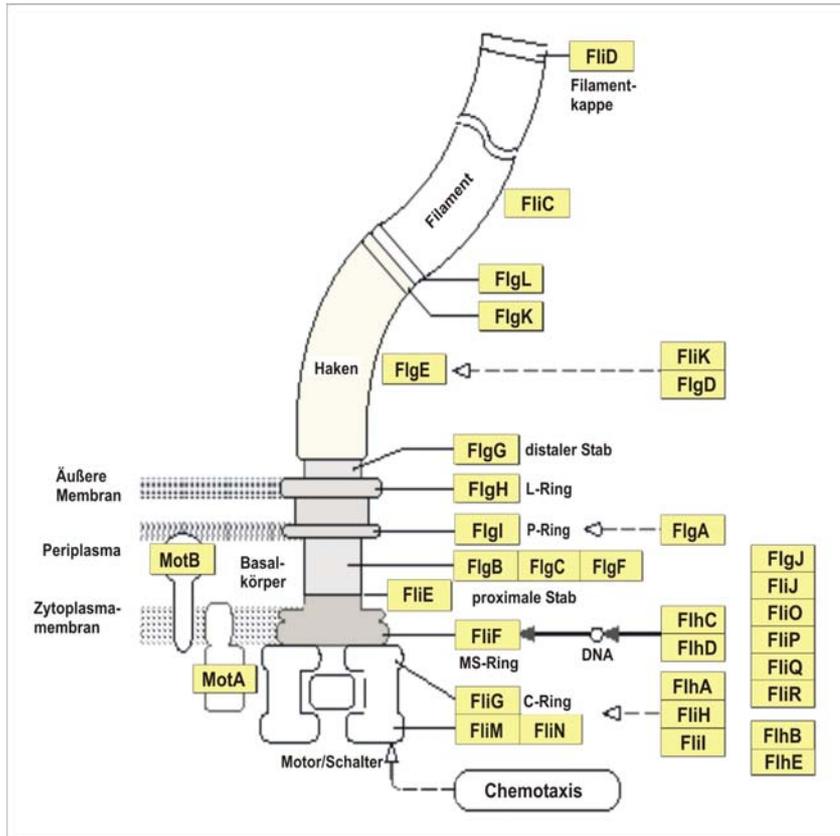


Abb. 12: Schematische Darstellung des Aufbaus der Flagelle von *E. coli* K12 (modifiziert nach Ely *et al.*, 2000). Die gelben Kästchen bezeichnen einige am Aufbau der Flagelle beteiligte Proteine.

2.8 Zielsetzung der Arbeit

In einer früheren Arbeit wurden die Expression des zellulären Phosphoproteins Stathmin sowie Unterschiede in dessen Aktivitätszustand in Abhängigkeit einer Infektion mit *L. monocytogenes* EGD untersucht. Mit den angewandten Methoden konnte jedoch keine signifikante Aussage darüber getroffen werden, ob und wie der Aktivitätszustand von Stathmin im Zuge einer Listerien-Infektion verändert wird.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte im ersten Teil überprüft werden, ob eine Infektion mit *L. monocytogenes* das Phosphorylierungsmuster von Stathmin beeinflusst. Außerdem sollte überprüft werden, ob an die Oberfläche der Listerien rekrutiertes Stathmin das Mikrotubuligerüst lokal depolymerisiert und für die Bakterien dadurch einen Vorteil bei der inter- und intrazellulären Fortbewegung entsteht. Mit Hilfe eines Stathmin knock-out Maus-Modells sollte zudem die Funktion von Stathmin bei einer Infektion mit Listerien *in vitro* und *in vivo* aufgezeigt werden. Es sollte eine Mutante konstruiert werden um zu überprüfen, ob Stathmin wirklich in Abhängigkeit von LaXp180 und ActA an die Oberfläche der Listerien rekrutiert wird.

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollten die noch uncharakterisierten listeriellen Zweikomponenten-Systeme eingehend untersucht werden. Es wurden hierzu 15 Mutanten konstruiert, in denen individuelle Gene deletiert wurden, die für Response Regulatoren codieren. In verschiedenen *in vitro* Experimenten sollte der Einfluss der einzelnen Deletionen auf das extrazelluläre und intrazelluläre Verhalten der Listerien untersucht und mit dem Verhalten wildtypischer Listerien verglichen werden. Im Mausmodell sollte überprüft werden, ob und wie sich die

Deletion der individuellen Response Regulatorgene auf die Pathogenität und Virulenz der Listerien ausüben.

Da sich im Zuge dieser Experimente der Deletionsstamm *L. monocytogenes* $\Delta degU$ als unflagelliert und stark virulenzattenuiert zeigte, sollte das Proteom dieses Stammes mit dem von *L. monocytogenes* EGD verglichen werden. Über massenspektrometrische Analyse sollten unterschiedlich exprimierte Proteine identifiziert werden. Durch anschließende Transkriptomanalysen sollten die Ergebnisse der Proteomanalysen verifiziert und noch weitere *degU* regulierte Gene identifiziert werden.

3 Material

3.1 Bakterienstämme

Bezeichnung	Beschreibung	Herkunft/Referenz
<i>L. monocytogenes</i> EGD Sv 1/2a	Wildtyp	S. H. E. Kaufmann, Max-Planck-Institut Berlin
<i>L. monocytogenes</i> EGDe	EGD-Derivat	Glaser <i>et al.</i> , 2001
<i>L. monocytogenes</i> A49	Deletion des <i>actA</i> -Gens	Hauf <i>et al.</i> , 1997
<i>L. monocytogenes</i> $\Delta 2$	Deletion der Gene <i>mpl</i> , <i>actA</i> , <i>plcB</i>	Z. Sokolovic, Universität Würzburg; Hauf <i>et al.</i> , 1997
<i>L. monocytogenes</i> $\Delta actAPRR2/3$	Deletion des PRR 2 und 3 von <i>actA</i>	S. Bauer, Universität Würzburg
<i>L. monocytogenes</i> $\Delta actA1$	Deletion der kompletten zentralen Region des <i>actA</i> -Gens	S. Bauer, Universität Würzburg
<i>L. monocytogenes</i> Δhly	Deletion des <i>hly</i> -Gens	D. A. Portnoy, Universität Berkeley; Jones und Portnoy, 1994
<i>L. monocytogenes</i> $\Delta plcB$	Deletion des <i>plcB</i> -Gens	Hauf <i>et al.</i> , 1997
<i>L. monocytogenes</i> $\Delta inlAB$	Deletion der Gene <i>inlA</i> und <i>inlB</i>	Greiffenberg <i>et al.</i> , 1997
<i>L. monocytogenes</i> $\Delta 51$	Deletion des <i>agrA</i> -Gens	Williams <i>et al.</i> , 2005
<i>L. monocytogenes</i> $\Delta 1022$	Deletion des <i>Imo1022</i> -Gens	Williams <i>et al.</i> , 2005
<i>L. monocytogenes</i> $\Delta 1060$	Deletion des <i>Imo1060</i> -Gens	Williams <i>et al.</i> , 2005
<i>L. monocytogenes</i> $\Delta 1172$	Deletion des <i>Imo1172</i> -Gens	Williams <i>et al.</i> , 2005
<i>L. monocytogenes</i> $\Delta 1507$	Deletion des <i>Imo1507</i> -Gens	Williams <i>et al.</i> , 2005
<i>L. monocytogenes</i> $\Delta 1745$	Deletion des <i>Imo1745</i> -Gens	Williams <i>et al.</i> , 2005
<i>L. monocytogenes</i> $\Delta 2010$	Deletion des <i>Imo2010</i> -Gens	Williams <i>et al.</i> , 2005
<i>L. monocytogenes</i> $\Delta 2583$	Deletion des <i>Imo2583</i> -Gens	Williams <i>et al.</i> , 2005
<i>L. monocytogenes</i> $\Delta kdpE$	Deletion des <i>kdpE</i> -Gens	Williams <i>et al.</i> , 2005
<i>L. monocytogenes</i> $\Delta cheY$	Deletion des <i>cheY</i> -Gens	Williams <i>et al.</i> , 2005
<i>L. monocytogenes</i> $\Delta degU$	Deletion des <i>degU</i> -Gens	Williams <i>et al.</i> , 2005
<i>L. monocytogenes</i> $\Delta resD$	Deletion des <i>resD</i> -Gens	Williams <i>et al.</i> , 2005
<i>L. monocytogenes</i> $\Delta cesR$	Deletion des <i>cesR</i> -Gens	Williams <i>et al.</i> , 2005
<i>L. monocytogenes</i> $\Delta phoP$	Deletion des <i>phoP</i> -Gens	Williams <i>et al.</i> , 2005
<i>L. monocytogenes</i> $\Delta lisR$	Deletion des <i>lisR</i> -Gens	Williams <i>et al.</i> , 2005
<i>E. coli</i> DH5 α	<i>deoR</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>hsdR17</i> ($r_k-m_k^+$), <i>recA1</i> , <i>relA1</i> , <i>supE44</i> , <i>lthi-1</i> , Δ (<i>lacZYA-ergFV169</i>)	Fa. Invitrogen (Gibco)

3.2 Plasmide

Bezeichnung	Beschreibung	Herkunft/Referenz
pLSV1	Mutageneseplasmid, Em ^R (<i>ermAM</i>), ori _{Gram-} , ori _{TS}	Wuenscher <i>et al.</i> , 1991
pUC18	Amp ^R (<i>bla</i>), P _{<i>lacZ</i>} - multiple Klonierungsstelle- <i>lacZ</i> , <i>oriE1</i>	Fa. Pharmacia
P _{<i>actA</i>} - <i>gfp</i>	P _{<i>actA</i>} -GFP (<i>mut2</i>)	Dietrich <i>et al.</i> , 1998
pUNK1	Em ^R (<i>ermAM</i>), ori pAM β 1, <i>repD</i> , <i>repE</i> , <i>oriE1</i>	Pilgrim, 2002

Material

pLSV101 verkleinertes pLSV1-Plasmid

Knuth, 2004

3.3 Zelllinien

Bezeichnung	Beschreibung	Herkunft
J774	makrophagenähnliche Zelllinie aus der Maus	ATCC: HTB-37
Cos-1	fibroblastenähnliche Zelllinie aus der grünen Meerkatze, SV40-transformiert	ATCC: CRL-1650
Caco-2	Humane epithelzellenähnliche Zelllinie, aus Dickdarm-Adenokarzinom	ATCC: HTB-37
L-929	fibroblastenähnliche Bindegewebszellen aus der Maus	Institut für Virologie und Immunologie, Würzburg
Primäre Knochenmarksmakrophagen	Makrophagen aus Oberschenkelknochen	Balb/c Mäuse, Harlan Winkelmann; C57BL/6 Mäuse, Harlan Winkelmann, eigene Zucht.

ATCC: „American Type Culture Collection“, Rockville, Maryland

3.4 Oligonukleotide für PCR

Die Oligonukleotide wurden von der Firma Sigma® Genosys synthetisiert und in lyophilisierter, entsalzter und gereinigter Form geliefert. Sie wurden vor Gebrauch in aqua bidest. gelöst.

- Oligonukleotide zur Genotypisierung von Stathmin knock-out Mäusen

P1 5´- GAG AAT CCA TGA TTG CCA GCA C
P2 5´- AGC AAA ACC AAA TTA AGG GCC AGC
PGK-1b 5´- CTA ATG GCTATA GTT TCA TGT TCC

- Oligonukleotide zur Konstruktion von *L. monocytogenes* ΔTCS RR-Mutanten

Name des Gens	Bez. des Primers	Sequenz 5´- 3´	Position der Primer in der genomischen Sequenz
<i>Imo0051</i>	51N3	GATCGGATCCACGAGCTCAAGAGTTGAAAATTG	53570 - 53593
	51N4	GATCGGTACCTAGCATAAATTCATCCCCATTC	53933 - 53953
	51C1	GATCGGTACCTTATAAAAAGTGGCCTTAAAGG	54467 - 54487
	51C2	GATCGAATTCCTTCTTCACTACGCTTAATCCG	55049 – 55070

<i>lmo0287</i>	0287N1	GATCGGATCCCAAGTAGCGAATTTGCTGATTATC	310535 – 310559
	0287N2	GATCGGTACCTGCCATTTTTTTACAGTCCTCTC	310914 – 310937
	0287C1	GATCGGTACCGAATAAATAACAAGAAGTGGTTTC	311640 - 311663
	0287C2	GATCGAATTCCTTTCTTCTCTAGCATTATAATCC	311196 - 312019
<i>cheY</i>	cheYN1	GATCGGATCCGATGCAGATATGGCTGCTGAAATG	725633 - 725656
	cheYN2	GATCGGTACCCAACATAAAATACTACTCCCATTTC	726011 - 726039
	cheYC1	GATCGGTACCAAGTAGAGAAATGGAGGTAAGTAGC	726388 - 726411
	cheYC2	GATCGAATTCCTTGCTCTGGGTGTAAGTGCTTC	726770 - 726793
<i>lmo1022</i>	1022N1Bam	GATCGGATCCATTAGTTTCCCAGGAAGAGG	1050725 – 1050745
	1022N2	GATCGGTACCAACTACTTCCATGTCATCTTGC	1051105 – 1051127
	1022C1	GATCGGTACCAAGTAGCAAGGAGGTAACGTAC	1051671 – 1051691
	1022C2Bam	GATCGGATCCACGTCTGCCATGTCTCGCTC	1052057 – 1052077
<i>lmo1060</i>	1060N1	GATCGGATCCACGTGAAACAATCAACAAGATTTA	1086371 – 1086394
	1060N2	GATCGGTACCTTCCATATTTGCCTCCTACTGTTC	1086754 – 1086777
	1060C1	GATCGGTACCGAATAAAGTGAGAACCAGAATTAG	1087426 – 1087449
	1060C2	GATCGAATTCCTGTTCCACCTGAATAATCCG	1087788 – 1087809
<i>lmo1172</i>	1172N3	GATCGGATCCATCACTACTTGAAGCCTCTTC	1199671 – 1199693
	1172N4	GATCGGTACCTTTTCATATTCTGTTCTCACTCC	1200045 – 1200065
	1172C3	GATCGGTACCTGAAGTAAATGAAATTTAAATATG	1200618 – 1200641
	1172C4	GATCGAATTCATTTCTTTGTTAAAGCGATTATC	1200981 – 1201003
<i>lisR</i>	lisRN1	GATCGGATCCAATTCCAGTACCAACATTCACTGC	1402186 – 1402209
	lisRN2	GATCGGTACCATTCATTTGGCCTAACCCCTCTC	1402534 – 1402555
	lisRC1	GATCGGTACCACATGACGACTAGCCCATTTTCC	1403225 – 1403247
	lisRC2	GATCGAATTCGGTTTATTTCATAATAAACTTATC	1403609 – 1403631
<i>lmo1507</i>	1507N1	GATCGGATCCATCACTACTTGAAGCCTCTTC	1537414 – 1537434
	1507N2	GATCGGTACCTTTTCATATTCTGTTCTCACTCC	1537799 – 1537820
	1507C3	GATCGGTACCTGAAGCAAATGAAATTTAAATATG	1538460 – 1538480
	1507C4	GATCGAATTCATTTCTTTGTTAAAGCGATTATC	1538853 – 1538874
<i>lmo1745</i>	1745N1	GATCGGATCCTGGTATTCTTTTTAGCAACAGG	1815480 – 1815459
	1745N2	GATCGGTACCTACCATTTCTAGTGCCTCCC	1815094 – 1815075
	1745C1	GATCGGTACCGAATGACGAAAAACAGGGAG	1814408 – 1814388
	1745C2	GATCGAATTCCTAAAGCTCGACCTTTTTGAG	1814027 – 1814007
<i>resD</i>	resDN1	GATCGGATCCAAGATAAAGCCATTGTAGAAATTAC	2024277 – 2024253
	resDN2	GATCGGTACCACTCATAAGTACTCATCCCTAAC	2023895 – 2023872

Material

	resDC1	GATC <u>TTGACCG</u> GATTAATAAAACAGACTAAGATAACG	2023168 – 2023143
	resDC2	GATC <u>GAATTC</u> AGTATCTGGTGACTGTGATTGATAG	2022763 – 2022787
<i>Imo2010</i>	2010N1	GATC <u>GGATCC</u> GTACCATCATTCTGTTTCAAG	2085068 – 2085048
	2010N2Kpn	GATC <u>GGTACCT</u> TCTGGAATAATGCTCTCTAAACC	2084976 – 2083517
	2010C1	GATC <u>GGTACCT</u> AAGATTATTTCTAATATTTGTC	2083539 – 2083517
	2010C2Bam	GATC <u>GGATCC</u> ACCAAGAAACAGCCCTACG	2083154 – 2083136
<i>cesR</i>	vanRN1	GATC <u>GGATCC</u> ATATCATGTATGAGGCTTATAAATTG	2493779 – 2493754
	vanRN2	CATC <u>GGTACCT</u> GTCATACTCATTGTCCTTTCCAG	2493397 – 2493374
	vanRC1	GATC <u>GGTACC</u> ATCTAAACTGGAAGTGTGTTTACG	2492689 – 2492665
	vanRC2	GATC <u>GAATTC</u> ACGTTCCAGTTCTTGAATTTCCGG	2492307 – 2492284
<i>phoP</i>	phoPN1	GATC <u>GGATCC</u> GGCTTGTAGTTTTGGGTGCTCGTGC	2577145 – 2577121
	phoPN2	GATC <u>GGTACCT</u> ACCAAAGTACTTCCCATCCC	2577541 – 2577564
	phoPC1	GATC <u>GGTACC</u> GGCTTCGGTTATAAAATGGAGAACG	2576868 – 2576844
	phoPC2	GATC <u>GAATTC</u> GATTGAAATACCAACGCTTTCCCC	2576482 – 2576459
<i>degU</i>	degUN1	GATC <u>GGATCC</u> AATAATGATCCAACATAAGGAACC	2594924 – 2594901
	degUN2	GATC <u>GGTACCT</u> GCCATAATGACTACTCCTCCTTC	2594541 – 2594518
	degUC1	GATC <u>GGTACC</u> CGCGGTGGTAACGGCAATCAAGCAC	2593858 – 2593881
	degUC2	GATC <u>GAATTC</u> AATTCTCCTGGGGCAGGTTGAGAG	2593629 – 2593606
<i>Imo2583</i>	2583N1	GATC <u>GGATCC</u> CAAATTCTGCTACATTTTCATC	2664696 – 2664675
	2583N2	GATC <u>GGTACCT</u> TTTCATTTTCACCGCTCACC	2664310 – 2664291
	2583C1	GATC <u>GGTACC</u> AGATGAAATCGTTATACAGTCG	2663624 – 2663603
	2583C2	GATC <u>GAATTC</u> GGTATTTTCGCACATCATTATC	2663241 – 2663221
<i>kdpE</i>	2678N1	GATC <u>GGATCC</u> AATTCGGAAAATCGTTTGGCAG	2750439 – 2750417
	2678N2	GATC <u>GGTACC</u> ATTACTGATGCCATCTTGATCTTC	2750203 – 2750180
	2678C1	GATC <u>GGTACC</u> TAATAATATGTTATGATAAAAATAAAC	2749540 – 2749513
	2678C2	GATC <u>GAATTC</u> ACAAAATAAGCAACAGTCCGAGTAC	2749161 – 2749138

Eingeführte Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen sind unterstrichen:
GGATCC: *Bam*HI; GGTACC: *Kpn*I; GAATTC: *Eco*RI

3.5 Primäre und sekundäre Antikörper

polyklonales Kaninchen-anti-LaXp180-Antiserum	Pfeuffer <i>et al.</i> , 2000
polyklonales Kaninchen-anti-ActA-Antiserum	Pfeuffer <i>et al.</i> , 2000
polyklonales Kaninchen-anti-LLO-Antiserum,	J. Kreft
polyklonales Maus-anti-PlcB-Antiserum	Pilgrim <i>et al.</i> , 2003

polyklonaler Kaninchen-anti-Stathmin-Antikörper	Fa. Calbiochem (Koppel <i>et al.</i> , 1990)
monoklonaler Maus-anti-Tubulin-Antikörper (Klone DM1A + DM1B)	Fa. Dianova
Cy TM 3-konjugierter affinitätsgereinigter Ziege-anti-Maus IgG (H+L) (minimale Kreuzreaktion mit Serum-Proteinen von Mensch, Kuh, Pferd, Kaninchen und Schwein)	Fa. Jackson ImmunoResearch
Cy TM 3-konjugierter affinitätsgereinigter Ziege-anti-Kaninchen IgG (H+L) (minimale Kreuzreaktion mit Serum-Proteinen von Mensch, Maus und Ratte)	Fa. Jackson ImmunoResearch
Rhodamine Red TM -X-konjugierter, affinitätsgereinigter Maus-anti-Kaninchen IgG (H+L)	Fa. Jackson ImmunoResearch
Peroxidase-konjugierter, affinitätsgereinigter Ziege-anti-Kaninchen IgG (H+L)	Fa. Dianova
Peroxidase-konjugierter, affinitätsgereinigter Ziege-anti-Maus IgG, Fcy-Fragment spezifisch (minimale Kreuzreaktion mit Serum-Proteinen von Mensch, Kuh und Pferd)	Fa. Dianova
Ziegenserum	Fa. Jackson ImmunoResearch

3.6 Chemikalien, Enzyme und Antibiotika

Alle nicht näher beschriebenen Chemikalien wurden von den Firmen Bio-Rad, Invitrogen, Merck, Oxoid, Roth, Serva und Sigma bezogen. Enzyme und Inkubations-puffer stammten von Boehringer, New England Biolabs NEB, MBI-Fermentas, Pharmacia und Stratagene.

Antibiotika wurden von Sigma geliefert und in folgenden Endkonzentrationen eingesetzt:

Antibiotika	Stammlösung	Endkonzentration
Ampicillin (Amp)	25 mg/ml in H ₂ O, sterilfiltriert	100 µg/ml in <i>E. coli</i> -Kulturen 25 µg/ml in Agar Diffusions-Assay
Chloramphenicol (Cm)	30 mg/ml in 100 % EtOH	30 µg/ml in <i>E. coli</i> -Kulturen 5-10 µg/ml in <i>Listeria</i> -Kulturen 30 µg/ml in Agar Diffusions-Assay
Erythromycin (Em)	50 mg/ml in 100 % EtOH	600 µg/ml in <i>E. coli</i> -Kulturen 5 µg/ml in <i>Listeria</i> -Kulturen 30 µg/ml in Agar Diffusions-Assay
Nalidixinsäure (Nal)	25 mg/ml in H ₂ O, sterilfiltriert	30 µg/ml in Agar Diffusions-Assay
Kanamycin (Km)	25 mg/ml in H ₂ O, sterilfiltriert	25 µg/ml in <i>E. coli</i> -Kulturen 15 µg/ml in <i>Listeria</i> -Kulturen 30 µg/ml in Agar Diffusions-Assay
Penicillin G (Pen G)	10 mg/ml in H ₂ O, sterilfiltriert	5 µg/ml in <i>Listeria</i> -Kulturen 10 µg/ml in Agar Diffusions-Assay
Streptomycin (Sm)	25 mg/ml in H ₂ O, sterilfiltriert	25 µg/ml in Agar Diffusions-Assay

Material

Gentamycin (Gen)	50 mg/ml, gebrauchsfertig gekauft	50 µg/ml bei Zellkulturversuchen 20 µg/ml in Agar Diffusions-Assay
Tetracyclin (Tc)	20 mg/ml in 50 % EtOH	20-30 µg/ml in <i>E. coli</i> -Kulturen 5-10 µg/ml in <i>Listeria</i> -Kulturen 30 µg/ml in Agar Diffusions-Assay

3.7 Molekulargewichtsstandards

- 1 kb-DNA-Ladder (Stratagene):

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

- Gibco-BRL DNA-Marker (Gibco)

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

- BioRad "broad range" Marker für die SDS-PAGE

Myosin	200,00	kDa
β-Galactosidase	116,25	kDa
Phosphorylase b	97,40	kDa
Rinderserumalbumin	66,20	kDa
Ovalbumin	45,00	kDa
Carboanhydrase	31,00	kDa
Trypsininhibitor	21,50	kDa
Lysozym	14,40	kDa
Aprotinin	6,50	kDa

- Precision Blue Protein Standard (Bio Rad):

Bande	[kDa]	Bande	[kDa]
1	250	6	37
2	150	7	25
3	100	8	20
4	75	9	15
5	50	10	10

3.8 Allgemeine Puffer und Lösungen

Puffer und Lösungen wurden, wenn nicht anders angegeben, 20 min autoklaviert, sterilfiltriert oder aus bereits sterilen Lösungen zusammengestellt. pH-Werte wurden, sofern nicht anders vermerkt, mit HCl bzw. NaOH eingestellt. Die zur Herstellung der Puffer und Lösungen verwendeten Chemikalien besaßen den Reinheitsgrad "pro analysis" (p. a.).

10x TBE (Tris-Borat Puffer)	Tris Borsäure EDTA (0,5 M) aqua dest.	216 g 110 g 80 ml ad 2000 ml
0,5 M EDTA, pH 8,0	EDTA aqua dest. aqua dest.	93,1 g 350 ml pH-Wert auf 8,0 einstellen ad 500 ml
3 M NaOAc, pH 5,2 (pH-Wert mit Essigsäure einstellen)	NaOAc aqua dest. aqua dest.	123,05 g 400 ml pH-Wert auf 5,2 einstellen ad 500 ml
1,5 M Tris-HCl, pH 8,8	Tris aqua dest. aqua dest.	181,71 g 800 ml pH-Wert auf 8,8 einstellen ad 1000 ml
0,5 M Tris-HCl, pH 6,8	Tris aqua dest. aqua dest.	60,57 g 800 ml pH-Wert auf 6,8 einstellen ad 1000 ml
3,125 M Tris-HCl, pH 6,8	Tris aqua dest. aqua dest.	189,28 g 350 ml pH-Wert auf 6,8 einstellen ad 500 ml
10x TBS, pH 7,5	Tris NaCl aqua dest. aqua dest.	12,1 g 90 g 800 ml pH-Wert auf 7,5 einstellen ad 1000 ml
1x TBS/Tween Puffer	Tris NaCl Tween 20 aqua dest. aqua dest.	1,21 g 9 g 20 % 800 ml pH-Wert auf 7,5 einstellen ad 1000 ml
10x TE-Puffer	Tris EDTA aqua dest.	121,1 g 292,3 g ad 1000 ml
4x Laemmli-Puffer	β -Mercaptoethanol (10 mM) Tris-HCl (3,125 M, pH 6,8) SDS (25 %) Glyzerin (86 %) Bromphenolblau	5 ml 2 ml 8 ml 10 ml 20 mg

3.9 Spezifische Puffer und Lösungen

3.9.1 Medien und Agarplatten für Bakterienkultur

BHI-Medium (Brain-Heart-Infusion)	BHI aqua dest.	38 g ad 1000 ml
LB-Medium (Luria Broth)	Pepton Hefe-Extrakt NaCl aqua dest.	10 g 5 g 10 g ad 1000 ml
TY-Medium (Tryptic Yeast)	Bacto-Trypton NaCl Hefe-Extrakt aqua dest.	10 g 5 g 5 g ad 1000 ml
YPD-Medium	Pepton Hefe-Extrakt NaCl aqua dest.	20 g 10 g 10 g 950 ml
BHI-Platten	BHI Agar aqua dest.	38 g 15 g ad 1000 ml
TY-Platten	Bacto-Trypton NaCl Hefe-Extrakt Agar aqua dest.	10 g 10 g 5 g 15 g ad 1000 ml
Blut-Platten	Blood Agar Base Schafsblut aqua dest.	15 g 5 % ad 1000 ml
X-Gal-IPTG-Platten	Pepton Hefe-Extrakt NaCl Agar IPTG (100 mM) X-Gal (2 %) Ampicillin (100 mg/ml) aqua dest.	10 g 5 g 10 g 15 g 1250 µl 750 µl 100 µl ad 500 ml

3.9.2 Medien und Puffer für eukaryotische Zellen

RPMI-Komplettmedium	RPMI 1640-Medium + L-Glutamin FCS (hitzeinaktiviert) Fungizone (250 µg/ml) Penicillin (1000 U/ml) Streptomycin (1000 µg/ml)	500 ml 50 ml 5 ml 2,5 ml 2,5 ml
DMEM-Komplettmedium	DMEM FCS (hitzeinaktiviert)	500 ml 50 ml

RPMI-Click Medium für primäre Knochenmarksmakrophagen (BMMΦ)	RPMI-Click Trockenmedium NaHCO ₃ aqua dest. aqua dest.	Päckchen für 1000 ml 1,175 g 900 ml pH-Wert auf 7,3 einstellen ad 1000 ml
Medium zur Entnahme von BMMΦ	RPMI-Click Flüssigmedium FCS (hitzeinaktiviert) HEPES Penicillin (1000 U/ml) Streptomycin (1000 µg/ml) Fungizone (250 µg/ml) β-Mercaptoethanol (10 mM)	500 ml 10 % 5 ml 5 ml 5 ml 5 ml 2,5 ml
Kulturmedium für BMMΦ	BMMΦ-Entnahmemedium L929-konditioniertes DMEM	80 % 20 %
20x PBS (Phosphat-gepufferte Saline)	NaCl KCl Na ₂ HPO ₄ (H ₂ O-frei) KH ₂ PO ₄	160 g 4 g 23 g 4 g
20x Ca ²⁺ /Mg ²⁺	MgCl ₂ x 6 H ₂ O CaCl ₂ aqua dest.	2 g 2 g ad 1000 ml
1x PBS	20x PBS aqua dest.	25 ml 475 ml
1x PBS ^{Ca2+/Mg2+}	20x PBS 20x Ca ²⁺ /Mg ²⁺ aqua dest.	25 ml 25 ml 450 ml
NaCl (150 mM)	NaCl aqua dest.	8,8 g ad 1000 ml
PHEM-Puffer	Pipes HEPES EGTA MgCl ₂ + 6 H ₂ O aqua dest. aqua dest.	18,14 g 5,5 g 3,8 g 203 mg 900 ml pH-Wert auf 6,9 einstellen ad 1000 ml

3.9.3 Puffer und Lösungen für SDS-Polyacrylamid Gele (SDS-Page)

Methylgrünlösung	Glyzerin (50 %) Tris-HCl (0,5 M, pH 6,8) Methylgrün	1 ml 625 µl 25 mg
Sammelgelpuffer	Tris aqua dest. aqua dest.	60,57 g 900 ml pH-Wert 6,8 auf einstellen ad 1000 ml
Trenngelpuffer	Tris aqua dest. aqua dest.	181,87 900 ml pH-Wert auf 8,8 einstellen ad 1000 ml

Material

1 x SDS-Laufpuffer	Tris	3,03 g
	SDS (10 %)	10 ml
	Glyzin	15 g
	aqua dest.	ad 1000 ml

- für ein 15 %-iges Gel wurden folgende Komponenten zusammenpipettiert:

Trenngel:	Volumina (ml) der Komponenten für ein Endvolumen von				
	10 ml	15 ml	20 ml	25 ml	30 ml
aqua dest.	2,3	3,4	4,6	5,7	6,8
Acrylamid-Mix (30 %)	5	7,5	10	12,5	15
Tris-HCl (1,5 M, pH 8,8)	2,5	3,8	5	6,3	7,6
SDS (10 %)	0,1	0,15	0,2	0,25	0,30
APS (10 %)	0,1	0,15	0,2	0,25	0,30
TEMED	0,004	0,006	0,008	0,010	0,012
Sammelgel:	2 ml	3 ml	4 ml	5 ml	6 ml
aqua dest.	1,4	2,1	2,8	3,4	4,2
Acrylamid-Mix (30 %)	0,33	0,5	0,66	0,83	1,0
Tris-HCl (1,5 M, pH 6,8)	0,25	0,38	0,5	0,63	0,76
SDS (10 %)	0,02	0,03	0,04	0,05	0,06
APS (10 %)	0,02	0,03	0,04	0,05	0,06
TEMED	0,002	0,003	0,004	0,005	0,006

APS und TEMED wurden jeweils erst unmittelbar vor dem Giessen zugegeben.

3.9.4 Puffer für Westernblot und Chloronaphthol-Entwicklung

Anodenpuffer I	Tris	36,34 g
	Ethanol	200 ml
	aqua dest.	ad 1000 ml
Anodenpuffer II	Tris	3,02 g
	Ethanol	200 ml
	aqua dest.	ad 1000 ml
Kathodenpuffer	Tris	3,02 g
	ϵ -Amino-n-Caprionsäure	5,24 g
	aqua dest.	ad 1000 ml
Entwickler	Chloronaphthol (0,3 % in MetOH)	6 ml
	1x TBS	94 ml
	Wasserstoffperoxid	60 μ l

3.9.5 Puffer und Lösungen für Proteinfärbungen

- Proteinfärbung mit Silbernitrat

Fixierer	Essigsäure	12 %
	Ethanol	50 %
	aqua dest.	38 %

Oxidierer	aqua dest. Formaldehyd (37 %) Na-Thiosulfat (43 %)	250 ml 166,5 µl 125 µl
Silberlösung	aqua dest. Formaldehyd (37 %) Silbernitrat	250 ml 166,5 µl 0,5 g
Entwickler	aqua dest. Formaldehyd (37 %) Na-Thiosulfat (43 %) Na ₂ CO ₃	250 ml 125 µl 4,5 µl 15 g
EDTA (40 mM)	EDTA aqua dest.	14,6 g ad 1000 ml
EtOH (30 %)	EtOH aqua dest.	30 % 70 %

Für die Färbung wurden Oxidierer, Silbernitratlösung und Entwickler immer frisch angesetzt. Pro Gel wurden jeweils 125 ml von jeder Lösung benötigt.

- Proteinfärbung mit kolloidalem Coomassie

Stocklösung A	Coomassie-Blau G250 aqua dest.	5 g 500 ml
Stocklösung B	Stocklösung A (NH ₄) ₂ SO ₄ H ₃ PO ₄ aqua dest.	10 % 10 % 2 % ad 500 ml
Gebrauchslösung	Stocklösung B Methanol	80 % 20 %

3.9.6 Puffer und Lösungen für die 2D-Gelelektrophorese (2DGE)

- Puffer und Lösungen für die Isolierung von Überstands- und Gesamtzellproteinen

Harnstoffpuffer	Harnstoff Thioharnstoff DTT aqua dest.	4,2 g 1,52 g 108 mg ad 10 ml
CHAPS-Stammlösung	CHAPS aqua dest.	4 g 10 ml
Chloramphenicol	Chloramphenicol EtOH (70 % p.a.)	50 mg 5 ml
Protease Inhibitoren Mix	Pefabloc (2 mg/ml) Pepstatin (2 mg/ml) Leupeptin (2 mg/ml)	Verhältnis 1:1:1
DNase/RNase-Mix	Benzonase (1000 U/ml, Merck) RNase-it (1000 U/ml, Stratagene)	Verhältnis 1:1

Material

- Puffer für die erste Dimension

Rehydrierungspuffer (Stocklösung)	Harnstoff	21,02 g
	Thioharnstoff	7,61 g
	CHAPS	2 g
	Bromphenolblau	2 mg
	aqua dest.	ad 50 ml

Die Rehydrierungspuffer-Stocklösung wurde in 2,5 ml Aliquots bei -20° C gelagert. Kurz vor Gebrauch wurde der Puffer mit 18 mM DTT und 0,5 % IPG-Puffer (Amersham) komplettiert. Die Immobiline DryStrips für die erste Dimension wurden von Amersham Biosciences bezogen.

- Puffer und Lösungen für die zweite Dimension

Verdrängungslösung "displacing solution"	Tris-HCl (1,5 M, pH 8,8)	50 ml
	Glyzerin	100 ml
	aqua dest.	50 ml
	Bromphenolblau	2 mg
Gel-Aufbewahrungslösung "gel storage solution"	Tris-HCl (1,5M, pH 8,8)	500 ml
	SDS (10 %)	20 ml
	aqua dest.	ad 2000 ml
Äquilibrierungspuffer (Basislösung)	Tris-HCl (1,5 M, pH 8,8)	6,7 ml
	Harnstoff	72,02 g
	Glyzerin	60 ml
	SDS	4 g
	Bromphenolblau	0,2 mg
	aqua dest.	ad 200 ml
Agaroselösung	Agarose M	0,5 % in 1x SDS-Laufpuffer

Der Äquilibrierungspuffer wurde in 20 ml Aliquots bei -20° C aufbewahrt. Kurz vor Gebrauch wurde er aufgetaut und mit Dithiothritol (DTT) bzw. Iodacetamid (IAA) komplettiert. Es wurden jeweils 100 mg DTT pro 10 ml Puffer für Äquilibrierungspuffer I bzw. 250 mg IAA pro 10 ml Puffer für Äquilibrierungspuffer II eingewogen.

Für diese Arbeit wurden 12 %-ige Gele angefertigt, die Gellösung wurde wie folgt angesetzt:

Zutaten/Anzahl Gele	24	23	22	21	19	18
PAA (30%)	679,96ml	651,6 ml	623,3 ml	595 ml	538,3 ml	510,0 ml
Tris-HCl (1,5 M, pH 8,8)	425,04 ml	407,3 ml	389,6 ml	371,9 ml	336,5 ml	318,8 ml
aqua dest.	558,72 ml	535,4 ml	512,2 ml	488,9 ml	442,3 ml	419 ml
SDS (10%)	17,04 ml	16,3 ml	15,6 ml	14,9 ml	13,5 ml	12,8 ml
APS (10%)	17,04 ml	16,3 ml	15,6 ml	14,9 ml	13,5 ml	12,8 ml
TEMED	85,0 µl	81,5 µl	77,9 µl	74,4 µl	67,3 µl	63,8 µl

3.9.7 Puffer für die Microarray-Technologie

Spüllösung I	Triton-X-100	1 ml
	aqua dest.	ad 1000 ml
Spüllösung II	HCl (37 %)	100 µl
	aqua dest.	ad 1000 ml

		Material
Spüllösung III	KCl (1 M) aqua dest.	100 ml ad 1000ml
1x QMT Block-Lösung	Ethanolamin (98 %) SDS (1 %) Tris aqua dest.	50 ml 100 ml 12,114 g 900 ml
	aqua dest.	pH-Wert auf 9,0 einstellen ad 1000 ml
Waschpuffer I	20x SSC SDS (10 %) aqua dest.	100 ml 20 ml ad 1000 ml
Waschpuffer II	20x SSC aqua dest.	100 ml ad 1000 ml
Waschpuffer III	20x SSC aqua dest.	2,5 ml ad 1000ml
20x SSC	NaCl Natrium-citrat aqua dest.	175,3 g 88,2 g 800 ml
	aqua dest.	pH-Wert auf 7,0 einstellen ad 1000 ml

3.10 Versuchstiere

Für *in vivo* Infektionsexperimente mit den *L. monocytogenes* Δ TCS RR-Mutanten wurden 6 - 8 Wochen alte, weibliche BALB/c Mäuse der Fa. Charles River bzw. Harlan Winkelmann verwendet. *In vivo* Untersuchungen zur Rolle von Stathmin wurden in C57BL/6 Mäusen durchgeführt.

3.11 Verbrauchsmaterial

12-Napfplatten	Fa. Greiner Bio-One
50 ml und 15 ml Röhrchen	Fa. Greiner Bio-One
250 ml Kulturflaschen	Fa. Greiner Bio-One
1,5 ml und 2 ml Reaktionsgefäße	Fa. Greiner Bio-One
PCR-Gefäße	Fa. Greiner Bio-One
Einmalpipetten	Fa. Sarstedt
Petrischalen (ø 100 mm)	Fa. Sarstedt
Zellkulturschalen (ø 60-85 mm)	Fa. Sarstedt
25 µl, 200 µl und 1000 µl Pipettenspitzen	Fa. Sarstedt
5 ml Pipettenspitzen	Fa. Eppendorf
Elektroporationsküvetten	Fa. EQUIBIO
Nitrozellulosemembran (Hibond C)	Fa. Amersham Pharmacia Biotech
Röntgenfilme X-ray Retina, XBA	Fotochemische Werke GmbH
Blot Papier, 330 g/m ² , GB33	Hartenstein Labor & Medizintechnik GmbH
Shreddergefäße Lysing Matrix B	Fa. Q-BIOgene

3.12 Gebrauchsfertige Kits

DNA-free TM Kit	Fa. Ambion
----------------------------	------------

DNeasy Tissue Kit	Fa. QIAgen
ECL direct nucleic acid labelling and detection systems	Fa. Amersham Pharmacia Biotech
E.Z.N.A. [®] Bacterial RNA Kit	Fa. PEQLAB
E.Z.N.A. [®] Cycle-Pure Kit	Fa. PEQLAB
GFX [™] Micro Plasmid Prep Kit	Fa. Amersham Biosciences
Quantum Prep [®] Plasmid Miniprep Kit	Fa. BioRad
QIAquick [™] Gel Extraction Kit	Fa. QIAgen
QIAquick [™] PCR Purification Kit	Fa. QIAgen
RNeasy Mini Kit	Fa. QIAgen

3.13 Geräte

Autoklaven	Fa. Webeco
Begasungsschränke	Fa. Heraeus
Blotkammer	Fa. BIOTEC-FISCHER
Brutschränke	Fa. Heraeus
Digitalkamera "Camedia C 300"	Fa. Olympus
Durchflußzytometer "Epics [®] XL"	Fa. Beckman Coulter
Elektrophoresekammern	Institutswerkstatt
	Fa. BioRad
Elektroporationsgerät "Gene Pulser"	Fa. BioRad
Feinwaage	Fa. Sartorius
Grobwaage	Fa. Sartorius
Heizblock	Fa. Eppendorf
Kameras	Fa. Princeton Instruments
	Fa. Diagnostic Instruments Inc.
Klettphotometer	Fa. Summerson
Kühlzentrifuge	Fa. Heraeus
	Fa. DuPont, Sorvall RT6000
Magnetrührer	Fa. GLW, M32
Microarray-Scanner	Scan Array [™] Lite
Mikroskope	Fa. Leica, DM R, DM IRB
Mikrowelle	Fa. Siemens
Minigelapparatur " Mini-PROTEAN II [™] "	Fa. BIORAD
Minizentrifuge	Fa. Hettich
	Fa. Heraeus, Sepatech Biofuge 15
Netzgeräte	Fa. BIORAD Modell
	Fa. Consort
PCR-Geräte	Fa. Techne Techgene
	bio-med Thermocycler 60
pH-Meter	Fa. WTW pH 523
Photometer	Fa. Pharmacia Biotech, Genequant II
Photometer (optische Dichte)	Fa. Pharmacia Biotech, Ultrospec III
Pipetten	Fa. Gilson
	Fa. Eppendorf
Röntgenfilmentwickler	Fa. Kodak
Röntgenfilmkassetten	Fa. Hartenstein
Scanner	Fa. Hewlett Packard
	Fa. Lexmark
Schüttelinkubatoren	Fa. HTInfors AG

Shreddergerät "FastPrep FP120"	Fa. Q-BIOgene
Speedvac-Konzentrator	Fa. Eppendorf Concentrator 5301
Sterilbänke	Fa. Heraeus
Taumelgeräte	Fa. Heidolph
Transmissions-Elektronenmikroskop	Fa. Zeiss, TEM 100
UV-Leuchtschirm	Fa. Vilber Lourmat
UV-Stratalinker 2400	Fa. Stratagene
Vakuumzentrifuge	Fa. Eppendorf
Videoprinter	Fa. Mitsubishi
Vortex-Gerät " REAX 2000"	Fa. Heidolph
Wasserbad " Thermomix 1441"	B. Braun
Zählkammer	Neubauer
2D-Gelkammer "Hoefer-DALT"	Fa. Amersham Biosciences
IEF-Apparatur "Multiphor II Systems-Apparatur"	Fa. Amersham Biosciences

4 Methoden

4.1 Arbeiten mit Bakterien

Alle in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme wurden über mehrere Wochen bei 4° C auf geeigneten Agarplatten gehalten. Für eine langfristige Lagerung wurden Glycerinkulturen (s. 4.1.1) angelegt und bei -80° C aufbewahrt. Zur Herstellung von Flüssigkulturen wurden 10-100 ml Medium mit Bakterien, die mit einer sterilen Impföse von einer Agarplatte abgenommen wurden, angeimpft und üblicherweise bei 37° C unter Schütteln kultiviert.

4.1.1 Herstellung von Glycerinkulturen

Eine Übernachtskultur (ÜNK) wurde 1:20 in BHI-Medium verdünnt, auf einem Schüttelinkubator bei 37° C bis zur spät-logarithmischen Wachstumsphase (~ 180 Kletteinheiten KE) kultiviert und anschließend abzentrifugiert (4° C, 6000 rpm, 10 min). Die Bakterienpellets wurden zweimal mit je 10 ml kaltem 1x PBS gewaschen, in 5 ml 1x PBS/20 % Glycerin (v/v) resuspendiert und zu 200 µl Aliquots bei -80° C aufbewahrt.

4.1.2 Lebendzellzahlbestimmung von Listerien

Ein Aliquot der Glycerinkulturen wurde aufgetaut und mit 150 mM NaCl-Lösung eine Verdünnungsreihe erstellt. Von den Verdünnungsstufen 10^{-3} – 10^{-6} wurden zweimal je 100 µl auf BHI-Platten ausplattiert und diese bei 37° C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Bakterienkolonien (CFU) pro Platte gezählt und die durchschnittliche Anzahl an Listerien pro ml nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Lebendzellzahl/ml} = \text{gezählte CFU} \times \text{Verdünnungsstufe} \times 10$$

4.1.3 Wachstum bei 20° C, 37° C und 42° C

Übernachtskulturen wurden 1:50 in BHI verdünnt und bei den entsprechenden Temperaturen auf dem Schüttelinkubator kultiviert. In regelmäßigen Abständen wurde die optische Dichte der Kulturen im Klett-Photometer bzw. im Photometer bei 600 nm gemessen und notiert. Die Listerien wurden bis zur stationären Phase gezogen und anhand der gemessenen Werte eine Wachstumskurve erstellt. Alternativ wurden die Kulturen bei einer OD von 180–200 KE bzw. $OD_{600\text{nm}} = 1,0$ abzentrifugiert (15 min bei 6000 rpm und der entsprechenden Temperatur) und die Bakterienpellets für eine spätere RNA-Isolierung bei -80° C gelagert.

4.1.4 Wachstum unter Stressbedingungen

Zum Überwachen des Bakterienwachstums in BHI unter Stressbedingungen wurden dem Kulturmedium nach dem Verdünnen diverse Reagenzien beigefügt und die Bakterienkulturen wie unter 4.1.3 beschrieben kultiviert. Als Kontrolle diente jeweils der in reinem BHI inkubierte *L. monocytogenes* EGD Stamm.

4.1.5 Wachstum unter anaeroben Bedingungen

Um anaerobe Bedingungen zu simulieren, wurden 10 ml BHI in KlettKolben vorgelegt und mit 2 ml sterilem Paraffinöl überschichtet. Übernachtkulturen wurden in Kapsenbergröhrchen in 2 ml BHI kultiviert, die mit 0,5 ml Paraffinöl überschichtet waren. Von diesen ÜNK wurde im Photometer bei 600 nm die OD bestimmt und davon ausgehend das frische Medium so angeimpft, dass zu Beginn des Wachstumstests alle Kulturen die gleiche optische Dichte aufwiesen. Die Inkubation erfolgte bei 37° C auf dem Schüttelinkubator mit einer rpm von 25, um ein zu heftiges Durchmischen der Kulturen zu verhindern.

4.1.6 Motilitätstest

Einzelkolonien der zu testenden Bakterienstämme wurden mit gelben Pipettenspitzen in 0,25 % Agarplatten eingestochen und diese für einen Tag bei 24° C bzw. 37° C inkubiert. Nach 24 Stunden wurden die Durchmesser der Kolonien um die Einstichstelle herum vermessen.

4.1.7 Hämolyseintest

Zur Herstellung der für den Hämolyse-Test notwendigen Blutagarplatten wurde eine Agarlösung mit "blood agar base" (BAB) autoklaviert. Nach Abkühlung der Agarlösung auf ca. 40° C wurden 5 % defibriertes Schafsblut zugegeben und nach ausreichendem Vermischen der Lösung die Platten gegossen. Nach deren Aushärtung wurden Einzelkolonien individueller Bakterienstämme mit gelben Spitzen in den Agar eingestochen und die Platten anschließend bei 37° C inkubiert. Hämolysehöfe wurden nach 24 Stunden vermessen.

4.1.8 Antibiotikasensitivitätstest

100 µl einer mid-logarithmischen Bakterienkultur wurden auf BHI-Agar ausplattiert. Filterplättchen (ø 5 mm) wurden mit 20 µl der entsprechenden Antibiotika getränkt, getrocknet und auf die vorbereiteten Agarplatten aufgebracht. Nach 24 Stunden Inkubation bei 37° C wurden die Durchmesser der Hemmhöfe bestimmt.

4.1.9 Triton-X-100 Sensitivitäts-Test

Um zu überprüfen, ob Bakterien gegen Triton-X-100 sensitiv sind, wurden zwei verschiedene Ansätze mit 5×10^5 Bakterien angesetzt. Der Kontrollansatz enthielt jeweils 1 ml 1x PBS, der Testansatz 1ml 1x PBS/0,05 % Triton-X-100. Beide Ansätze zuzüglich der Bakterien wurden für 20 min auf Eis inkubiert, verdünnt und je 100 µl der Verdünnungsstufen 10^{-3} und 10^{-4} auf BHI-Agar ausgestrichen. Nach 24 Stunden bei 37° C wurden die CFU's des Kontroll- und Testansatzes bestimmt und die absolute Überlebensrate des Stammes errechnet. Da verschiedene Stämme parallel eingesetzt wurden, wurde die Überlebensrate des EGD-Stammes auf 100 % gesetzt und die relative Überlebensrate der übrigen Stämme im Vergleich zum Referenzstamm EGD berechnet.

Absolute Überlebensrate (%) : $\frac{\text{Anzahl der Bakterien im Infektionsansatz} \times 100}{\text{Anzahl der Bakterien im Infektionsmedium}}$

Relative Überlebensrate (%): $\frac{\text{Absolute Überlebensrate des Stammes XY} \times 100}{\text{Absolute Überlebensrate des Referenz-Stammes}}$

4.1.10 Negativkontrast-Präparate von Listerien für Elektronenmikroskopie (EM)

Von Übernachtskulturen in BHI-Medium kultivierter Listerien wurden 3 µl auf ein 100 Mesh EM-Netzchen pipettiert, 1 min bei RT inkubiert und anschließend abgesaugt. Das Netzchen wurde 1 min in aqua dest. geschwenkt und die überschüssige Flüssigkeit vorsichtig abgesaugt. Es folgte ein zweiminütiger Inkubationsschritt mit 0,5 % Uranylacetat, hiervon wurden 3 µl auf die Oberseite des Netzchens aufgebracht. Nach zwei einminütigen Waschschrritten in aqua dest. wurden die Netzchen bei RT getrocknet und bis zur mikroskopischen Auswertung der Präparate in einer so genannten Gridbox aufbewahrt.

4.2 Zellkultur mit eukaryotischen Zellen

Eukaryotische Zellen wurden in Brutschränken mit 5 % CO₂ bei 37° C in speziellen Zellkulturflaschen, Napfplatten oder Schalen kultiviert. Geräte und Arbeitsflächen wurden mit 70 %-igem Alkohol gereinigt, verwendete Puffer und Medien vor Gebrauch im Wasserbad auf 37° C vorgewärmt.

4.2.1 Kultivieren und Passagieren adhärenter J774-Makrophagen

J774-Makrophagen wurden in 250 ml Zellkulturflaschen kultiviert und alle 2-3 Tage subkultiviert. Hierzu wurde das verbrauchte Medium entfernt, die Zellen mit 1x PBS gewaschen und in 2 ml RPMI-Medium mit einer gebogenen Pasteur-Pipette durch vorsichtiges Schaben vom Boden der Flasche abgelöst. Es wurden 3 ml RPMI zugegeben und die Zellen durch Auf- und Abpipettieren vorsichtig vereinzelt. Die Zellen wurden in einem Verhältnis von 1:5 in eine neue Flasche mit frischem Medium ausgesät.

4.2.2 Trypsinisieren von Cos-1 und Caco-2-Zellen

Die Zellen wurden bis zum Erreichen eines konfluenten Monolayers bei 37° C kultiviert. Nach Abnahme des alten Mediums wurden sie zweimal mit 1x PBS gewaschen. Es wurden 2 ml Trypsin-EDTA Lösung (Invitrogen) zugegeben und durch vorsichtiges Schwenken gleichmäßig verteilt. Die Kulturflaschen wurden bei 37° C weiter inkubiert, bis sich die Zellen beim Kippen der Flasche vom Gefäßboden lösten. Durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren wurden die Zellen vereinzelt und anschließend in frischem Medium neu ausgesät.

4.2.3 Kultivieren von L929-Zellen zur Gewinnung von L929-konditioniertem Medium

L929-Fibroblasten wurden in 250 ml Zellkulturflaschen in DMEM-Medium mit 10 % FCS bis zum Erreichen eines konfluenten Monolayers kultiviert. Die Zellen wurden nach Abnahme des Mediums vorsichtig mit 1x PBS gewaschen, trypsinisiert und in 100 ml Medium in 550 ml- Flaschen ausgesät. Nach Erreichen eines durchgehenden Zellrasens wurden die Zellen weitere 15 Tage im Brutschrank inkubiert. Während dieser Zeit sollten Wachstums- und Differenzierungsfaktoren sezerniert und ins Medium abgegeben werden. Dieses

konditionierte Medium wurde abgenommen, sterilfiltriert und in 50 ml Aliquots bei -20° C aufbewahrt.

4.2.4 Bestimmung der Lebendzellzahl

Eine Differenzierung zwischen lebenden und abgestorbenen Kulturzellen erfolgte mittels des Farbstoffes Trypanblau® (Seromed). Dieser Farbstoff dringt sehr schnell in Tote, jedoch nicht in lebende Zellen ein. Unter dem Lichtmikroskop betrachtet erschienen tote Zellen daher blau, lebende Zellen dagegen lichtbrechend, in kugeliger Gestalt und hoben sich daher deutlich ab. Die Bestimmung der Lebendzellzahl erfolgte mit der "Neubauer-improved" Zählkammer. Es wurden 20 µl Zellsuspension mit 20 µl Färbelösung vermischt, auf die Zählkammer aufgetragen und 3 Großquadrate mit je 25 Kleinquadraten ausgezählt. Es wurde der Mittelwert und daraus die Lebendzellzahl pro ml wie folgt bestimmt:

$$\text{Lebendzellzahl/ml} = Z \times (F_f \times F_k)$$

Z = MW lebende Zellen

F_f = Verdünnungsfaktor

F_k = Kammerfaktor (abhängig von verwendeter Kammer)

4.2.5 Auftauen und Einfrieren von Zellen

Eukaryotische Zellen können in flüssigem Stickstoff über mehrere Jahre gelagert werden. Durch die Zugabe des Gefrierschutzmittels Dimethylsulfoxid (DMSO) wird eine schädigende intrazelluläre Eiskristallbildung verhindert. Bei 37° C ist DMSO für die Zellen jedoch toxisch und muss so schnell wie möglich durch ein Ersetzen des Mediums entfernt werden.

Gefrorene Zellen wurden im Wasserbad bei 37° C aufgetaut und sofort in eine Zellkulturflasche ausgesät, in die 10 ml angewärmtes Medium vorgelegt waren. Durch vorsichtiges Schwenken wurde eine gleichmäßige Verteilung der Zellen gewährleistet. Nach 24 h wurden die Zellen zweimal vorsichtig mit 1x PBS gewaschen, um die Reste des DMSO zu entfernen, und mit frischem Medium versorgt.

Zum Einfrieren wurden die Zellen je nach Zelltyp durch Trypsin oder Abschaben vom Boden der Kulturgefäße abgelöst und vorsichtig vereinzelt. Nach Bestimmung der Zelldichte wurden 2-4x10⁶ Zellen/ml in 12 % DMSO (Endkonzentration) eingestellt und 1–1,5 ml dieser Suspension in Kryoröhrchen aliquotiert. Über Nacht wurden die Zellen in einer Styropor-Box langsam auf -80° C heruntergekühlt und am nächsten Tag in flüssigem Stickstoff eingelagert.

4.3 **Zellarretierung und Synchronisierung**

Unter geeigneten Kulturbedingungen wachsen Säugerzellen mit einer für ihre Zellart spezifischen Geschwindigkeit, sind aber im Bezug auf ihren Zellzyklus asynchron. Für einige Experimente war es jedoch von Vorteil, mit einer synchronen Zellpopulation zu arbeiten. Der Standard-Zellzyklus einer Eukaryontenzelle ist gewöhnlich in eine M-, G₁-, S- und G₂-Phase unterteilt (Abb. 13). Es wurden unterschiedliche Methoden angewandt, um die Zellen in verschiedenen Phasen des Zellzyklus zu arretieren. Anschließend wurden mit

der Durchflusszytometrie quantitative Aussagen bezüglich des DNA Gehaltes der proliferierenden Zellen getroffen und dabei indirekt auf die Zahl der Zellen in einer bestimmten Phase des Zyklus geschlossen.

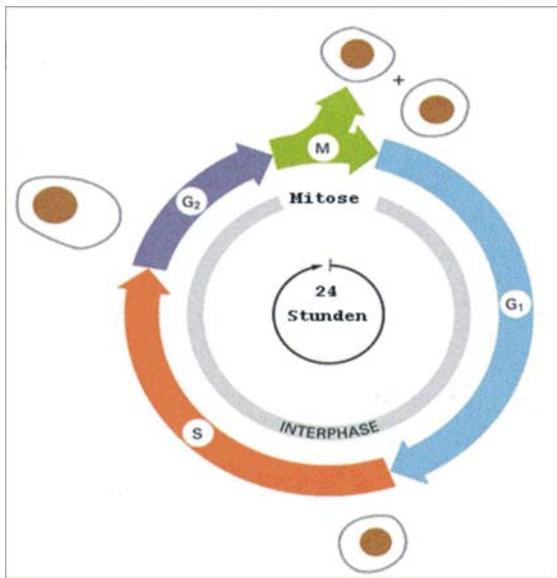


Abb. 13: Normaler Zellzyklus bei der Teilung von eukaryotischen Zellen (Alberts *et al.*, 1993). Auf die Mitose folgt die G_1 -Phase; aus dieser kann die Zelle in die G_0 -Phase (hier nicht dargestellt), oder in die S-Phase übergehen. Auf diese folgt die G_2 -Phase, bevor schließlich wieder die Zellteilung während der Mitose erfolgt.

4.3.1 G_0/G_1 Synchronisierung durch Serum-Entzug

Zusätzlich zu den vier oben genannten Phasen treten Zellen in die reversible, so genannte Ruhe-Phase G_0 ein, sobald Umweltbedingungen für ein Wachstum unvorteilhaft sind. Demnach sind Entzug und erneute Zugabe essentieller Nährstoffe eine geeignete Methode, um Zellen in der G_0 -Phase zu arretieren, um sie anschließend synchron in die G_1 -Phase zu entlassen.

Caco-2 und Cos-1 Zellen wurden trypsinisiert, in Vollmedium (RPMI mit 10 % FCS) in Zellkulturschalen (\varnothing 100 mm) ausgesät und 24 h bei 37°C und 5 % CO_2 inkubiert. Das Vollmedium wurde durch ein Serum-defizientes Medium (RPMI mit 0,5 % FCS) ersetzt und die Zellen weitere 48 h inkubiert. Während dieser Zeit sollten sie ihren Zyklus bis zur M-Phase durchlaufen und anstelle in die G_1 in die G_0 Phase übergehen. Anschließend wurden die Kulturen einmal mit 1x PBS gewaschen und wieder mit Vollmedium versorgt, was einen Übergang von der G_0 in die G_1 Phase induzieren sollte. Nach weiteren zwei Stunden bei 37°C wurde der DNA-Gehalt der Zellen im FACS (fluorescence activated cell sorter) gemessen

4.3.2 Arretierung in der S-Phase durch Doppel-Thymidin Block

Um Zellen in der frühen S-Phase zu akkumulieren wurden sie einem Doppel-Thymidin-Block unterzogen. Diese Methode basiert darauf, dass eine hohe Thymidinkonzentration die DNA-Synthese in der S-Phase unterdrückt und somit die Zellteilung um bis zu 90 % inhibiert. Ein Doppel-Block, d. h. zwei Inkubationen mit dem Hemmstoff in gewissen zeitlichen Abständen, sollte die Synchronität der Zellkultur erhöhen.

Exponentiell wachsenden Zellen wurde Thymidin in einer Endkonzentration von 2 mM zugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 16 Stunden wurden die Zellen mit 1x PBS gewaschen und mit normalem Vollmedium versorgt, um den Austritt aus der S-Phase zu gewährleisten. Nach 8 Stunden bei 37°C wurde erneut

thymidinhaltiges Medium zugegeben und die Zellen weitere 14 Stunden inkubiert. Es folgten zwei Waschschr tte mit 1x PBS und die Zugabe von Vollmedium ohne das DNA-inhibierende Reagens, um ein Weiterlaufen des Zellzyklus zu erreichen. 1 h nach der Entfernung des thymidinhaltigen Mediums wurden die Zellen geerntet und die Phasen des Zellzyklus über FACS-Messungen kontrolliert.

4.3.3 Propidiumiodid-Färbung

<u>DNA-Puffer:</u>	Tris-HCl, pH 7,5	100 mM
	NaCl	154 mM
	CaCl ₂	1 mM
	MgCl ₂	0,5 mM
	BSA	0,2 %
	Triton-X-100	0,1 %
	RNase A	5 µg/ml
	Propidiumiodid	20 µg/ml

Für eine durchflusszytometrische Messung im FACS wurden die Zellen mit Propidiumiodid angefärbt. Propidiumiodid ist ein stark basisches Reagens, das in den Zellkern eindringt und mit der helikalen Struktur der DNA interkaliert. Bei der FACS-Messung wird es durch den Laserstrahl des Zytometers angeregt und dadurch zur Fluoreszenz gebracht.

Die Zellen wurden trypsinisiert, in 5 ml 1x PBS aufgenommen, pelletiert und erneut in 1x PBS aufgenommen. Es wurde das doppelte Volumen an 70 %-igem EtOH zugegeben und die Suspension vorsichtig gemischt. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurde das Pellet in DNA-Puffer aufgenommen, resuspendiert und für 30 Minuten bei 4° C im Dunklen angefärbt.

4.4 Infektion von Säugerzellen mit Listerien

24 h vor einer geplanten Infektion wurden 2×10^5 Zellen pro Napf in 12-Napf-Platten ausgesät. Für Immunfluoreszenz- und Giemsa-Färbungen wurden in die N pfe jeweils sterile Deckgläser aus Glas (\varnothing 10 mm) vorgelegt. Für GFP Assays wurden die Zellen statt in Napf-Platten in Zellkulturschalen ausgesät (\varnothing 60 mm). Unmittelbar vor der Infektion wurden die Gewebekulturzellen zweimal vorsichtig mit 1x PBS^{Ca²⁺/Mg²⁺} gewaschen und serumfreies Medium zugegeben, das die einer bestimmten "multiplicity of infection" (MOI) entsprechende Anzahl an Listerien enthielt. Unter der MOI versteht man die Zahl der pro Zelle eingesetzten Bakterien.

Bei Cos-1-Fibroblasten wurden die Bakterien 10 min bei 1200 rpm auf die Zellen zentrifugiert und anschließend 50 min bei 37° C weiter inkubiert, bei Infektionen mit Caco-2 Zellen entfiel dieser Zentrifugationsschritt. Makrophagen wurden normalerweise aufgrund ihrer phagozytischen Aktivität nur für 40 min ohne Zentrifugationsschritt infiziert. Nach einer definierten Infektionszeit wurden die Zellen dreimal mit 1x PBS^{Ca²⁺/Mg²⁺} gewaschen, um noch extrazellulär verbliebene Bakterien zu entfernen. Den Zellen wurde gentamycinhaltiges Medium (50 µg/ml) zugegeben, um adh rente Bakterien abzutöten. Dieser Zeitpunkt gilt als t_0 , jeder weitere Zeitpunkt entsprechend als t_x , wobei "X" die Zeit in Stunden angibt, die seit t_0 verstrichen ist.

4.4.1 Invasionstest

Für den Invasionstest wurden die infizierten Zellen bei t_1 zweimal mit 1x PBS gewaschen und für 5-10 min mit 750 μ l 0,1 % Triton-X-100 Lösung auf Eis inkubiert, bis die Zellen lysiert waren. Das Abkugeln und Platzen der Zellen wurde im Mikroskop verfolgt. Die Lysate wurden in Eppendorfgefäße überführt, die Näpfe mit je 750 μ l sterilem aqua dest. gespült und ebenfalls in das entsprechende Eppendorfgefäß überführt. Es wurden Verdünnungsreihen angelegt, von geeigneten Verdünnungen jeweils 100 μ l auf BHI-Agar ausplattiert und über Nacht bei 37° C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die CFU's ausgezählt und die tatsächliche Anzahl intrazellulärer Listerien bestimmt:

Intrazelluläre Zellzahl = Anzahl CFU's x Verdünnungsfaktor x 10 x Endvolumen

Die Infektionen wurden in Triplets angesetzt. Nach der Bestimmung der Bakterienzahlen wurde die absolute Invasionsrate des Stammes errechnet. Die Invasionsrate des Referenzstammes EGD wurde auf 100 % gesetzt und daraus die relative Invasionsrate parallel infizierter Stämme im Vergleich zum Referenzstamm kalkuliert.

Absolute Invasionsrate (%): $\frac{\text{Anzahl der Bakterien Infektionsansatz} \times 100}{\text{Anzahl der Bakterien im Infektionsmedium}}$

Relative Invasionsrate (%): $\frac{\text{Absolute Invasionsrate des Stammes XY} \times 100}{\text{Absolute Invasionsrate des Referenz-Stammes}}$

Für die statistische Auswertung wurden die Mittelwerte berechnet und daraus die Standardabweichung. Zur Bestimmung der Signifikanz (p) der Ergebnisse wurde der "Students t -Test" angewendet. Bei $p \leq 0,05$ wurde das Ergebnis als signifikant erachtet, bei p -Werten $> 0,05$ galt das Ergebnis als nicht-signifikant.

4.4.2 Replikations-Test

Das intrazelluläre Replikationsverhalten von Bakterien wurde anhand von parallel durchgeführten Infektionen mit unterschiedlich langen Inkubationszeiten in gentamycinhaltigem Medium untersucht. Die Zellen wurden zu den Zeitpunkten t_0 , t_1 , t_3 und t_6 wie schon beim Invasions-Test unter 4.4.1 beschrieben lysiert und die Anzahl der intrazellulären Bakterien pro Napf durch das Ausplattieren geeigneter Verdünnungen ermittelt. Jede Infektion wurde in dreifachen Ansätzen durchgeführt und in mindestens drei voneinander unabhängigen Experimenten auf ihre Reproduzierbarkeit überprüft. Für die statistische Auswertung wurde die Signifikanz der Ergebnisse mit dem Students t -Test ermittelt.

4.4.3 Überwachung einer *Listeria*-Infektion mittels GFP

Um die interzelluläre Ausbreitung von *L. monocytogenes* in einem Zellrasen zu jedem Zeitpunkt p. I. untersuchen zu können, wurden Listerien mit dem Plasmid P_{actA} -*gfp* transformiert. Das auf diesem Plasmid codierte *gfp* steht dabei unter der Kontrolle des *actA*-Promotors und wird nach dem Eintritt ins Zytoplasma der Wirtszelle aktiviert.

Die Zellen wurden mit einer niedrigen MOI *gfp*-exprimierender Listerien infiziert. Nach einer definierten Infektionszeit wurde der Zellrasen mit 1x PBS gewaschen und mit gentamycinhaltigem Medium (50 µg/ml) versorgt. Nach 60 min wurde dieses Medium abgezogen und durch RPMI mit 10 µg/ml Gentamycin ersetzt. Die Infektion wurde zu verschiedenen Zeitpunkten unter dem inversen Fluoreszenzmikroskop betrachtet und die Vermehrung der grün leuchtenden Listerien, deren interzelluläre Ausbreitung sowie die Fluoreszenzintensität protokolliert.

4.5 Färbung von infizierten Gewebekulturzellen

Für die folgenden Färbungen wurden die Zellen auf der Oberfläche von Deckgläsern (ø 10 mm) kultiviert. Diese wurden vor Gebrauch autoklaviert und unmittelbar vor dem Aussäen der Zellen in die Näpfe vorgelegt.

4.5.1 Färbung von Zellen mit Giemsa

Infizierte Zellen wurden zu den Zeitpunkten t_0 , t_1 , t_3 und t_6 mit 1x PBS^{Ca²⁺/Mg²⁺} gewaschen und anschließend für 5 min in vorgekühltem Methanol (MetOH) auf den Deckgläsern fixiert. Nach dem Trocknen wurden die Deckgläser 20 min in einer Napfplatte mit je 1 ml frisch-verdünnter Giemsa-Lösung (1:20 in aqua dest.) angefärbt. Anschließend wurden sie in eine neue Napfplatte mit aqua dest. überführt und so lange auf dem Taumler gewaschen, bis das Waschmedium nicht mehr eingefärbt wurde. Nach vollständigem Trocknen der Präparate wurden diese mit der Zelloberseite nach unten ("upside-down") möglichst luftblasenfrei auf einen Tropfen durchsichtigen Nagellack auf einem Objektträger aufgelegt. Die Auswertung erfolgte im Lichtmikroskop. Hierzu wurden zufällige Stellen auf dem Präparat anjustiert und die Gesamtzahl an Zellen innerhalb des Sichtfeldes bestimmt; anschließend wurden sich im Sichtfeld befindende infizierte Zellen sowie die Anzahl intrazellulärer Bakterien ausgezählt.

4.5.2 Färbung von Zellen mit FITC-Phalloidin

Zur Darstellung des filamentösen Aktins mit FITC-Phalloidin wurden die infizierten Zellen zu den Zeitpunkten t_4 und t_6 zweimal mit 1x PBS^{Ca²⁺/Mg²⁺} und einmal mit kaltem PHEM-Puffer gewaschen, bevor sie für 1 min in kaltem PHEM/0,5 % Triton-X-100 inkubiert wurden. Dieser Schritt diente zur Permeabilisierung der Zellmembran. Die Deckgläser wurden in eine Glasschale mit vorgekühltem Aceton überführt und die Zellen 3 min bei -20° C fixiert. Die Deckgläser wurden mit den Zellen nach Oben auf Parafilm getrocknet, mit den Zellen "upside-down" möglichst luftblasenfrei auf einen 60 µl Tropfen FITC-Phalloidin (1:20 in PBS) auf Parafilm aufgebracht und im Dunklen 20 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Die Deckgläser wurden anschließend in eine neue 12-Napfplatte überführt und im Dunkeln dreimal für je 5 min in 1x PBS auf einem Taumler gewaschen. Sie wurden "upside-down" auf einem 4 µl Tropfen des Einbettmediums "Citiflur" auf einem Objektträger aufgebracht und mit Nagellack gegen Austrocknung versiegelt. Die Präparate wurden mit Ölimmersion im Phasenkontrast und der Fluoreszenz mikroskopiert, geeignete Präparate photographiert und anschließend mit dem Programm "Citimorph" überlagert.

4.5.3 Immunfluoreszenzfärbung mit dem anti-Stathmin-Antikörper

Für eine anti-Stathmin-Färbung wurden die Deckgläser mit den Kulturzellen in den 12-Napf-Platten zweimal vorsichtig mit 1x PBS^{Ca²⁺/Mg²⁺} gewaschen, in eine Glasschale mit vorgekühltem Methanol überführt und 6 min bei -20° C fixiert. Anschließend wurden sie zum Absättigen unspezifischer Bindungsstellen "upside-down" auf einen 30 µl Tropfen 1x PBS/3 % Ziegenserum (ZS) gelegt und 1 h bei RT im Dunkeln inkubiert. Um ein Austrocknen der Zellen zu verhindern, wurde eine verschließbare Dose mit Parafilm ausgelegt und ein mit Wasser getränktes Kosmetiktuch beigefügt. Zum Waschen wurden die Deckgläser in eine neue 12-Napf-Platte überführt und dreimal je 15 Sekunden in 1x PBS geschwenkt. Nach dem letzten Waschschrift wurden die Deckgläser aus der Platte genommen, überschüssiges PBS von Rand und Unterseite vorsichtig abgesaugt und "upside-down" auf einen 30 µl Tropfen des ersten Antikörpers (anti-Stathmin aus dem Kaninchen, 1:200 in 1x PBS/2 % ZS) gelegt. Die Zellen wurden so über Nacht bei 4° C in der verschließbaren Dose inkubiert und am nächsten Tag nach dreimaligem Waschen für 2 h auf einen 30 µl Tropfen des Rhodamine RedTM-X-konjugierten Ziege-anti-Kaninchen-Antikörpers aufgebracht. Nach dreimaligem Waschen wurden die Deckgläser "upside-down" luftblasenfrei auf einen 4 µl Tropfen Citiflur gelegt und mit Nagellack luftdicht versiegelt. Für die Auswertung wurden geeignete Stellen im Präparat in der Immunfluoreszenz und im Phasenkontrast photographiert und anschließend mit dem PC-Programm "Citimorph" überlagert.

4.5.4 Immunfluoreszenzfärbung mit dem anti-Tubulin-Antikörper

Für eine anti-Tubulin-Färbung wurden die Deckgläser mit den Kulturzellen zweimal mit 1x PBS^{Ca²⁺/Mg²⁺} und einmal mit PHEM-Puffer gewaschen, bevor sie für 1 min in PHEM/0,5 % Triton-X-100 inkubiert wurden. Der anschließende Fixierungsschritt erfolgte für 3 min in einer Glasschale mit vorgekühltem Aceton bei -20° C. Die Deckgläser wurden mit den Zellen nach oben auf einem Stück Parafilm getrocknet und anschließend für 1 h "upside-down" auf 30 µl 1x PBS/3 % ZS gelegt, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Nach dreimaligem Waschen mit 1x PBS^{Ca²⁺/Mg²⁺} wurden die Deckgläser über Nacht bei 4° C in der verschließbaren Dose "upside-down" auf einem 30 µl Tropfen des anti-Tubulin-Antikörpers (Maus, 1:200 in PBS/2 % ZS) inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen nach dreimaligem Waschen für 50 min im Dunkeln bei RT auf einen 30 µl Tropfen des CyTM3-konjugierten Ziege-anti-Maus-Sekundärantikörpers (1:600 in PBS/2 % ZS) gelegt. Nach mehrmaligem Waschen mit 1x PBS/0,2 % Tween wurden die Deckgläser "upside-down" auf einem Objektträger mit Citiflur aufgebracht und gegen Austrocknung mit Nagellack versiegelt. Die Präparate wurden in der Immunfluoreszenz und im Phasenkontrast mikroskopiert, photographiert und mit "Citimorph" überlagert.

4.6 Arbeiten mit Mäusen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden sowohl BALB/c Mäuse als auch C57/BL6 Mäuse für *in vivo* und *ex vivo*-Studien verwendet. Die Tiere stammten entweder von Charles River Deutschland GmbH, Harlan Winkelmann GmbH oder im Falle der C57/BL6 Stathmin knock-out Linie von Dr. U. Schubart, USA bzw. aus der eigenen Zucht. Für Infektionsversuche in der Maus wurden 6-8 Wochen alte,

weibliche Tiere verwendet. Für die Gewinnung von primären Knochenmarksmakrophagen wurden männliche Tiere verwendet.

4.6.1 Haltung und Zucht von Stathmin knock-out Mäusen

Die Zucht der Stathmin knock-out Mäuse erwies sich als etwas kompliziert, da homozygote Stathmin knock-out Weibchen unmittelbar nach der Geburt ihres Wurfes ein recht aggressives Verhalten gegenüber ihrer Brut aufwiesen. Oftmals wurden die Jungen binnen weniger Stunden aufgefressen oder die Milch zurückgehalten, wenn sich die Mütter durch äußere Einflüsse gestört fühlten. Verglichen mit der Wurfstärke wildtypischer C57/BL6 Mäuse waren die der knock-out Tiere meist deutlich kleiner. Oft befanden sich im Wurf der knock-out Mäuse Junge, die deutliche Wachstumsdefizite aufwiesen und nur halb so groß waren wie wildtypische Mäusebabys.

Zum Erhalt des Genotyps wurden nach Möglichkeit homozygote knock-out Tiere^(-/-) miteinander verpaart oder aber ein homozygoten Stathmin knock-out Männchen^(-/-) mit einem heterozygoten^(+/-) Weibchen, da sich diese in der Brutpflege als weniger aggressiv und fürsorglicher erwiesen. Die Würfe einer solchen (-/-)x(+/-) Verpaarung wurden spätestens im Alter von 18 Tagen mit Ohrmarken im linken Ohr markiert, mittels PCR genotypisiert (s. 4.6.2) und anschließend nach homozygoten bzw. heterozygoten Tieren selektioniert. Nach ca. 5-8 Generationen wurden die Stathmin knock-out Tiere mit wildtypischen C57/BL6 Mäusen rückgekreuzt.

4.6.2 Genotypisierung von Mäusen

<u>Lysepuffer:</u>	ATL-Puffer	90 %
	Proteinase K	10 %

Zur Genotypisierung von Mäusen aus einer Stathmin (-/-) x (+/-)-Verpaarung wurde den jeweiligen Tieren ein Teil des rechten Ohrlappens ohne Knorpelgewebe abgeschnitten und die genomische DNA mit dem DNeasy Tissue Kit von QIAGEN nach dem Protokoll des Herstellers extrahiert. Das Gewebe wurde mit einem sauberen Skalpell mechanisch zerkleinert, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und über Nacht bei 55° C in 200 µl Lysepuffer inkubiert. Zur vollständigen Homogenisierung des Gewebes wurde der Ansatz kurz resuspendiert und anschließend für 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen, in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 200 µl AL-Puffer gemischt. Nach 10 Minuten bei 70° C wurden 200 µl EtOH (100 % p. a.) zugegeben und das Lysat durch eine Säule zentrifugiert. Die Membran wurde zunächst mit 500 µl AWI-Puffer und unmittelbar anschließend mit 500 µl AWII-Puffer gewaschen. Die DNA wurde zweimal mit je 200 µl AE-Puffer eluiert und bei 4° C aufbewahrt. Für eine Polymerase Kettenreaktion (PCR, siehe 4.7.7) wurde diese DNA 1:10 verdünnt als Template eingesetzt.

4.6.3 Infektion von Mäusen mit *L. monocytogenes*

Die für diese Arbeit verwendeten Tiere wurden ausschließlich über eine intravenöse Applikation (i. v.) mit verschiedenen *L. monocytogenes*-Stämmen infiziert. Die sublethale Dosis i. v. verabreichter wildtypischer Listerien liegt für BALB/c-Mäuse bei 5×10^3 Bakterien, für C57/BL6 Mäuse hingegen bei 10^4

Bakterien (Engelbrecht *et al.*, 1996). Daher wurden die Bakterienaliquots für diese Versuche möglichst genau auf eine Konzentration von 5×10^4 Listerien/ml in endotoxinfreiem PBS eingestellt.

Die Listerien wurden wie in 4.1.1 beschrieben kultiviert und geerntet. Unmittelbar vor der Infektion wurden die Tiere unter Rotlicht angewärmt, um eine stärkere Durchblutung und bessere Darstellung der lateralen Schwanzvenen zu erreichen. 5×10^3 Bakterien/Stamm wurden in 100 μ l endotoxinfreiem PBS langsam mit einer Einmal-Tuberkulinspritze mit aufgesetzter 0,4 mm Einmal-Kanüle in eine der seitlichen Schwanzvenen eines fixierten Tieres injiziert. Nach erfolgreicher Applikation wurden die Tiere täglich beobachtet und im Falle auftretender Krankheit sofort gemäß dem Tierschutzgesetz artgerecht und schmerzlos getötet.

4.6.4 Isolierung von Listerien aus Milz und Leber

Um die Virulenz verschiedener *L. monocytogenes* Stämme zu untersuchen, wurde die Anzahl der Listerien in den Organen Milz und Leber zu verschiedenen Zeitpunkten nach der i. v. Infektion einer Maus bestimmt.

Die Mäuse wurden in Gruppen von mehreren weiblichen Tieren infiziert und zu einem bestimmten Zeitpunkt p. I. durch zervikale Dislokation getötet. Milz und Leber wurden unter aseptischen Bedingungen entnommen, gewogen und in Homogenisierungs-Tütchen überführt, in die jeweils 1 ml steriles aqua dest. vorgelegt war. Die Tütchen wurden sorgfältig verschlossen und für ca. eine Stunde auf Eis gelegt, um ein leichteres Aufschließen der Organe zu erreichen. Leber und Milz wurden in den Tütchen gründlich homogenisiert und anschließend in ein 5 ml-Röhrchen pipettiert. Aufgrund von Geweberesten wurden zum Pipettieren der dickflüssigen Suspension abgeschnittene Pipettenspitzen verwendet. Die Tütchen wurden jeweils mit 1 ml sterilem aqua dest. gespült und dieses ebenfalls in die Röhrchen überführt. Mittels Ultraschall-Behandlung wurden die Zellen der Organe weiter aufgeschlossen. Zur Bestimmung der Bakterienzahl pro Organ wurden geeignete Verdünnungsreihen auf BHI-Agarplatten ausplattiert.

4.6.5 Isolierung primärer Knochenmarksmakrophagen (BMM Φ)

Männliche Mäuse wurden durch zervikale Dislokation getötet. Sie wurden am Arbeitsplatz auf dem Rücken liegend an 3 Extremitäten auf einem mit EtOH desinfizierten Styropordeckel fixiert und ebenfalls mit EtOH desinfiziert. Am nicht-fixierten Hinterbein wurde ausgehend vom Knie der Oberschenkelknochen freigelegt und mit einer sterilen Schere nahe am Hüftgelenk abgetrennt und in eine Petrischale überführt. Mit dem zweiten Hinterbein bzw. Oberschenkelknochen wurde ebenso verfahren. Alle weiteren Schritte wurden an der Sterilbank durchgeführt. Der Oberschenkelknochen wurde unmittelbar oberhalb des Kniegelenkes abgeschnitten, so dass er jetzt an beiden Seiten geöffnet war. Das Knochenmark war als kleiner roter Punkt zu erkennen. Mit einer sterilen Spritze und einer aufgesteckten 27-G Kanüle wurden 10 ml antibiotikahaltiges BMM Φ -Entnahmemedium durch den Knochen in ein 50 ml Greiner-Röhrchen gespült, wodurch das Knochenmark mit ausgespült wurde. Die Erythrozyten und Monozyten wurden durch vorsichtiges Resuspendieren vereinzelt und für 10 min bei 1000 rpm, 25° C zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde in 10 ml Entnahmemedium aufgenommen und die Anzahl an Monozyten durch Auszählen

in einer Zählkammer bestimmt. Es wurden 2×10^6 Monozyten in 90 mm Kulturschalen oder 1×10^5 Monozyten pro Napf in eine 12-Napf Platte ausgesät. Nach 2 Tagen wurde das Medium abgenommen und durch antibiotikahaltiges BMM Φ -Kulturmedium ersetzt. 10–12 Tage nach der Entnahme wurden die zu BMM Φ 's ausdifferenzierten Zellen trypsinisiert und in antibiotikafreiem BMM Φ -Kulturmedium ausgesät. Die Zellen wurden bis zu Tag 15 nach der Entnahme infiziert.

4.6.6 Isolierung von Gesamtzellprotein aus Leber und Milz

<u>Trispuffer:</u>	Tris	121 mg
	MgCl ₂	102 mg
	aqua dest.	80 ml
		pH Wert auf 7,2 einstellen
	aqua dest.	ad 100 ml

Dass es sich bei den für die Makrophagen-Isolierung verwendeten Mäusen auch wirklich um Stathmin knock-out Mäuse handelte, wurde im Westernblot mit einem anti-Stathmin-Antikörper untersucht. Hierzu wurde diesen Tieren die Milz entnommen und diese in 980 μ l Tris-Puffer, 20 μ l Protease-Inhibitoren-Mix und 1 mg RNase homogenisiert. Die erhaltene Suspension wurde auf eine Lysing Matrix B überführt und sechsmal für je 30 Sekunden auf dem Vortexer aufgeschlossen. Zwischendurch wurde der Ansatz jeweils für eine Minute auf Eis inkubiert, um ein Überhitzen der Proben zu verhindern. Die Zelltrümmer wurden abzentrifugiert, der Überstand abgenommen und mit 2,5 μ l Benzonase (BioRad) 5 min bei RT inkubiert. Das Lysat wurde mit Harnstoffpuffer auf ein Endvolumen von 1 ml gebracht und bei 4° C gelagert, bei längerer Aufbewahrung auch bei -20° C.

4.7 Molekularbiologische Methoden

4.7.1 Isolierung chromosomaler DNA aus Listerien

<u>Enzymlösung:</u>	Lysozym (120 mg/ml)	17 μ l
	Mutanolysin (2,5 U/ μ l)	8 μ l
	Tris-HCl (10 mM, pH 8,0)	ad 1 ml

2 ml einer Übernachtskultur wurde 5 min bei RT und 15.000 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 ml Enzymlösung resuspendiert und 30 min bei 37° C inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet vorsichtig in 750 μ l DNazol[®] aufgenommen, 2 min bei RT zentrifugiert und der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Durch die Zugabe von 0,5 Volumen 100 %-igem EtOH p. a. fiel die DNA sofort aus und konnte mittels eines Glasstäbchens aufgewickelt und in 500 μ l 75 %-igen EtOH p. a. überführt werden. Die DNA wurde kurz bei 4° C und 15.000 x g zentrifugiert und das Pellet erneut in 75 %-igem EtOH p. a. gewaschen. Anschließend wurde die DNA in der Speedvac getrocknet und in 75 μ l 8 mM NaOH aufgenommen. Sobald sich die DNA vollständig gelöst hatte, wurde das Volumen des Ansatzes auf 200 μ l aufgefüllt und bei 4° C gelagert.

4.7.2 Plasmidisolierung im kleinen Maßstab – "Miniprep"

Die Plasmidisolierung im kleinen Maßstab erfolgte mit dem "Amersham GFX™ Micro Plasmid Kit" von Amersham nach dem Protokoll des Herstellers. 1-2 ml einer in Selektionsmedium gezogenen Übernachtskultur wurden kurz abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 300 µl Lösung I resuspendiert. Nach der Zugabe von 300 µl Lösung II wurde der Ansatz einige Male invertiert, 5 min bei RT inkubiert und durch die Beifügung von 600 µl Lösung III neutralisiert. Es folgte ein 10-minütiger Zentrifugationsschritt, anschließend wurde der Überstand durch eine GFX-Säule zentrifugiert. Nach einem Waschschrift mit 600 µl Waschpuffer wurde die Säule durch Zentrifugation getrocknet und die DNA mit 50 µl aqua dest. eluiert. Die Lagerung erfolgte bei -20° C.

Bis auf aqua dest. waren alle verwendeten Säulen, Puffer und Lösungen im Kit enthalten.

4.7.3 Plasmidisolierung im mittleren Maßstab – "Midiprep"

Die Midiprep wurde mit dem "Nucleobond^R AX 100" Kit (Macherey-Nagel GmbH) durchgeführt. Die Isolierung aus 50 ml Übernachtskultur erfolgte nach Anleitung des Herstellers. In Selektionsmedium gezogene Bakterien wurden abzentrifugiert und in 4 ml S1-Puffer resuspendiert. Durch Zugabe von 4 ml S2-Puffer wurden die Bakterien lysiert. Der Ansatz wurde vorsichtig invertiert und 5 min bei RT inkubiert. Dem Lysat wurden 4 ml vorgekühlter S3 Neutralisationspuffer zugegeben, vorsichtig gemischt und 10 min auf Eis inkubiert. Im nachfolgenden Zentrifugationsschritt sammelte sich die Plasmid-DNA im Überstand an und wurde anschließend über einen mit N2-Puffer getränkten Faltenfilter filtriert. Dieser Filter wurde zweimal mit je 4 ml N3-Puffer gewaschen, die DNA im Anschluss daran zweimal mit je 1 ml N5-Puffer eluiert. Die DNA wurde mit Isopropanol gefällt, pelletiert und mit 70 %-igem EtOH p. a. gewaschen. Nach kurzer Vakuumtrocknung wurde sie in 75 µl aqua dest. aufgenommen und bei -20° C gelagert.

Bis auf aqua dest. waren alle verwendeten Säulen, Puffer und Lösungen im Kit enthalten.

4.7.4 Isolierung von RNA aus Listerien

Um Kontaminationen mit RNasen zu vermeiden, wurden bei allen Arbeiten mit RNA Handschuhe getragen und DEPC-behandelte Lösungen verwendet. Die Isolierung von RNA aus Listerien erfolgte mit dem "RNeasy Mini Kit" von QIAgen nach dem Protokoll des Herstellers. Eine Übernachtskultur wurde 1:20 in BHI verdünnt und bis zu einer $OD_{600nm} = 1,0$ kultiviert. 10 ml dieser Kultur wurden abzentrifugiert, das Pellet in 700 µl RLT-Puffer und 7 µl β-Mercaptoethanol resuspendiert. Die Bakterienzellen wurden im "FastPrep FP 120" dreimal für je 45 Sekunden auf Stufe 6,5 aufgeschlossen. Zwischendurch wurden die Ansätze jeweils eine Minute auf Eis inkubiert, um einem Überhitzen des Ansatzes entgegenzuwirken. Zelltrümmer wurden abzentrifugiert, der Überstand in ein neues Gefäß überführt und mit 500 µl 100 %-igem EtOH p. a. versetzt. Dieser Ansatz wurde in zwei Schritten durch eine Säule mit einer Silikamembran zentrifugiert. Es wurden 700 µl RWI-Puffer zugegeben und der Ansatz erneut zentrifugiert. Nach der Zugabe von 10 µl DNase und 70 µl RDD-Puffer wurde die

Säule 15 Minuten bei RT inkubiert, bevor sie mit 350 µl RWI-Puffer gewaschen wurde. Nach zwei weiteren Waschschritten mit je 500 µl RPE-Puffer wurde die Membran trocken zentrifugiert. Die RNA wurde mit 75 µl DEPC-H₂O eluiert und bei -80° C gelagert. Die für die Isolierung verwendeten Puffer, Lösungen und Säulen waren im Kit enthalten.

4.7.5 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentration und Reinheit einer DNA-Lösung wurde photometrisch durch Messung der optischen Dichte bestimmt. Die Bestimmung der Konzentration beruht darauf, dass Nukleinsäuren Licht der Wellenlänge 260 nm absorbieren, Proteine jedoch Licht einer Wellenlänge von 280 nm. Die zu messende Probe wurde 1:100 mit aqua dest. verdünnt und die Extinktion bei 260 nm und 280 nm bestimmt. Die Konzentration wurde anschließend nach folgender Formel berechnet:

$$\text{ds DNA-Konzentration } [\mu\text{g/ml}] = \text{OD}_{260\text{nm}} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 50$$

$$\text{ss Oligonukleotidkonzentration } [\mu\text{g/ml}] = \text{OD}_{260\text{nm}} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 20$$

Der Quotient aus OD_{260 nm}/OD_{280 nm} ergibt den Reinheitsgrad der Probe und sollte zwischen 1,5 und 2,0 liegen. Bei einer Ratio < 1,5 ist die Probe mit Proteinresten verunreinigt, bei einer Ratio ≥ 2 mit RNA.

Bei sehr geringen DNA-Mengen wurde zur ungefähren Ermittlung der Konzentration ein definiertes Volumen der zu bestimmenden Lösung mit verschiedenen Volumina einer DNA-Lösung bekannter Konzentration in einem Agarosegel aufgetragen. Durch Vergleichen der Bandenintensität unter UV-Licht konnte die ungefähre Konzentration der DNA-Lösung bestimmt werden.

4.7.6 Konzentrationsbestimmung von RNA

Die Konzentrationsbestimmung der RNA erfolgte wie die für DNA (s. 4.7.5), jedoch mit folgender Formel:

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

Der Quotient aus OD_{260nm}/OD_{280nm} ergibt den Reinheitsgrad und sollte bei Werten um 2,0 liegen.

4.7.7 Polymerase Kettenreaktion PCR

In einer PCR werden spezifische DNA-Abschnitte, die von zwei bekannten DNA-Sequenzen flankiert werden, in einem sich mehrfach wiederholenden Kreisprozess amplifiziert. Die Zyklen bestehen aus einem Denaturierungsschritt (94° C), einem Annealingschritt (48° C - 58° C) und einem Elongationsschritt (72° C). Als Template kann genomische DNA, Plasmid-DNA oder bakterielles Zelllysat eingesetzt werden. Es werden außerdem kurze einzelsträngige DNA-Moleküle, so genannte Primer benötigt, die komplementär zu den Enden der zu amplifizierenden DNA-Matrize sind. Die Annealingtemperatur der PCR ist dabei abhängig von der Schmelztemperatur (T_m) der beiden Primer und kann anhand einer Faustregel berechnet werden:

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

Als Annealingtemperatur wurden in dieser Arbeit Temperaturen gewählt, die 5° C unter der berechneten Schmelztemperatur T_m lagen. Als hitzestabile Polymerasen wurden die Taq-Polymerase, isoliert aus dem hitzestabilen Bakterienstamm *Thermus aquaticus*, oder die Pfu Polymerase aus *Pyrococcus furiosus* verwendet. Für Klonierungsarbeiten wurde die Pfu-Polymerase verwendet, da sie im Gegensatz zur Taq-Polymerase eine "proof-reading"-Aktivität besitzt.

Ein 100 µl-Standardansatz in einem Schnappdeckelgefäß wurde wie folgt zusammenpipettiert:

- 10 µl Taq-Reaktionspuffer (10x)
- 7,0 µl MgCl₂ (25 mM)
- 1,0 µl dNTPs (je 20 mM)
- 1 µl Primer I (10 pmol)
- 1 µl Primer II (10 pmol)
- 0,5 µl thermostabile Polymerase (5 U/µl)
- ad 100 µl aqua dest.

Nach Beendigung der PCR wurden 10 µl des Ansatzes zur qualitativen und quantitativen Analyse auf ein Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt.

4.7.8 Reinigung von PCR-Produkten und Abtrennung von Restriktionsfragmenten

Bevor die in der PCR amplifizierte DNA weiterverwendet wurde, wurden die Ansätze zur Entfernung der Primer, Nukleotide, Enzyme und Salze mit dem "QIAquick PCR Purification Kit" von QIAGEN nach dem Protokoll des Herstellers gereinigt. Alle dafür benötigten Puffer sowie die Kieselgel-Säulen waren im Kit enthalten. 5 Volumenteile PB-Puffer wurden zum PCR-Ansatz gegeben und dieses Gemisch durch eine QIAquick Kieselgel-Säule zentrifugiert. Die Membran wurde anschließend zweimal mit 750 µl PE-Puffer gewaschen und durch einen weiteren dreiminütigen Zentrifugationsschritt getrocknet. Zur Elution der an die Säulenmembran gebundenen DNA wurden 50 µl EB-Puffer aufpipettiert, 1 min bei RT inkubiert und anschließend für 1 min zentrifugiert. Das Eluat wurde bei -20° C gelagert oder aber weiter verarbeitet.

4.7.9 Reamplifikation von PCR-Produkten

PCR Produkt-Mengen, die zu gering waren um für weitere Klonierungen verwendet zu werden, wurden als Template für eine erneute PCR eingesetzt. Der Ansatz wurde 1:50 verdünnt und hiervon 1-3 µl als Template für eine zweite PCR eingesetzt, die mit den gleichen Primern und Pufferbedingungen durchgeführt wurde.

4.7.10 Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen (Restriktionsenzyme) sind Bestandteil des bakteriellen Restriktions-/Modifikationssystems und ermöglichen die sequenzspezifische

Spaltung doppelsträngiger DNA. Diese wird, abhängig vom verwendeten Enzym, mit überstehenden "sticky-ends" oder mit glatten "blunt-ends" geschnitten. Die für eine Spaltung eingesetzte Enzymmenge richtete sich nach der DNA-Menge, die gespalten werden sollte. Sie betrug jedoch nicht mehr als 1/10 des Gesamtvolumens, da das im Puffer enthaltene Glycerin die Enzymaktivität zu stark beeinträchtigen könnte. Die Konzentration des Reaktionspuffers war abhängig vom verwendeten Enzym und wurde nach Anleitung des Herstellers eingesetzt.

Zur Spaltung von Plasmid-DNA wurde folgender Standard-Ansatz pipettiert und für 1,5-2 h bei 37° C oder über Nacht bei RT inkubiert:

Plasmid-DNA	5 µl (ca. 1 µg)
Puffer (10x), je nach Enzym	nach der Empfehlung des Herstellers
Restriktionsenzym	2–4 U
aqua dest.	ad 20 µl

Sollten PCR-Produkte einem Restriktionsverdau unterzogen werden, wurden sie zuvor wie unter 4.7.8 beschrieben gereinigt und anschließend mit dem gewünschten Enzym 1,5-2 h bei 37° C oder über Nacht bei RT verdaut. Für eine Standardspaltung mit *Bam*HI oder *Kpn*I wurde folgender Ansatz pipettiert:

<u>Verdau mit <i>Bam</i>HI:</u>	PCR-Produkt	25 µl
	<i>Bam</i> HI-Puffer (10x)	4 µl
	<i>Bam</i> HI (10 U/ µl)	1,5 µl
	aqua dest.	ad 40 µl

<u>Verdau mit <i>Kpn</i>I:</u>	PCR-Produkt	25 µl
	<i>Kpn</i> I-Puffer (10x)	4 µl
	<i>Kpn</i> I (10 U/ µl)	2 µl
	aqua dest.	ad 40 µl

4.7.11 Dephosphorylierung linearer DNA

Wird ein Plasmid mit nur einem Restriktionsenzym geschnitten entstehen zwei kompatible Enden, die wieder miteinander ligieren können. Um eine solche Re-ligation linearisierter Plasmid-DNA zu vermeiden, wurden mittels einer Alkalischen Phosphatase aus Kälberdarm ("CIAP") die 5'-Phosphatreste von beiden linearisierten Enden entfernt. Die "CIAP"-Behandlung erfolgte nach dem Verdau mit Restriktionsendonukleasen und Reinigung der Plasmid-DNA in folgendem Ansatz:

linearisierte Plasmid-DNA	15 µl
CIAP-Puffer (10x)	2 µl
CIAP (1 U/ µl)	1 µl
aqua dest.	ad 20 µl

Die Inkubation mit der CIAP erfolgte für 1 h bei 37° C. Zur Hitzeinaktivierung des Enzyms wurde dem Ansatz 5 µl EDTA zugefügt und dieser für 20 min bei 65° C inkubiert. Das Lysat wurde anschließend mit dem QIAquick PCR Purification Kit (4.7.8) gereinigt und bei -20° C aufbewahrt.

4.7.12 Ligation von DNA-Fragmenten

Die T4-DNA-Ligase ist aufgrund ihrer Schnelligkeit und Unempfindlichkeit gegenüber Pufferbedingungen ein Standardenzym für Ligationen. Sie verknüpft freie 3'-Hydroxylenden mit 5'-Phosphatenden durch Bildung von Phosphodiesterbindungen unter ATP-Verbrauch. Vor einer erfolgreichen Ligation müssen die zu ligierenden Fragmente mit dem gleichen Restriktionsenzym geschnitten worden sein. Für die Ligation eines Fragmentes mit einem Plasmid wurden Insert und Plasmid im Verhältnis von 10:1 eingesetzt:

<u>Standardansatz</u>	linearisierte Plasmid-DNA	0,1 µg
	Insert	1 µg
	T4-Ligase-Puffer (10x)	2 µl
	T4 Ligase (1 U/µl)	1 µl
	aqua dest.	ad 20 µl

Für eine Ligation von zwei PCR-Fragmenten wurden beide Fragmente im gleichen Verhältnis zueinander eingesetzt:

Fragment 1	X µg
Fragment 2	X µg
T4 Ligase-Puffer (10x)	2 µl
T4 Ligase (1 U/µl)	1 µl
aqua dest.	ad 20 µl

Die Ligationsansätze wurden stets über Nacht bei 16° C im Wasserbad inkubiert. Ansätze aus Plasmid und Insert wurden anschließend für eine Transformation (4.8.2) in Bakterien eingesetzt, Ligationsansätze aus zwei Fragmenten gereinigt und reamplifiziert.

4.7.13 Elektrophoretische Auftrennung von DNA in Agarose-Gelen

DNA-Fragmente wurden in der horizontalen Gelelektrophorese aufgrund ihrer negativen Ladung in einem Agarose-Gel der Größe nach aufgetrennt. Die Konzentration des Gels wurde in Abhängigkeit der Größe der aufzutrennenden Fragmente gewählt: 0,5 %-ige Gele eignen sich für große Fragmente, 1,5 %-ige Gele eignen sich besser für kleinere Fragmente. In dieser Arbeit wurden ausschließlich 1 %-ige Agarose-Gele verwendet.

Für die Herstellung eines 1 %-igen Agarose-Gels wurden 1,5 g Agarose in 150 ml 1x TBE-Puffer in der Mikrowelle aufgeköcht, bis sich die Agarose vollständig gelöst hatte. Nach Abkühlen der Gellösung auf ca. 50° C wurden 15 µl Ethidiumbromidlösung (SS 10 mg/ml) zugegeben, um die DNA später im Gel sichtbar zu machen. Ethidiumbromid lagert sich durch die Interkalation zwischen die Basen der Nukleinsäuren in die DNA ein und fluoresziert, wenn es mit UV-Licht angestrahlt wird.

Das noch flüssige Gel wurde möglichst luftblasenfrei in eine entsprechende Kammer mit eingesteckten Kunststoffkämme gegossen. Nach Erstarren des Gels wurde die Kammer in die Apparatur eingelegt und das Gel mit 1x TBE-Puffer überschichtet. Die Kämme wurden vorsichtig entfernt und die DNA-Proben mit 1/10 des Endvolumens an Stopp-Puffer aufgetragen. Der Gellauf erfolgte je

nach Kammergröße bei 100-150 V. Nach Ende des Laufes wurde das Gel unter UV-Licht (300 nm) analysiert und fotografiert.

4.8 Transformation

4.8.1 Herstellung elektrokompetenter *E. coli*

Eine *E. coli* Übernachtskultur wurde 1:50 in TY-Medium verdünnt und bei 37° C bis 120 Klett auf dem Schüttelinkubator gezogen. Die Kultur wurde auf Eis abgekühlt und abzentrifugiert (4800 rpm, 10 min, 4° C). Das Pellet wurde zweimal mit 50 ml kaltem Glyzerin (10 % in aqua dest.) gewaschen und schließlich in 1/100 Volumen 10 %-igem Glyzerin aufgenommen. Die Lagerung der elektrokompetenten Zellen erfolgte in 100 µl Aliquots bei -80° C.

4.8.2 Elektroporation in *E. coli*

100 µl elektrokompetente *E. coli* wurden langsam auf Eis aufgetaut und mit 5 µl DNA-Lösung in einer vorgekühlten Elektroporationsküvette möglichst luftblasenfrei vermischt. Nach einer einminütigen Inkubationszeit auf Eis erfolgte die Elektroporation bei 100 Ohm, 25 µF und 2,25 kV für 4 - 6 ms. Unmittelbar nach dem Impuls wurde 1 ml vorgewärmtes BHI-Medium zu den geschockten Bakterien gegeben, der Ansatz in ein 1,5 ml Gefäß überführt und je nach Antibiotikaresistenz des Vektors (Amp 45 min; Em 1–6 h) bei 30° C bzw. 37° C inkubiert. Von diesem Ansatz wurden 100 µl auf Selektionsplatten (100 µg/ml Amp. bzw. 600 µg/ml Em) ausplattiert und 1-3 Tage bei 37° C inkubiert. Der restliche Ansatz wurde abzentrifugiert, der Überstand bis auf 100 µl abgenommen und verworfen. Das Pellet wurde im restlichen Kulturmedium resuspendiert und ebenfalls ausplattiert.

4.8.3 Herstellung elektrokompetenter Listerien

<u>3,5x SMHEM-Puffer</u>	Saccharose	65,2 g
	MgCl ₂ (1 M)	0,7 ml
	HEPES (250 mM)	5,6 ml
	aqua dest.	ad 200 ml

Eine Listerien Übernachtskultur wurde 1:20 in BHI verdünnt und bei 37° C bis 90 Klett inkubiert. Nach der Zugabe von 5 µg/ml Penicillin G wurden die Zellen bis 120 Klett weiter inkubiert. Die Kultur wurde abzentrifugiert und das Pellet zweimal mit 1/10 Volumen 3,5x SMHEM Puffer gewaschen, bevor es in 1/100 Volumen 3,5x SMHEM Puffer resuspendiert und in 100 µl Aliquots eingefroren wurde. Die Lagerung erfolgte bei -80° C.

4.8.4 Elektroporation in Listerien

Die Elektroporation in Listerien erfolgte analog zur Transformation in *E. coli* (s. 4.8.2), jedoch wurden die transformierten Listerien 5–6 h zur Expression des *Em*-Resistenzgens geschüttelt und auf 5 µg/ml Em-Platten ausplattiert.

4.9 Konstruktion von *Listeria monocytogenes* EGD Δ TCS RR-Deletionsmutanten

Mit Hilfe der Deletionsmutagenese wurden Mutanten von *L. monocytogenes* EGD hergestellt, bei denen die Gene für die individuellen Response Regulatoren in frame deletiert wurden, so dass das Leseraster für die Transkription stromabwärts liegender Gene erhalten blieb. Zunächst wurden zwei definierte Bereiche stromaufwärts ("upstream") und stromabwärts ("downstream") des zu deletierenden Gens ausgesucht, sie werden im Folgenden als N bzw. C bezeichnet. Mittels der Primer N1, N2, C1 und C2, chromosomaler DNA von *L. monocytogenes* EGD als Template und der *Pfu*-Polymerase wurden N und C mittels PCR amplifiziert und anschließend gereinigt. Über die PCR wurden am 5'-Ende von N eine *Bam*HI und am 3'-Ende eine *Kpn*I-Schnittstelle eingefügt, am 5'-Ende von C ebenfalls eine *Kpn*I-Schnittstelle und am 3'-Ende eine für die Endonuklease *Eco*RI. In Abbildung 14 ist die Konstruktion der Deletionsmutanten schematisch grob dargestellt. 14 A zeigt die Lage von N und C auf dem Chromosom und im Mutageneseplasmid vor dem ersten homologen Rekombinationsschritt, 14 B beschreibt die Anordnung der Fragmente nach der Integration des Plasmids über den N-terminalen Bereich des Gens. In Abb. 14 C ist die erfolgreiche Deletion des Gens über die 2. homologe Rekombination über den C-terminalen Bereich dargestellt.

N und C wurden mit *Kpn*I verdaut, erneut gereinigt und durch die T4-DNA-Ligase miteinander ligiert. Das dadurch entstandene Ligationsprodukt "NC" wurde gefällt und als Template für eine weitere PCR mit den Primern N1 und C2 amplifiziert. Nach erneuter Reinigung wurden "NC" und das Mutageneseplasmid pLSV1 nacheinander mit *Eco*RI und *Bam*HI geschnitten, gereinigt und miteinander ligiert. Dieser Ligationsansatz wurde mittels Elektroporation in *E. coli* DH5 α transformiert, welche nach erfolgter Zwischeninkubation auf Em-Selektionsplatten (600 μ g/ml) ausplattiert und 1-3 Tage bei 37° C inkubiert wurden. Wurden mit der eben beschriebenen Klonierungsmethode auf den Em-Platten keine Klone erhalten, wurde das NC-Fragment zunächst in das Shuttleplasmid pUC18 zwischenkloniert und anschließend in pLSV1 subkloniert. In einer PCR mit den Primern N1 und C2 wurden pLSV1-NC positive Klone ermittelt und diese über Nacht in Em-Selektionsmedium kultiviert. pLSV1-NC wurde anschließend mittels Mini- oder Midi-Prep isoliert, in *Listeria monocytogenes* EGD transformiert und bei 30° C auf BHI-Agarplatten mit 5 μ g/ml Erythromycin inkubiert. Von Übernachtskulturen gewachsener Klone wurden Verdünnungsreihen auf Em-Platten ausplattiert und 2-4 Tage bei 43° C inkubiert. Unter diesen Bedingungen sollten nur solche Klone wachsen, bei denen das Deletionsplasmid entweder über das N-Fragment oder das C-Fragment genomisch homolog integriert wurde, da pLSV1-NC als solches bei 43° C nicht repliziert wird. Diese Integranten enthielten nun das gesamte Plasmid inklusive der Erythromycin-Resistenz vor oder nach dem genomischen Lokus des entsprechenden Gens, wodurch der Resistenzmarker exprimiert werden konnte. Positive Klone wurden nun bei 30° C in BHI-Medium ohne Antibiotikum passagiert und zwischendurch durch Ausplattieren auf Platten mit und ohne Em auf den Verlust ihrer Em-Resistenz hin überprüft. Während dieser Subkultivierung sollten durch einen zweiten homologen Rekombinationsschritt die Bakterien das Plasmid wieder ausschneiden (Abb. 14 C). Je nachdem wie das Plasmid wieder herausgeschnitten wird, wäre die gewünschte Region mit aus dem Chromosom entfernt, oder der wildtypische Genlokus wieder hergestellt.

Em-sensitive Klone wurden durch die Kombination geeigneter Primer in einer PCR daraufhin untersucht, über welches Fragment die Exzision des Plasmids stattgefunden hat (Abb. 14, Primer 1 und 4). Im Falle der erwünschten Deletion entsteht ein Fragment, welches kleiner ist als das Wildtyp-Fragment. Positive Klone wurden anschließend sequenziert um zu bestätigen, dass die Deletion sequenzspezifisch erfolgt war. Klone, bei denen die Deletion erfolgreich war, wurden wie unter 4.1.1 beschrieben herangezogen und anschließend bei -80°C eingelagert.

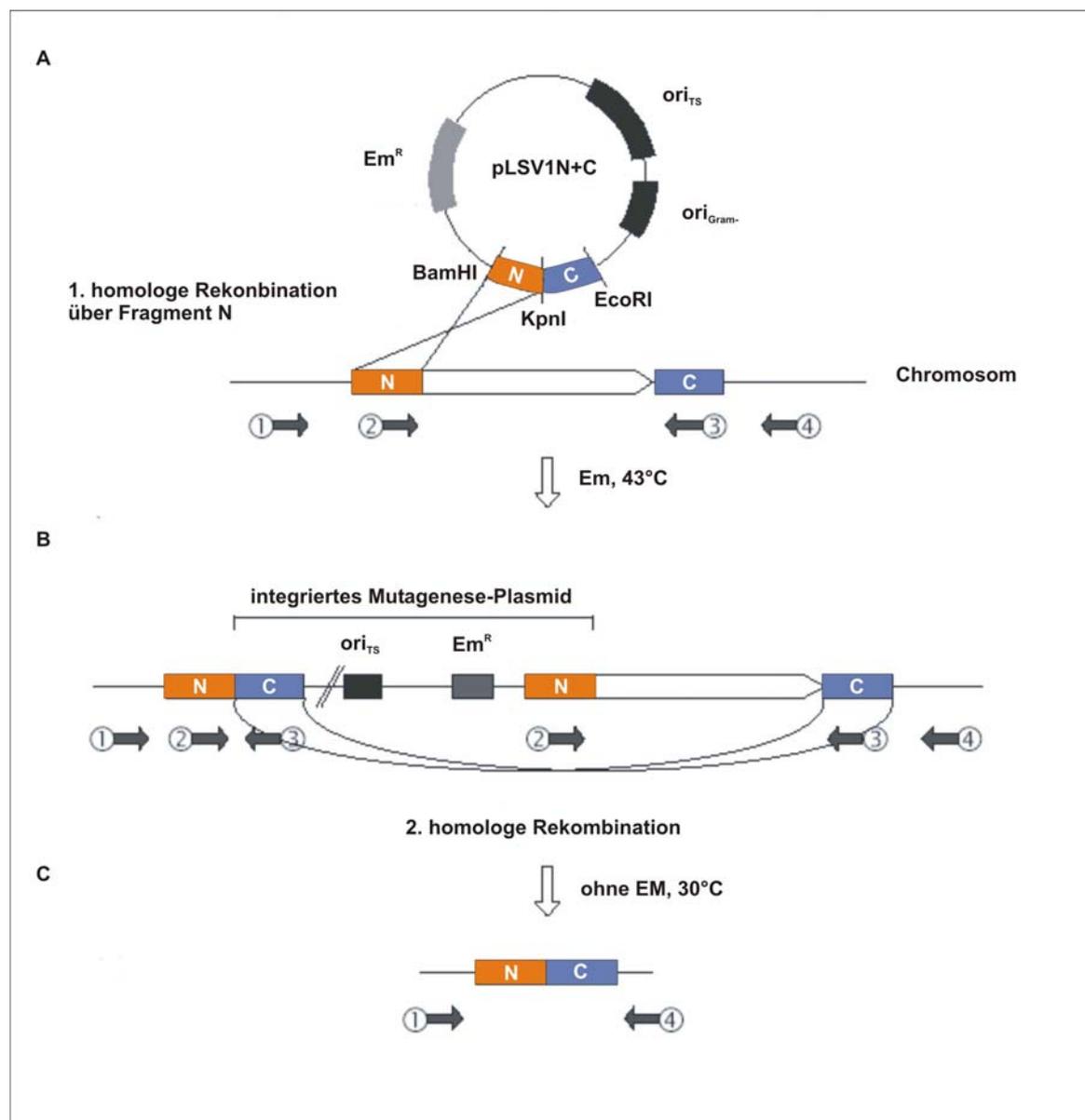


Abb. 14: Schematische Darstellung einer Deletionsmutagenese. Die nummerierten Pfeile bezeichnen die Lage der Primer 1 bis 4, wobei 2 den Primer N1 und 3 den Primer C2 bezeichnen. Die Primer N2 und C1 sind in dieser Abbildung nicht dargestellt. Primer 1 und 4 bezeichnen die außerhalb des homologen Bereiches liegenden Primer, die zur Bestätigung der Deletion verwendet wurden. **A:** Anordnung von N und C auf dem Chromosom des Ausgangsstammes und des Mutageneseplasmids pLSV1-NC. **B:** Anordnung der Fragmente nach der Integration des Plasmids durch homologe Rekombination über Fragment N. **C:** Nach der 2. homologen Rekombination über Fragment C ist die gewünschte Gen-Region aus dem Chromosom entfernt.

4.10 Proteinanalytische Methoden

4.10.1 Isolierung bakterieller Proteine für SDS-PAGE

Listerien wurden im entsprechenden Medium bis zu einer $OD_{600nm} = 1,0$ kultiviert und bei $4^{\circ} C$ abzentrifugiert. Zur Gewinnung sezernierter Proteine wurde der Kulturüberstand abgenommen und das Pellet zur Isolierung zellulärer Proteine getrennt verarbeitet. Die Überstandsproteine wurden durch Zugabe von TCA in einer Endkonzentration von 12 % für eine Stunde auf Eis gefällt und anschließend durch Zentrifugation pelletiert. Der Überstand wurde verworfen, die pelletierten Proteine in kaltem Aceton resuspendiert und erneut abzentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und das Pellet auf Eis ein paar Minuten getrocknet. Anschließend wurde es in 1/100 Überstandsvolumen 4x Laemmli-Puffer aufgenommen und für 5 Minuten bei $110^{\circ} C$ im Heizblock gekocht. Die Lagerung erfolgte bei $-20^{\circ} C$.

Zur Präparation zellulärer Proteine wurde das Bakterienpellet nach dem ersten Zentrifugationsschritt einmal in kaltem 1xPBS gewaschen und erneut abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 1/10 Volumen 4x Laemmli-Puffer resuspendiert und 20 min bei $110^{\circ} C$ im Heizblock gekocht. Bis zur Elektrophorese wurden die Proteine ebenfalls bei $-20^{\circ} C$ gelagert.

4.10.2 Bestimmung der Proteinkonzentration mit dem "Bio-Rad Assay"

Die Konzentration einer Proteinlösung wurde mit dem "Protein-Assay" der Fa. Bio-Rad nach Angaben des Herstellers bestimmt. Für eine Eichgerade wurden 1 μl , 2 μl , 4 μl , 6 μl , 8 μl und 10 μl einer BSA-Lösung (1 $\mu g/\mu l$) mit aqua dest. auf ein Endvolumen von 800 μl gebracht und jeweils 200 μl Farbstoff-Konzentrat zugegeben. Nach einer einheitlichen Inkubationszeit wurde die optische Dichte bei 595 nm gegen einen Nullwert gemessen und eine Eichgerade erstellt. Die zu bestimmende Proteinlösung wurde zunächst zentrifugiert, um den Proteinextrakt von nicht löslichen bakteriellen Bestandteilen abzutrennen. Vom Überstand wurden 1 μl , 2 μl und 1 μl (1:10) analog mit aqua dest. auf ein Gesamtvolumen von 800 μl gebracht, mit 200 μl der Färbelösung versetzt und die optische Dichte nach der gleichen Inkubationszeit photometrisch bestimmt. Die Konzentration der Proteinprobe wurde anschließend mittels der BSA-Eichgerade bestimmt.

4.10.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese SDS-PAGE

Die SDS-PAGE ist eine Elektrophorese-Methode, bei der Polypeptide nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden. Sie wird in einem diskontinuierlichen Polyacrylamid-Gel (PAA-Gel) durchgeführt, in dem das stark anionische Detergens Natriumdodecylsulfat (SDS) enthalten ist. SDS denaturiert Proteine, indem es sich mit seinem hydrophoben Ende gleichmäßig um das Polypeptidgerüst wickelt (etwa 1 Molekül SDS pro 2 Aminosäuren). Dadurch werden Wasserstoff-Brücken aufgebrochen und hydrophobe Wechselwirkungen verhindert was zur Denaturierung der Proteine führt. Aufgrund der starken negativen Ladung der SDS-Moleküle kann die Eigenladung der Aminosäurereste der Proteine vernachlässigt werden. Die Auftrennung der Polypeptide erfolgt dadurch nach ihrem Molekulargewicht.

Zur Herstellung von PAA-Gelen wurden zwei gereinigte Glasplatten mit 1 mm dicken Abstandshaltern (Spacer) nach den Angaben des Herstellers zusammengebaut und im Gießstand fixiert. Sofort nach der Zugabe von APS und TEMED wurde das flüssige Trenngel zwischen die Platten gegossen und mit aqua dest. überschichtet, um eine glatte Oberfläche zu erhalten. Nach vollständiger Polymerisation wurde das Wasser abgegossen, das Sammelgel bis zum oberen Plattenrand eingefüllt und ein Kamm eingesteckt, der die gleiche Stärke hatte wie die Spacer. Nach erfolgter Polymerisierung wurde das Gel in die Laufapparatur eingespannt, diese mit 1x SDS-Laufpuffer gefüllt und der Kamm vorsichtig entfernt. Die Taschen wurden mit 1x SDS ausgespült, mit einem Molekulargewichtsstandard sowie den Proben beladen und die Proteine bei 90 V aufgetrennt. Kurz bevor die Bromphenolblau-Front des Stopp-Puffers den unteren Rand der Glasplatten erreicht hatte, wurden bei ausgeschalteter Spannungsquelle je 2 µl Methylgrünlösung in die Taschen beladener Spuren pipettiert. Sobald diese ca. 2 mm ins Trenngel hineingelaufen waren, wurde die Elektrophorese beendet, das Gel abgebaut und das Sammelgel abgetrennt. Das Trenngel wurde entweder mit Silbernitrat oder mit kolloidalem Coomassie angefärbt oder einem Westernblot unterzogen.

4.10.4 Westernblot

Bei einem Westernblot werden Proteine, die man zuvor über eine SDS-PAGE aufgetrennt hat, dauerhaft auf einer Membran fixiert und anschließend mit Hilfe von enzymkonjugierten Antikörpern, die gegen spezifische Antigene gerichtet sind, untersucht.

Vorbereitet wurden 15 Lagen Whatman-Filterpapier und eine Nitrocellulose-Membran (Hybond-C), die auf die Größe des Gels zugeschnitten waren. Die Graphit-Elektroden der Blotkammer wurden mit aqua dest. gründlich abgespült. Nacheinander wurden folgende Lagen möglichst luftblasenfrei auf die feuchte Anodenplatte aufgelegt:

- 6 mit Anodenpuffer I getränkte Lagen Whatman-Papier
- 3 mit Anodenpuffer II getränkte Lagen Whatman-Papier
- mit aqua dest. befeuchtete Nitrocellulose-Membran
- das PAA-Gel
- 6 mit Kathodenpuffer getränkte Lagen Whatman-Papier

Die feuchte Kathodenplatte wurde aufgelegt, gleichmäßig beschwert und der Proteintransfer für 1 h bei 100 mA durchgeführt. Anschließend wurde die Blotkammer auseinandergelassen und zur späteren Orientierung eine Ecke der Nitrocellulose-Membran abgeschnitten.

Ein erfolgreicher Transfer der Proteine auf die Membran wurde durch die Anfärbung dieser mit Ponceau S überprüft. Anschließend wurde sie für 1 h bei RT in 1x TBS/2 % Magermilchpulver abgesättigt. Es folgten zwei Waschschrte mit 1x TBS. Anschließend wurde der erste Antikörper in 1x TBS/2 % BSA verdünnt, auf die Membran gegeben und diese über Nacht bei 4° C geschwenkt. Nach 3 je zehnmütigen Waschschrten mit 1x TBS/2 % BSA wurde die Membran eine Stunde mit einem enzymkonjugierten Sekundärantikörper inkubiert und erneut gewaschen, bevor sie entweder mit dem "ECL™ Western Blotting detection reagent" nach dem Protokoll des Herstellers oder mit Chloronaphthol entwickelt wurde.

Für die ECL-Entwicklung wurde die Membran mit der zu entwickelnden Seite nach Oben auf eine Klarsicht-Folie gelegt. Die vom Hersteller bereitgestellten Entwicklungs-Reagentien I und II wurden im Verhältnis 1:1 gemischt und gleichmäßig auf der Membran verteilt. Die Lösung wurde abgenommen und eine weitere Folie luftblasenfrei aufgelegt. Die Membran wurde sodann in eine Röntgenfilmentwicklungskassette gelegt. Alle weiteren Schritte wurden in einer Rotlichtkammer durchgeführt. Röntgenfilme wurden für verschiedene Zeitintervalle in der Kassette auf die Membran aufgelegt. Nach unterschiedlichen Belichtungszeiten wurden die Filme entnommen und im Röntgenfilmentwickler entwickelt.

Bei der Chloronaphtolentwicklung wurde die Membran nach dem letzten Waschschrift in einer Mischung aus Chloronaphtol, Wasserstoffperoxid und 1x TBS entwickelt, bis eine blaue Farbreaktion zu beobachten war. Die Entwicklung wurde mit aqua dest. abgestoppt.

4.10.5 Färbung eines PAA-Gels mit kolloidalem Coomassie

PAA-Gele wurden nach der Elektrophorese für mindestens 1-2 h in 12 % TCA (v/v) auf dem Taumler fixiert und anschließend 2-3 Tage, wiederum unter leichtem Schwenken, in der Coomassie Gebrauchslösung angefärbt. Die Entfärbung der Gele mit aqua dest. erfolgte bei RT auf dem Taumler. Das aqua dest. wurde so lange und so oft gewechselt, bis es sich nicht mehr blau verfärbte. Die Gele wurden entweder eingescanned oder für eine längere Lagerung eingeschweißt.

4.10.6 Färbung eines PAA-Gels mit Silbernitrat

Unmittelbar nach Beendigung der Elektrophorese wurde das PAA-Gel für mindestens 1 Stunde oder über Nacht unter leichtem Schwenken fixiert. Anschließend wurden die Gele zweimal für je 30 min mit 30 %-igem EtOH p. a. gewässert. Es folgte eine einminütige Inkubation in der Oxidierlösung. Das in dieser Lösung enthaltene Natriumthiosulfat sollte eine spätere unspezifische Anfärbung des Gel-Hintergrundes vermeiden. Zur Entfernung der Oxidierlösung wurde das Gel dreimal für je eine Minute mit aqua dest. gewaschen. Durch eine einstündige Inkubation mit Silbernitrat wurde das Gel mit Silberionen angereichert und anschließend zweimal für 30 sec gewaschen. Zur eigentlichen Anfärbung durch die Reduktion der Silberionen im Gel wurde mit der Entwicklerlösung inkubiert und die Reaktion mit EDTA-Lösung abgestoppt, sobald sich die Entwicklerlösung leicht braun verfärbte und deutliche Proteinbanden bzw. Proteinspots auf dem Gel zu erkennen waren. Um eine Vergleichbarkeit von parallel angefertigten Gelen eines Experimentes zu erhalten, war es äußerst wichtig, dass die Inkubationszeiten der Färbung und Entwicklung für alle Gele gleich lang waren. Vor dem Einscannen wurden die Gele erneut mit aqua dest. gewässert.

4.11 Zweidimensionale Gelelektrophorese 2DGE

Mittels der 2D-Gelelektrophoresetechnik (2DGE) können komplexe Proteingemische aufgetrennt und analysiert werden. Diese Methode sortiert Proteine in zwei Schritten: In der ersten Dimension werden Proteine durch eine isoelektrische Fokussierung (IEF) nach ihrem isoelektrischen Punkt (i. P.)

aufgetrennt, wohingegen in der zweiten Dimension die Proteine durch eine normale SDS-PAGE weiter nach ihrem molekularen Gewicht aufgetrennt werden. Somit entspricht jeder "Spot" auf einem 2D-Gel einem einzelnen Protein. Dieses kann aus dem Gel extrahiert und über eine massenspektrometrische Analyse (z. B. MALDI-TOF) identifiziert werden.

4.11.1 Präparation zellulärer Proteine für die 2DGE

Eine bakterielle Übernachtskultur wurde 1:20 verdünnt und bis zu einer $OD_{600nm} = 1,0$ kultiviert. Durch die Zugabe von Chloramphenicol (20 $\mu\text{l/ml}$) und weiteren 5 Minuten Inkubation unter Schütteln wurde die Proteinexpression der Bakterien gestoppt. Die Kultur wurde abzentrifugiert, der Überstand zur Aufarbeitung der sezernierten Proteine abgenommen und getrennt weiterverarbeitet (s. 4.11.2). Alle weiteren Arbeitsschritte erfolgten auf Eis. Das Bakterienpellet wurde zweimal mit 1x PBS mit 20 $\mu\text{g/ml}$ Cm gewaschen und in 800 μl Trispuffer aufgenommen. Nach der Beifügung von 20 μl Protease-Inhibitoren-Mix wurden die Bakterien auf eine Lysing Matrix B aufgetragen und sechsmal für je 30 sec auf Stufe 6,5 im FastPrep FP 120 mechanisch zerkleinert. Zwischen den einzelnen Durchgängen wurden die Ansätze jeweils für eine Minute auf Eis inkubiert. Auf die Zugabe von 5 μl DNase/RNase-Mix folgte eine 10-minütige Inkubation auf Eis, während derer die Nukleinsäuren abgebaut wurden. Anschließend wurden die Zelltrümmer für 15 min abzentrifugiert. Der Überstand des Aufschlusses wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, in das 340 mg Harnstoff und 122 mg Thioharnstoff vorgelegt waren. Der Ansatz wurde so lange unter leichtem Schwenken bei RT inkubiert, bis sich die beiden Feststoffe komplett gelöst hatten. Die Proteine wurden mit 12 % TCA (v/v) 1 h auf Eis gefällt und 20 min bei 4° C und 14.000 x g pelletiert. Das Pellet wurde dreimal mit eiskaltem Aceton gewaschen und anschließend für 5 min mit geöffnetem Deckel bei 30° C getrocknet. Die Proteine wurden in ca. 100 μl Harnstoffpuffer + 4 % CHAPS (v/v) aufgenommen und über Nacht zur vollständigen Lösung bei RT auf dem Taumler inkubiert. Die Aufbewahrung der Proteine erfolgte bei -20° C oder bei längerer Lagerung bei -80° C.

4.11.2 Präparation von Überstandsproteinen für die 2DGE

Um Überstandsproteine zu isolieren, wurde zunächst wie oben beschrieben eine Übernachtskultur verdünnt und auf dem Schüttler inkubiert. Bei einer $OD_{600nm} = 1,0$ wurden die Bakterien mit Chloramphenicol (20 $\mu\text{g/ml}$) versetzt und weitere 5 min. inkubiert. Der nach der Zentrifugation erhaltene Überstand wurde zur vollständigen Entfernung von Bakterien filtriert (Porengröße des Filters 0,22 μm) und in einem 50 ml Röhrchen aufgefangen. 1 Stunde nach der Zugabe von 12 % kalter TCA Lösung (v/v) wurden die Proteine durch einstündiges Zentrifugieren bei 4° C pelletiert und hinterher dreimal mit eiskaltem Aceton gewaschen. Vor dem letzten Waschschrift wurde die Suspension in 2 ml-Gefäße überführt und anschließend für 5-8 min mit offenem Deckel bei 30° C getrocknet. Die Proteine wurden in Harnstoffpuffer mit 10 % CHAPS (v/v) aufgenommen, kurz zentrifugiert und über Nacht bei 4° C zum vollständigen Lösen inkubiert. Die Proteine wurden, wie auch die Gesamtzellproteine, bei -20° C bzw. -80° C gelagert.

4.11.3 Auftrennung der Proteine in der ersten Dimension

In der IEF wandern Proteine in einem immobilisierten pH-Gradienten bis zu ihrem isoelektrischen Punkt. Dieser entspricht dem pH-Wert, bei dem die Nettoladung des Proteins gleich Null ist.

Die IEF erfolgte nach der ETTAN IPGphor "Cup loading Manifold" Methode mit Immobiline™ DryStrips der Fa. Amersham Biosciences in der Multiphor II Systems-Apparatur. Die verwendeten Immobiline™ Strips besitzen einen immobilisierten pH-Gradienten in ihrem homogenen Polyacrylamid-Gel. Dieses war auf einem Plastik-Streifen aufgebracht und wurde in dehydrierter Form geliefert. Vor Gebrauch wurden die IEF-Strips in Rehydrierungspuffer mit einem ihrem pH-Wert entsprechenden IPG-Puffer rehydriert. In dieser Arbeit wurden ausschließlich IEF-Strips von 18 cm Länge mit einem pH-Gradienten von 4-7 verwendet. Zunächst wurden die IEF-Strips in einer Quellkassette mit der Gelseite nach Unten auf 350 µl Rehydrierungspuffer möglichst luftblasenfrei aufgelegt, mit "Coverfluid" gegen Austrocknung überschichtet und über Nacht bei RT rehydriert. Am nächsten Tag wurden diese IEF-Strips mit der Gelseite nach Oben in der richtigen Orientierung auf das "Manifold ceramic Tray" aufgebracht und mit 108 ml Coverfluid überschichtet, damit während des Fokussierens keine Flüssigkeit verdunstet. Sodann wurden die Probenkammern, so genannte "Cups" ca. 1 cm vor Ende des Gels aufgesteckt und mit aqua dest. vorbenetzte Filterstücke (so genannte "Wicks", ca. 0,2 x 0,8 cm) auf den beiden Strip-Enden positioniert. Diese sollten während der IEF aus dem IEF-Strip austretende überschüssige Salze auffangen. Die beiden Elektroden wurden auf die Wicks aufgebracht und befestigt. Erst jetzt wurden die Proteine in die Cups pipettiert: Für Gele, die anschließend mit Silbernitrat angefärbt werden sollten, wurde 75 bzw. 150 µg Protein pro IEF-Strip aufgetragen. Für Gele, die mit kolloidalem Coomassie angefärbt werden sollten, wurde bis zu 1000 µg Protein aufgetragen.

Die Proteine wurden nach folgendem Protokoll für insgesamt 75.000 Vh bzw. im Falle der Coomassie-Gele 150.000 Vh fokussiert:

Programm-Modus	Voltstärke [V]	Dauer [h]	Volt-Stunden [kVh]
Step and Hold	300	3:00	0,9
Gradient	1000	6:00	3,9
Gradient	8000	3:00	13,5
Step and Hold	8000	1:10	9,7
Total		13:10	28,0

Bei 30.000 Vh wurden die Wicks gegen Neue ausgetauscht und anschließend alle 20.000 Vh gewechselt, um eine möglichst saubere Auftrennung zu erreichen. Nach der Fokussierung wurden die mit Proteinen beladenen IEF-Strips in Alufolie eingewickelt, auf Trockeneis schockgefroren und bis zur Auftrennung in der zweiten Dimension bei -20° C gelagert.

4.11.4 Herstellung der PAA-Gele für die 2DGE

Mit Hilfe des "Hofer DALT Gel Casters" war es möglich, 23 Gele auf einmal zu gießen. Trennfolien und Glaskassetten wurden gründlich mit 70 %-igem EtOH gereinigt, abwechselnd in den Gießstand eingebaut und fixiert. Ein Füllrohr mit Trichter wurde in die dafür vorgesehene Vorrichtung gesteckt und die es umgebende Wanne mit "displacing solution" gefüllt. Je nach Anzahl der zu gießenden Gele wurde die entsprechende Menge an Gellösung angesetzt und möglichst luftblasenfrei über den Trichter in das Füllrohr gegossen. Anschließend ließ man die "displacing solution" nachlaufen, durch welche die Gellösung zwischen die Platten gedrückt wurde, und überschichtete jedes einzelne Gel mit 2 ml aqua dest. um eine glatte Geloberfläche zu erhalten. Nach erfolgter Polymerisation wurde der Gel Caster abgebaut, die Gele einzeln mit aqua dest. abgespült, in Klarsichtfolie eingeschlagen und bei 4° C in "Gel storage solution" gelagert.

4.11.5 Auftrennung der Proteine in der zweiten Dimension

Unmittelbar vor dem Beladen der PAA-Gele wurden die gefrorenen und beladenen IPG-Strips aufgetaut und 15 min in Äquilibrierungspuffer I, anschließend 15 min in Äquilibrierungspuffer II inkubiert. In der Zwischenzeit wurde der Elektrophorese Tank ("DALT") mit 1x SDS Laufpuffer befüllt und dieser auf 15° C erwärmt. Die äquilibrierten Strips wurden zügig und luftblasenfrei mit der Gelseite nach Vorne auf die Oberkante eines PAA-Gels aufgelegt, welches vorher mit 1x SDS-Laufpuffer überschichtet worden war. Dieser Puffer wurde durch Kippen des Gels abgegossen, der Strip gegebenenfalls mit einem Mini-Spatel wieder mittig auf dem Gel positioniert und anschließend mit flüssiger, 0,1 %-iger Agaroselösung möglichst luftblasenfrei überschichtet. Die Gele wurden nach dem Erstarren der Agarose in den DALT überführt und die Proteine nach ihrem Molekulargewicht über Nacht bei 90 - 120 V aufgetrennt.

4.12 **Analyse des Transkriptoms mittels Microarray-Technologie**

Die Microarray-Technik ist eine Methode, mit der unter anderem Transkriptomanalysen durchgeführt werden, um Genaktivitäten zwischen einem Referenz- und einem Test-Stamm zu vergleichen. Hierzu wird zunächst RNA aus beiden Stämmen isoliert und während der Reversen Transkription mit verschiedenen Fluorochromen markiert. Durch Hybridisierung mit auf einem Glas-Objektträger in einem geordneten Raster fixierten Oligonukleotiden wird die relative Menge der verschiedenen RNA-Moleküle in den zu vergleichenden Stämmen gemessen

Bei den in dieser Arbeit durchgeführten Arrays stammten die Epoxybeschichteten Glas-Objektträger von der Firma Quantifoil und wurden von T. Chakraborty (Institut für medizinische Mikrobiologie, Universität Gießen) vorbehandelt. Für jedes Gen von *L. monocytogenes* EGD sind synthetische 70mer Oligonukleotide auf dem Objektträger abgebildet. Jedes Experiment wurde in einem doppelten Ansatz durchgeführt und mindestens viermal wiederholt um die Ergebnisse auf ihre Reproduzierbarkeit zu überprüfen. Es wurde in jedem Array das Genexpressionsmuster von der Δ TCS RR-Mutante Δ degU mit dem von *L. monocytogenes* EGD verglichen. Die RNA aus *L.*

monocytogenes EGD wird im Folgenden als "Referenz", die aus dem Deletionsstamm als "Test" bezeichnet.

4.12.1 Herstellung der Sonden, RT-PCR und Prähybridisierung der Objektträger

Die Isolierung der bakteriellen RNA erfolgte mit dem RNeasy Mini Kit von QIAgen, die dafür notwendigen Puffer, Lösungen und Säulchen waren im Kit enthalten. Es wurden pro Stamm 30 µg RNA in einem Volumen von 15 µl eingesetzt. RNA-Proben, deren Konzentration zu gering war um innerhalb des gewünschten Volumens zu bleiben, wurden in der Speedvac reduziert und so auf das gewünschte Volumen eingeeengt.

Es wurden jeweils 30 µg RNA der Kontrolle und des Test-Stammes mit 9 µg "Random Primer" in RNase-freie Reaktionsgefäße pipettiert und mit DEPC-Wasser auf 18 µl aufgefüllt. Beide Ansätze wurden für 5 min bei 70° C im Heizblock inkubiert. Während der darauf folgenden 10-minütigen Inkubation auf Eis wurde der Mastermix wie folgt angesetzt, wobei die angegebenen Mengen jeweils für einen Ansatz galten:

Ribonuklease-Inhibitor (RNase out)	1 µl
dATP (20 mM)	1 µl
dGTP (20 mM)	1 µl
dTTP (20 mM)	1 µl
dCTP (10 mM)	0,8 µl
DTT (100 mM)	0,4 µl
First strand buffer (5x)	8 µl
Reverse Transkriptase	1 µl
DEPC-H ₂ O	<u>5,8 µl</u>
	20 µl

Es wurde pro RNA-Ansatz 20 µl Mastermix und 2 µl Fluoreszenzfarbstoff zugegeben. Die Referenz wurde mit CytoDye3 (rot, Fa. Amersham), der Teststamm mit CytoDye5 (blau, Fa. Amersham) markiert. Die Ansätze wurden 10 min bei RT inkubiert, die anschließende cDNA Synthese erfolgte für zwei Stunden bei 42° C im Heizblock. Zur Zerstörung des Ribonuklease Inhibitors wurden beide Ansätze für 15 min bei 70° C erwärmt und kurz abzentrifugiert. Nach der Zugabe von je 2 µl RNase (Fa. Roche, DNase-free) erfolgte eine 45-minütige Inkubation bei 37° C, bevor die Ansätze mit dem QIAgen PCR Purification Kit gereinigt wurden. Die beiden leicht farbigen Lysate wurden vereint und in der Speedvac bei 45° C auf 30 µl reduziert. Noch während die vereinte cDNA in der Speedvac reduziert wurde, wurde mit der Prähybridisierung der Glas-Objektträger begonnen. Dazu wurden diese nach folgendem Schema behandelt:

- 1 x 5 min in Spüllösung I bei RT,
- 2 x 2 min in Spüllösung II bei RT,
- 1 x 10 min in Spüllösung III bei RT,
- 1 x 1 min in aqua dest. bei RT,
- 1 x 15 min in 1 x QMT "blocking solution" bei 50°C
- 1 x 1 min in aqua dest. bei RT

Nach dem letzten Waschschrift wurden die Objektträger durch einen dreiminütigen Zentrifugationsschritt getrocknet.

4.12.2 Hybridisierung der Proben mit dem Objektträger

Die Hybridisierungsreaktion des vereinten cDNA-Ansatzes mit dem Objektträger erfolgte über Nacht. Die Probe wurde mit 6 µl 20x SSC und 4 µl 1 %-igem SDS gemischt, für 1 min bei 95° C inkubiert und anschließend auf den prä-hybridisierten Objektträger pipettiert. Es wurde möglichst luftblasenfrei ein Deckglas aufgelegt. Der beladene Objektträger wurde in eine spezielle Halterung gespannt und über Nacht im Wasserbad bei 50° C inkubiert.

Am nächsten Tag wurde der Objektträger nach folgendem Schema gewaschen:

- 1 x 10 min in Waschpuffer I bei RT,
- 1 x 10 min in Waschpuffer II bei RT
- 1 x 10 min in Waschpuffer III bei RT

Zum Trocknen wurde der Objektträger für 3 Minuten zentrifugiert. Nach 3-5 Sekunden im "Dye-Saver" wurde der Objektträger im Dunklen getrocknet und anschließend in den Microarray-Scanner eingelesen und ausgewertet.

Für die Auswertung der Microarray-Daten wurden die Ausschluß-Grenzen bei 2 und 0,5 festgesetzt, d. h. bei einem Durchschnittswert ≥ 2 gilt das Gen als stärker, bei einem Wert < 0.5 als schwächer exprimiert. Jedes Experiment wurde in doppeltem Ansatz durchgeführt, mehrere Male wiederholt und die Daten dadurch auf ihre Reproduzierbarkeit überprüft. Als eine interne Kontrolle wurden hier die Gene des Virulenzgenclusters herangezogen.

5 Ergebnisse

5.1 Untersuchungen zur Rolle von Stathmin bei einer Infektion mit *L. monocytogenes*

5.1.1 Vorarbeiten

Im Rahmen meiner Diplomarbeit hatte ich versucht, den Einfluss einer Infektion von Säugerzellen mit *L. monocytogenes* EGD auf das Phosphorylierungsmuster von Stathmin nachzuweisen. Pfeuffer *et al.* hatten in einer früheren Arbeit gezeigt, dass Stathmin in infizierten Zellen in Abhängigkeit des bakteriellen Oberflächenproteins ActA an intrazelluläre Listerien rekrutiert wird und mit diesen interagiert (Pfeuffer *et al.*, 2000). Es wurde spekuliert, dass durch die Interaktion der Listerien mit dem die MT-Dynamik regulierenden Stathmin das zelluläre MT-Gerüst lokal depolymerisiert wird, um den Bakterien die intra- und interzelluläre Ausbreitung zu erleichtern. Da Stathmin jedoch nur im dephosphorylierten Zustand seine MT-depolymerisierende Aktivität ausüben kann müsste, um die Hypothese zu bestätigen, die Kolokalisation mit den Listerien den Phosphorylierungszustand des Proteins in sofern beeinflussen, dass gebundenes Stathmin nur in der aktiven, unphosphorylierten Form vorliegt. Mittels Westernblot-Analysen von zweidimensional aufgetrennten Proteinextrakten infizierter und nicht-infizierter Gewebekulturzellen wurde versucht, eine solche Beeinflussung aufzuzeigen. Unter den angewandten Kultur- und Infektionsbedingungen konnte jedoch in den Westernblots kein Unterschied im Phosphorylierungsmuster von Stathmin zwischen infizierten Zellen und nicht-infizierten Kontrollzellen nachgewiesen werden (Williams, 2001).

Die Westernblot-Analysen wurden mit Proteinextrakten durchgeführt, die jeweils aus asynchronen Zellpopulationen isoliert wurden. Um dennoch zu überprüfen, ob eine Infektion mit *L. monocytogenes* das Phosphorylierungsmuster von Stathmin beeinflusst, sollten daher Proteinextrakte synchronisierter infizierter und nicht-infizierter Zellpopulationen in der 2DGE aufgetrennt und im Westernblot analysiert werden.

5.1.2 Arretierung von Kulturzellen in verschiedenen Phasen des Zellzyklus

In Vorversuchen wurden die Bedingungen zur Arretierung von Zellen in verschiedenen Phasen des Zellzyklus optimiert und ein für die jeweils angewandte Methode geeigneter Zelltyp ermittelt.

Zunächst wurde versucht, Zellen durch Serumentzug in die G₀-Phase des Zellzyklus zu schicken, um sie dann synchron in die G₁-Phase zu entlassen. Hierzu wurden Caco-2 Epithelzellen und Cos-1 Fibroblasten in Vollmedium ausgesät. Kurz vor Erreichen eines konfluenten Monolayers wurde dieses Medium für 48 Stunden durch ein serumdefizientes Medium ersetzt. Nach einer weiteren Stunde in Vollmedium wurden die Zellen trypsinisiert und für eine anschließende Messung im Durchflußzytometer (FACS) mit Propidiumiodid angefärbt. Während die Cos-1 Zellen eine normale Zellmorphologie aufwiesen,

hatten sich die Caco-2 Zellen während der 48-stündigen Inkubation in Minimalmedium abgekugelt und zum Teil vom Kulturschalenboden abgelöst. Die FACS-Messung der Cos-1 Zellen ergab, dass zum Zeitpunkt der Färbung weniger als 60 % der Zellen in der G₁-Phase vorlagen, sich die Zellen also wie Zellen einer asynchronen Zellpopulation zeigen (vgl. Abb. 15 A und B). Demnach eignet sich die Methode des Serumentzuges nicht, um die verwendeten Zellen zu arretieren.

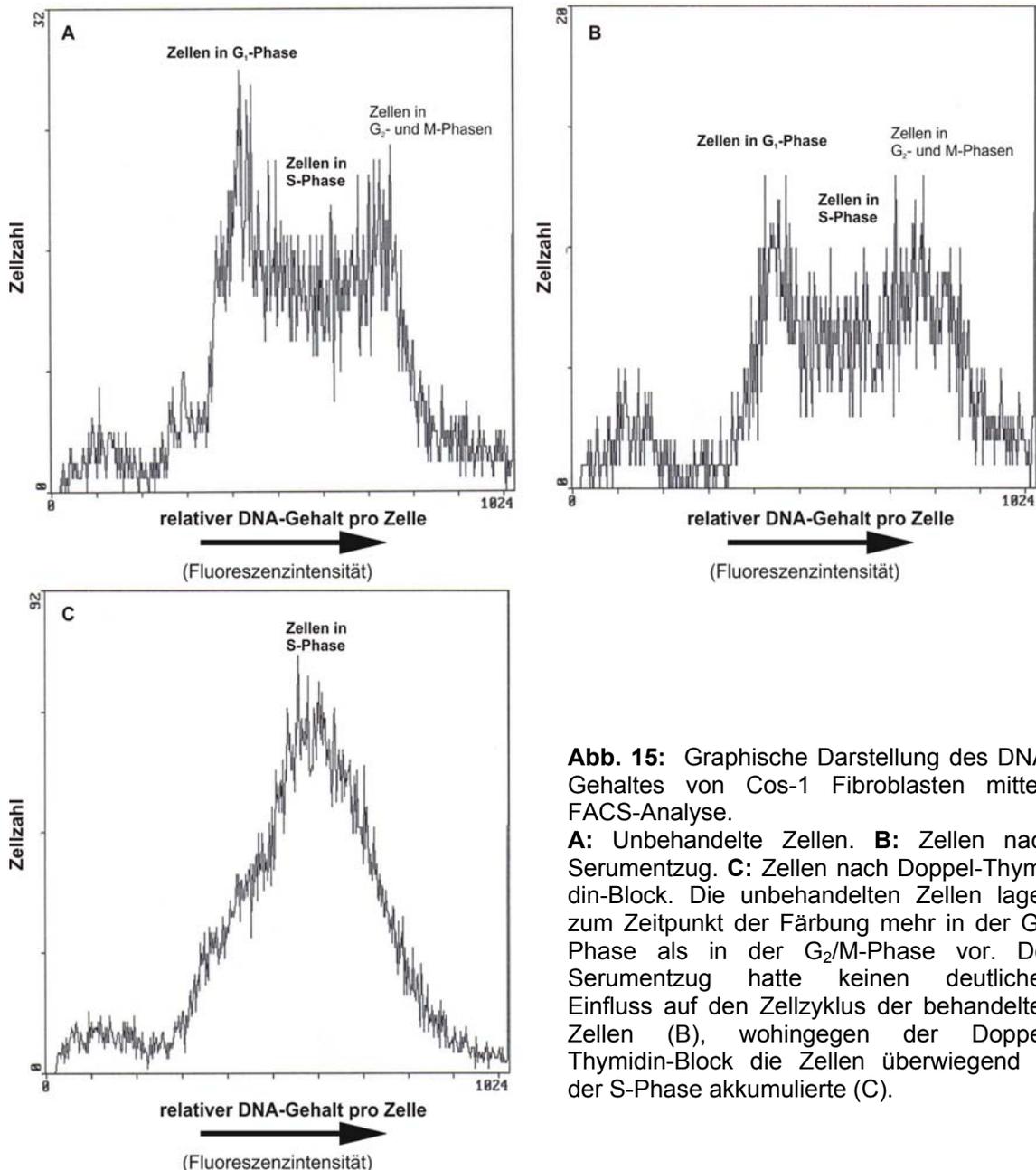


Abb. 15: Graphische Darstellung des DNA-Gehaltes von Cos-1 Fibroblasten mittels FACS-Analyse.

A: Unbehandelte Zellen. **B:** Zellen nach Serumentzug. **C:** Zellen nach Doppel-Thymidin-Block. Die unbehandelten Zellen lagen zum Zeitpunkt der Färbung mehr in der G₁-Phase als in der G₂/M-Phase vor. Der Serumentzug hatte keinen deutlichen Einfluss auf den Zellzyklus der behandelten Zellen (B), wohingegen der Doppel-Thymidin-Block die Zellen überwiegend in der S-Phase akkumulierte (C).

Mit einem Doppel-Thymidin-Block sollten die Zellen in der S-Phase des Zellzyklus arretiert werden. Cos-1 und Caco-2 Zellen wurden in Zellkulturschalen ausgesät, bis zu einem semi-konfluenten Monolayer herangezogen und anschließend wie unter 4.3.2 beschrieben mit Thymidin behandelt. Die Caco-2 Zellen lösten sich während einer der Waschschriffe fast gänzlich vom Boden ihres Kulturgefäßes ab und konnten nicht weiter verwendet werden. Die

durchflußzytometrische Messung der Fibroblasten ergab, dass mit dieser Methode fast alle Zellen in der S-Phase akkumuliert werden konnten (Abb. 15 C).

5.1.3 Infektion synchronisierter Cos-1 Fibroblasten mit *L. monocytogenes*

Nachdem Methode und Zelltyp ermittelt waren, um eine Zelllinie in einer bestimmten Phase des Zyklus zu akkumulieren, wurden Fibroblasten in Zellkulturflaschen ausgesät. Durch einen Doppel-Thymidin-Block wurden sie in der S-Phase arretiert und anschließend mit *L. monocytogenes* EGD infiziert. Als Negativkontrolle dienten nicht-infizierte Fibroblasten. Als zusätzliche Kontrolle für eine erfolgreiche Arretierung wurden parallel dazu nicht-infizierte Fibroblasten unmittelbar vor der Infektion trypsinisiert, mit Propidiumiodid angefärbt und ihr DNA-Gehalt im Durchflußzytometer gemessen.

Zum Zeitpunkt 4 h p. l. sollten die Zellen lysiert, zelluläre Proteine extrahiert und mit einem anti-Stathmin-Antikörper auf die verschiedenen Phosphorylierungsformen von Stathmin untersucht werden. Leider zeigte sich, dass die Fibroblasten nach der doppelten Thymidinbehandlung einer Infektion mit den Listerien nicht standhalten. Es konnte im Verlauf der Infektion im Mikroskop ein Ablösen der Zellen vom Boden der Kulturgefäße beobachtet werden. Die Zellen, die sich nicht ablösten, zeigten eine stark veränderte Zellmorphologie. Die Frage, ob eine Infektion mit Listerien das Phosphorylierungsmuster von Stathmin beeinflusst und verändert, konnte daher mit dieser Methode nicht beantwortet werden.

5.1.4 Immunfluoreszenzanalyse mit einem anti-Tubulin-Antikörper

Um herauszufinden, ob durch die Rekrutierung von Stathmin an die bakterielle Oberfläche das zelluläre MT-Gerüst lokal depolymerisiert wird, wurden Doppelimmunfluoreszenzfärbungen an mit *L. monocytogenes* EGD infizierten Säugerzellen mit einem anti-Tubulin-Antikörper und FITC-Phalloidin durchgeführt. Es sollte dadurch überprüft werden, ob an den Stellen im Zytoplasma, an denen sich Listerien mit ihren Aktinschweiften fortbewegen, die MT durch die Rekrutierung von Stathmin an die bakterielle Oberfläche depolymerisiert und unterbrochen sind.

Die Zellen wurden vor einer Infektion auf Deckgläsern ausgesät und infiziert, indem Listerien in das Kulturmedium gegeben wurden. Nach einem Zentrifugationsschritt und weiteren 50 min Inkubation wurde das bakterienhaltige Medium abgezogen, die Zellen vorsichtig gewaschen und gentamycinhaltiges Medium zugegeben. 4 h p. l. wurden die Zellen mit Aceton fixiert und angefärbt. In Vorversuchen wurde zunächst der geeignete Zelltyp für die geplanten Immunfluoreszenzanalysen ermittelt. Cos-1 Fibroblasten und Caco-2 Epithelzellen wurden mit Aceton fixiert und mit einer 1:200 Verdünnung eines Maus-anti-Tubulin-Antikörpers und einem CyTM3-konjugierten Ziege-anti-Maus-Antikörper (1:600) angefärbt. Während in Cos-1 Zellen (Abb. 16 A) der anti-Tubulin-Antikörper die Strukturen des MT-Gerüsts sehr deutlich anfärbte, wurde bei den Caco-2 Zellen neben dem MT-Gerüst auch das Zytoplasma der Zelle angefärbt. Auch waren die MT hier weniger als fädige Strukturen zu erkennen und die Kerne weniger deutlich abgegrenzt (Abb. 16 B). Bei den in beiden Abbildungen stark gefärbten Bereichen unmittelbar neben den Zellkernen könnte es sich aufgrund ihrer Position innerhalb der Zelle um das Primärzentrum der Mikrotubuli-Organisation (MTOC), das Centrosom handeln. Ausgehend von der Beobachtung, dass die Färbung von Cos-1 Zellen die zellulären Strukturen

besser darstellt, wurden alle weiteren Immunfluoreszenzanalysen mit dem anti-Tubulin-Antikörper an Cos-1 Fibroblasten durchgeführt.

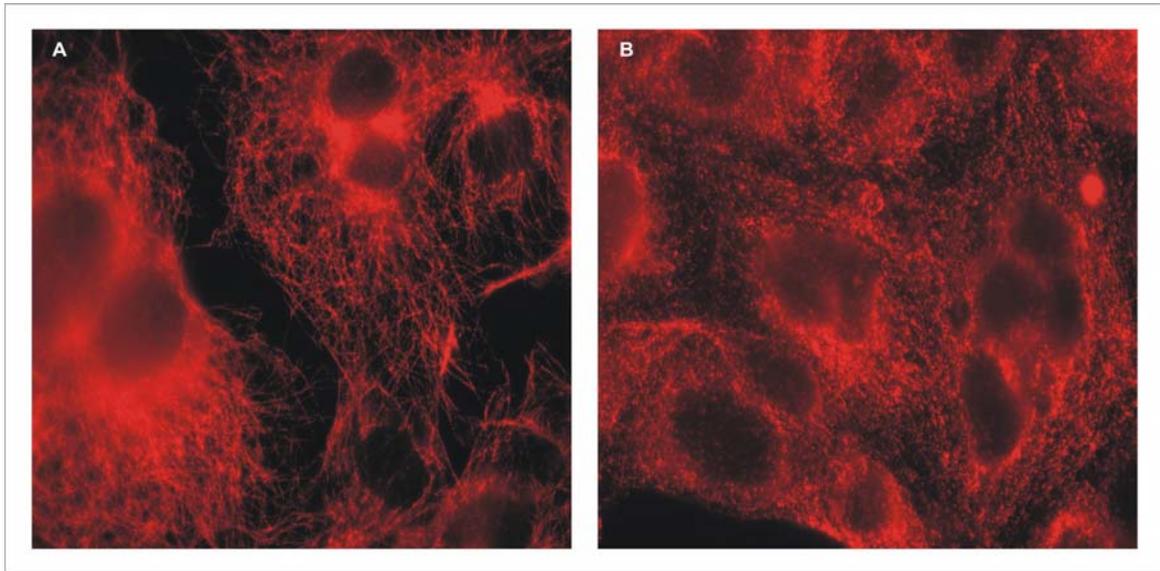


Abb. 16: Immunfluoreszenzaufnahme nicht-infizierter Cos-1 Zellen bei 1000-facher Vergrößerung.

Zur Ermittlung des geeigneten Zelltyps wurden Cos-1 Fibroblasten (**A**) und Caco-2 Epithelzellen (**B**) nach der Fixierung mit dem anti-Tubulin-Antikörper gefärbt. Bei den Cos-1 Zellen (**A**) sind deutlich MTs zu erkennen sowie Zellkerne und die unmittelbar daneben liegenden Centrosomen. In Caco-2 (**B**) Zellen färbte der Antikörper neben den MT und dem Centrosom auch das Zytoplasma der Zellen an.

Die Spezifität des Sekundärantikörpers wurde durch eine Negativkontrolle überprüft. Hierzu wurden Cos-1 Fibroblasten mit *L. monocytogenes* EGD infiziert und 4 h p. I. nach der Fixierung mit einer relativ hohen Konzentration des CyTM3-

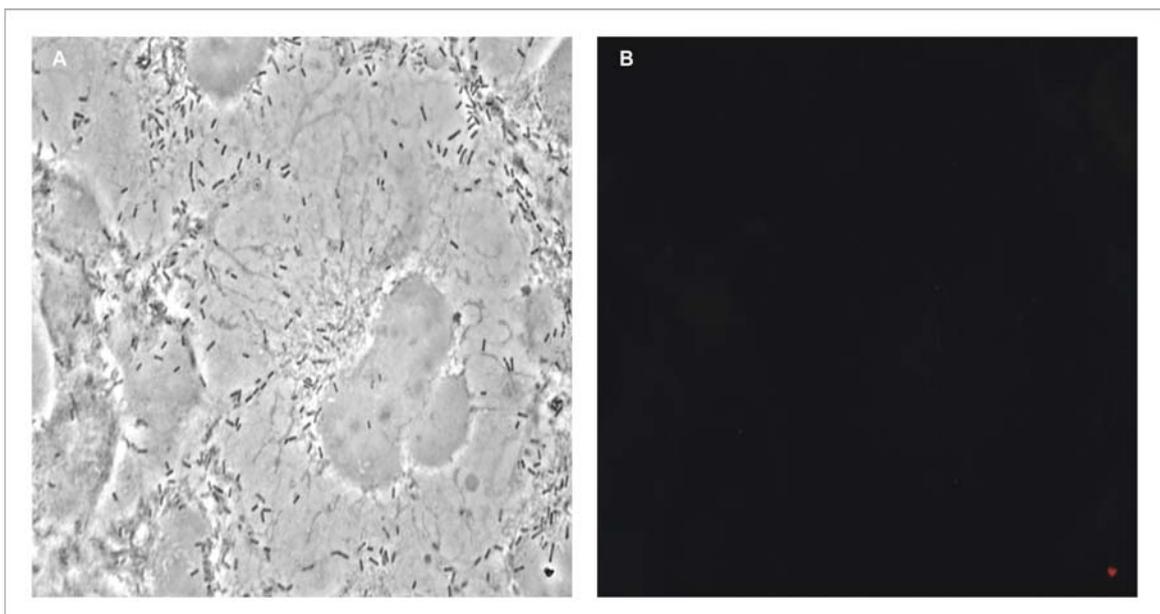


Abb. 17: Negativkontrolle bei 1000-facher Vergrößerung.

A: Phasenkontrastaufnahme. **B:** Immunfluoreszenzaufnahme zu A. Cos-1 Fibroblasten wurden mit *L. monocytogenes* EGD infiziert und 4 h p. I. mit dem Sekundärantikörper inkubiert. Trotz der

Ergebnisse

hohen Konzentration (1:20) des sekundären Antikörpers und langer Belichtungszeit wurden weder zelluläre noch bakterielle Strukturen angefärbt.

konjugierten Ziege-anti-Maus-Antikörpers inkubiert. Es zeigte sich, dass bei einer Verdünnung von 1:20 weder zelluläre, noch bakterielle Strukturen gefärbt wurden. Der verwendete Sekundärantikörper zeigte demnach weder eine Kreuzreaktion mit listeriellen, noch mit zellulären Proteinen (Abb. 17).

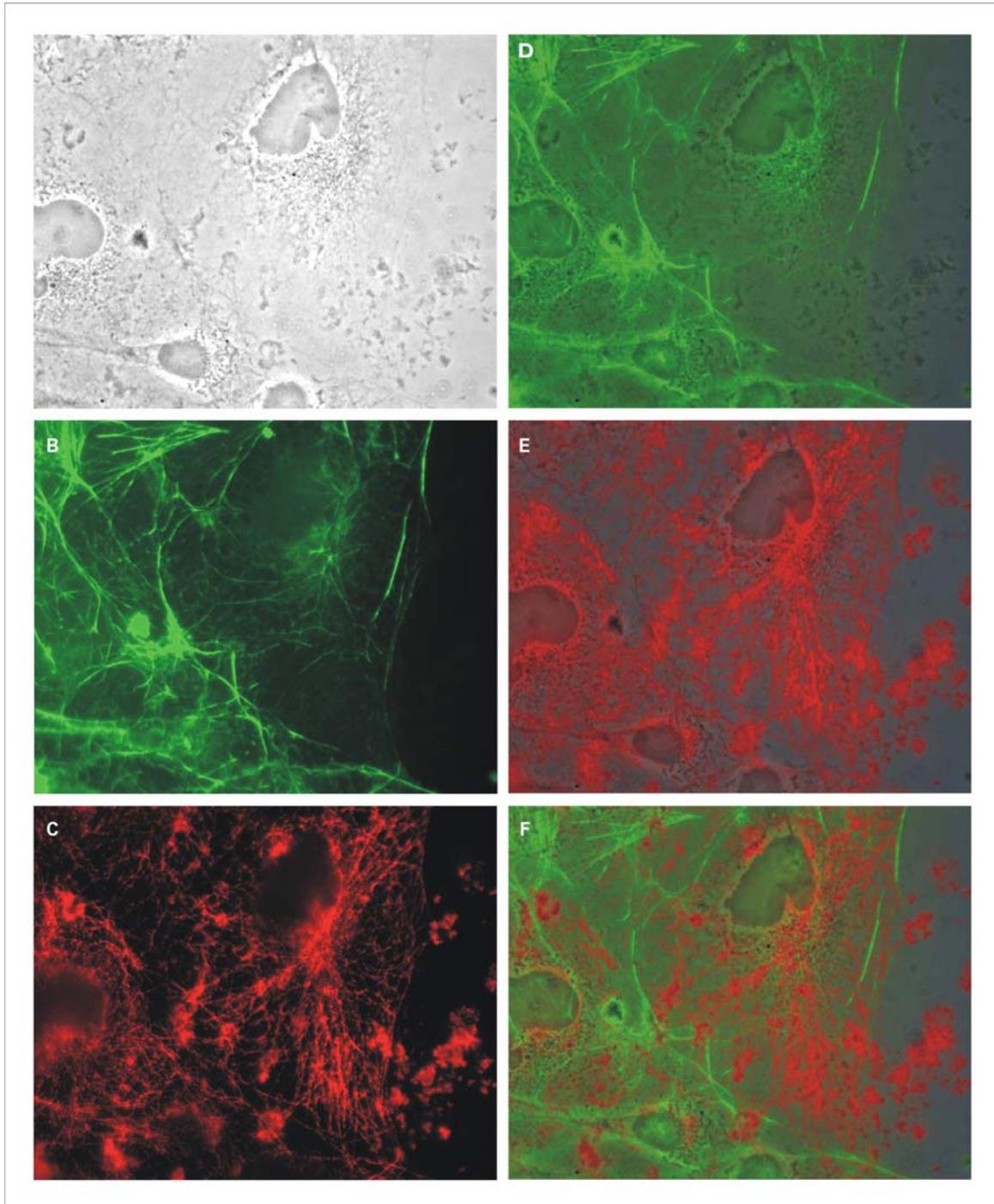


Abb. 18: Immunfluoreszenzaufnahmen nicht-infizierter Cos-1 Fibroblasten bei 1000-facher Vergrößerung.

A: Phasenkontrastaufnahme. **B:** FITC-Phalloidin-Färbung des F-Aktin Gerüsts. **C:** Färbung des anti-Tubulin-Antikörpers. **D:** Überlagerung von A und B. **E:** Überlagerung von A und C. **F:** Überlagerung von A, B und C.

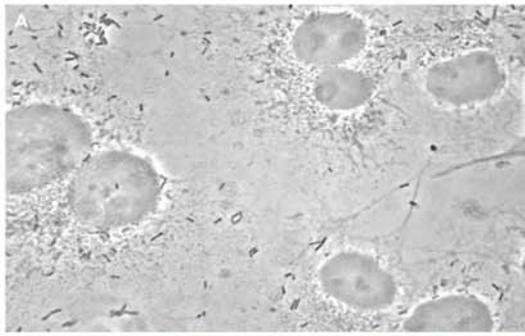
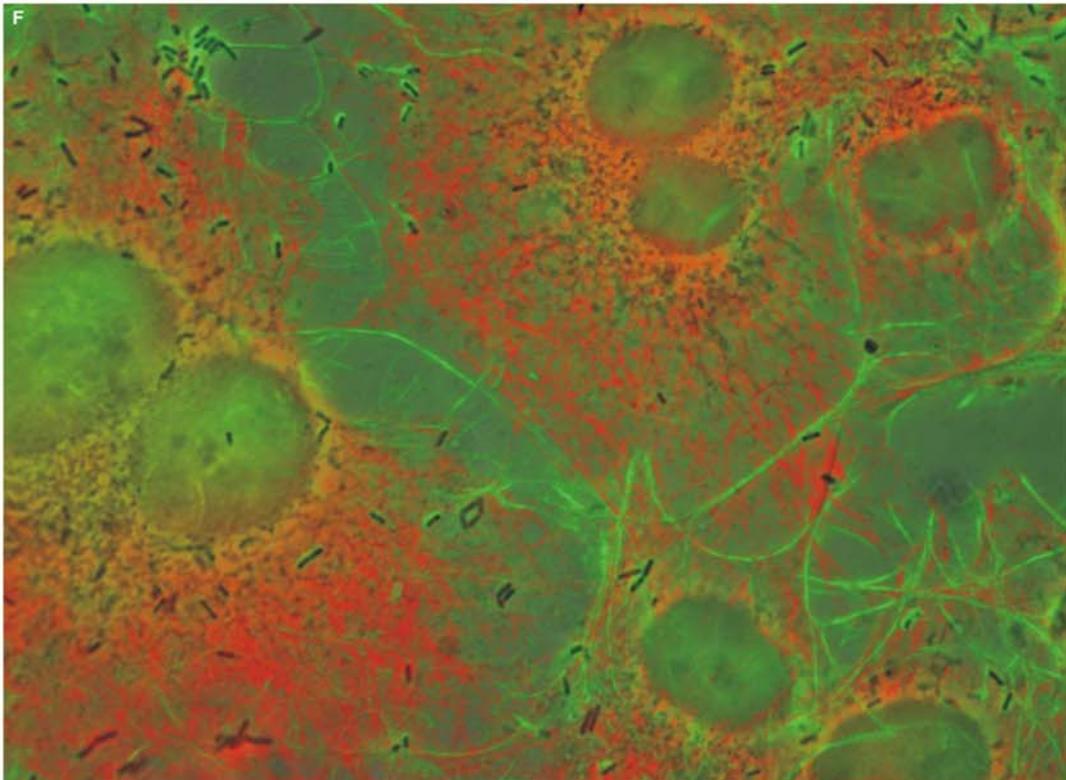
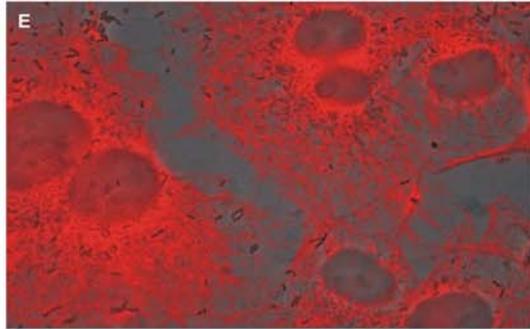
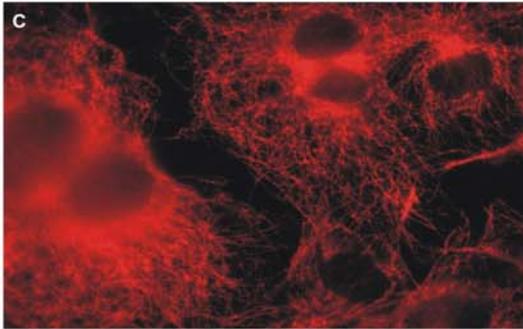
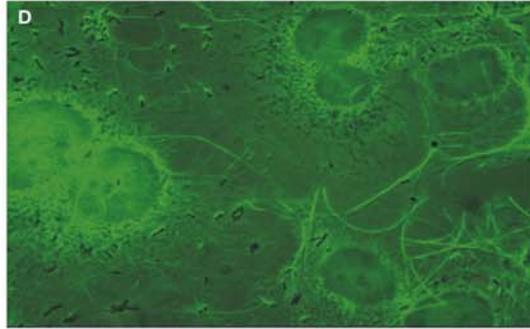
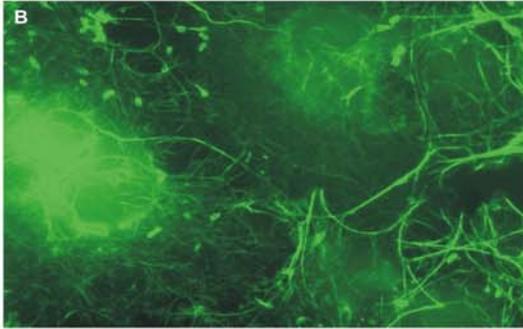


Abb. 19: Immunfluoreszenzanalyse infizierter Cos-1 Fibroblasten bei 1000-facher Vergrößerung.

A: Phasenkontrastaufnahme. **B:** FITC-Phalloidin-Färbung von F-Aktin. **C:** Rotfluoreszenz der anti-Tubulin-Färbung. **D:** Überlagerung von A und B. **E:** Überlagerung von A und C. **F:** Überlagerung von A, B und C.



Nach der Bestimmung des geeigneten Zelltyps für anti-Tubulin-Färbungen und Überprüfung der Spezifität des Sekundärantikörpers wurden Doppelimmunfluoreszenzfärbungen angefertigt. Hierzu wurden Cos-1 Fibroblasten nach der Aceton-Fixierung mit dem anti-Tubulin-Antikörper und dem Sekundärantikörper inkubiert und zusätzlich mit Fluorescein-Isothiocyanat (FITC)-konjugiertem Phalloidin (Sigma) angefärbt, um das zelluläre F-Aktin darzustellen. Abbildung 18 zeigt das Ergebnis einer solchen Doppelimmunfluoreszenzfärbung nicht-infizierter Cos-1 Fibroblasten. Es sind neben einer Phasenkontrastaufnahme (A) das mit FITC-Phalloidin gefärbte Aktinzytoskelett in der Grünfluoreszenz (B) und die das MT-Gerüst darstellende anti-Tubulin-Färbung in der Rotfluoreszenz (C) abgebildet. Zudem sind noch die Überlagerungen (D, E und F) der einzelnen Aufnahmen dargestellt. In Abb. 18 F ist sehr gut zu erkennen, dass sich die Färbungen von Aktin und MT gegenseitig ausschließen.

Für Doppelimmunfluoreszenzfärbungen infizierter Zellen wurden Fibroblasten mit *L. monocytogenes* EGD infiziert, 4 h p. i. fixiert und angefärbt. Wie schon zuvor bei den nicht-infizierten Zellen (Abb. 18 E) war auch hier bei der Überlagerung der Phasenkontrastaufnahme mit der Rotfluoreszenzaufnahme der anti-Tubulin-Färbung (Abb. 19 E) deutlich zu erkennen, dass die Centrosomen-Komplexe neben den Zellkernen vom anti-Tubulin-Antikörper gebunden werden und sich die Mikrotubuli von hier aus in die Peripherie der Zelle erstrecken. FITC-Phalloidin färbte neben dem Aktinergüst der Zelle und dem Zellkern auch von intrazellulären Listerien durch Aktinpolymerisation gebildete Aktinschweife an (Abb. 19 D). Es wurden jedoch nicht alle Listerien einer Zelle vom FITC-Phalloidin angefärbt. Die Überlagerung der Phasenkontrastaufnahme mit beiden Fluoreszenzaufnahmen zeigte, wie schon zuvor bei den nicht-infizierten Zellen, dass sich die FITC-Phalloidin Färbung und anti-Tubulin-Färbung wechselseitig ausschließen (Abb. 18 F; Abb. 19 F). Es konnte jedoch nicht aufgezeigt werden, dass an den Stellen im Zytoplasma, an denen die Listerien Aktin polymerisieren, das Mikrotubuligerüst unterbrochen ist.

Mit den Ergebnissen dieser Experimente konnte somit nicht geklärt werden, ob intrazelluläre Listerien durch die Rekrutierung von Stathmin eine lokale Depolymerisierung der Mikrotubuli induzieren.

5.1.5 Genotypisierung von Stathmin knock-out Mäusen mittels PCR

Anhand von Stathmin knock-out Mäusen wurde untersucht, ob Stathmin den intrazellulären Lebenszyklus von *L. monocytogenes* beeinflusst. Diese Tiere wurden sowohl für die Isolierung von Primärzellen verwendet als auch für *in vivo* Infektionsstudien eingesetzt.

Die hier verwendete Stathmin knock-out Mauslinie (Stathmin^(-/-)-Mäuse) wurde von Dr. U. Schubart in C57/BL6 Mäusen etabliert. Bei diesen Tieren sind die Exons II und III des für Stathmin codierenden Gens durch eine PGKneo-Kassette ersetzt (Schubart *et al.*, 1996). Diese Genkassette trägt das für die Neomycintransferase codierende Gen *neo* des Transposons Tn5 unter der Kontrolle des Phosphoglycerinkinasepromotors (*pgkl*) der Maus. In Abb. 20 A sind die genomische Anordnung der Exons und Introns des wildtypischen Stathmin-Gens schematisch dargestellt. Einige innerhalb dieser Sequenz liegende Restriktionsschnittstellen sind ebenfalls eingezeichnet. Abb. 20 B zeigt das für die Konstruktion der Mäuse verwendete modifizierte Plasmid pSP72 mit seinem so genannten "gene-targeting"-Konstrukt, sowie die für dessen Herstellung relevanten Restriktionsschnittstellen. Neben der PGKneo-Kassette,

durch die Exon II und Exon III des Stathmin-Gens ersetzt waren, trägt das Mutageneseplasmid am 3'-Ende seines gene-targeting Konstruktes eine PGKtk-Kassette, die das Thymidinkinase-Gen *tk* des *Herpes simplex*-Virus unter der Kontrolle des *pgkl*-Promotors trägt. In Abb. 20 C ist der veränderte Stathminlokus dargestellt, wie er in den Stathmin knock-out Mäusen vorliegt.

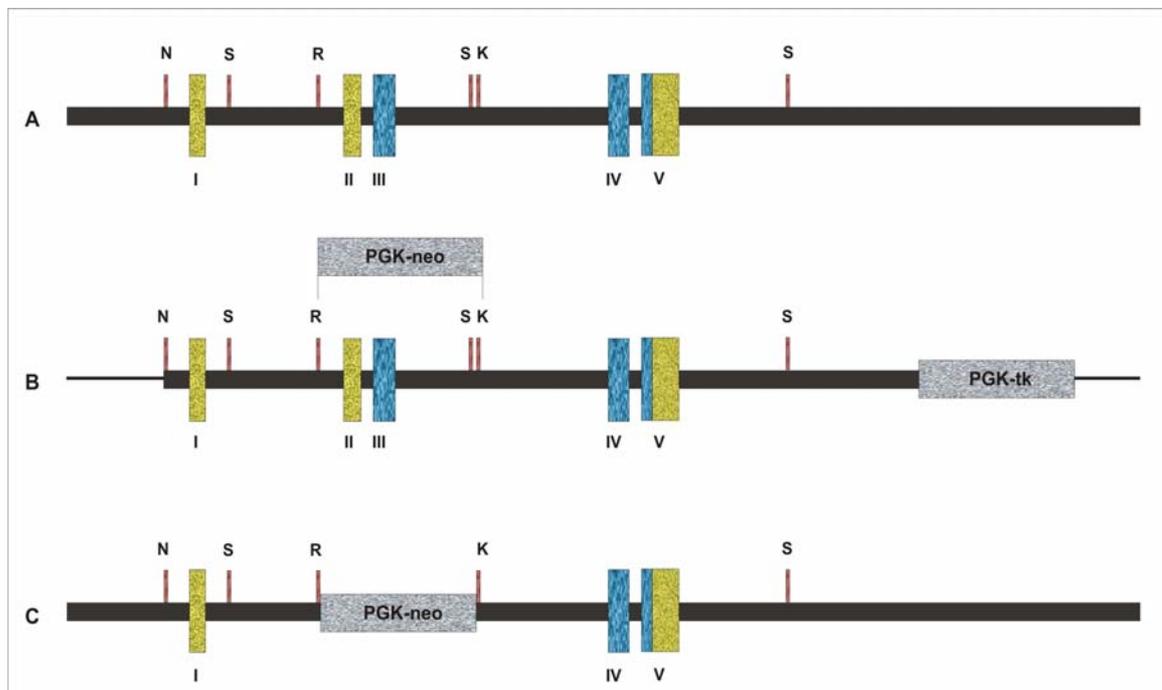


Abb. 20: Schematische Darstellung des Stathminlokus und des zur Konstruktion der knock-out Mäuse verwendeten Vektors (aus Schubart *et al*, 1996).

A: Das Stathmin-Gen. **B:** Gene-targeting Konstrukt des pSP27-Plasmids mit den zu dessen Herstellung relevanten Restriktionsschnittstellen. **C:** Das Stathmin-Gen nach der homologen Rekombination mit dem Vektor. Dicke horizontale Linie: genomische Sequenz. Dünne horizontale Linie: Vektorsequenz. Blaue Boxen: translatierte Exonregionen. Gelbe Boxen: untranslatierte Exonregionen. Rote Balken: Restriktionsschnittstellen. N: NotI. S: SacI. R: EcoRI. K: KpnI.

Die von Dr. U. Schubart zur Verfügung gestellten Stathmin^(-/-)-Mäuse wurden zunächst mit homozygoten wildtypischen C57/BL6 Mäusen (Stathmin^(+/+)-Mäuse) rückgekreuzt. Die erhaltene heterozygote^(+/-) F1-Generation wurde miteinander verpaart und der Genotyp der F2-Generation über geeignete Primer mittels PCR bestimmt. Hierzu wurde die chromosomale DNA aus Ohrgefäße extrahiert und diese als Template für eine PCR eingesetzt. Die Primer wurden so gewählt, dass der wildtypspezifische "Forward" Primer 1 in einer Region innerhalb von Intron III band, die im mutierten Allel deletiert war. Der zweite Forward-Primer wurde so gesetzt, dass er spezifisch eine Sequenz innerhalb der PGKneo-Kassette erkannte, die im wildtypischen Allel fehlte. Der Reverse Primer hybridisierte innerhalb einer Region von Intron III, die sowohl im wildtypischen, als auch im mutierten Allel vorhanden war. In einem PCR Ansatz wurden alle drei Primer eingesetzt und aufgrund deren unterschiedlicher Bindungsstellen verschieden große Produkte erwartet. Mit der DNA homozygoter Stathmin^(+/+)-Mäuse als Template sollte die PCR ein 463 bp-Produkt liefern, die DNA aus Stathmin^(-/-)-Tieren dagegen aufgrund der Insertion ein 610 bp-Produkt. Heterozygote Tiere sollten, da sie je eine Kopie des mutierten und wildtypischen Allels tragen, beide Produkte liefern.

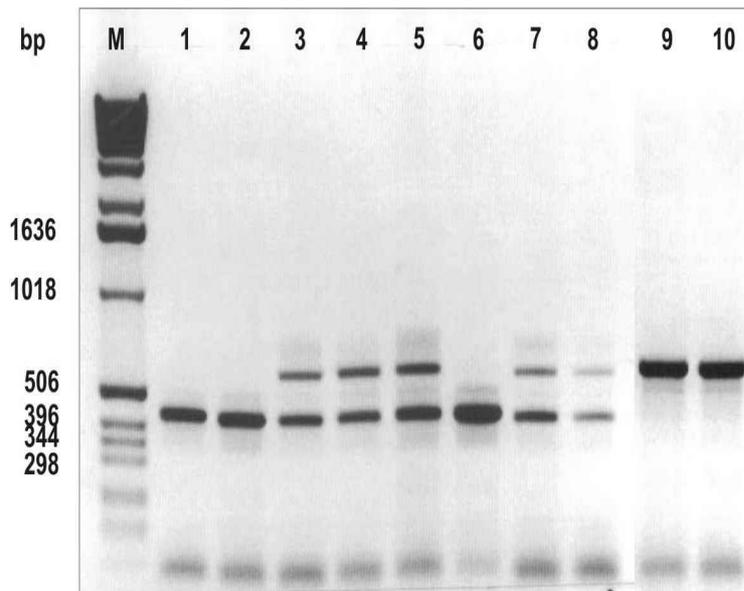


Abb. 21: PCR zur Genotypisierung verschiedener Mäuse aus einer heterozygoten Verpaarung. Aufgrund der Insertion einer PGK-*neo*-Kassette im Stathmin-Gen wurden bei den unterschiedlichen Genotypen der Mäuse verschieden große PCR-Produkte erwartet. Bei den Mäusen 1, 2 und 6 handelte es sich um wildtypische Tiere. 3, 4, 5, 7 und 8 wurden aufgrund der PCR-Produkte als heterozygote Tiere identifiziert. Mäuse 9 und 10 waren homozygote knock-out-Tiere. bp: Basenpaare. M: Marker

In Abb. 21 ist das Ergebnis einer PCR abgebildet, über die 10 Mäuse aus einer heterozygoten Verpaarung genotypisiert wurden. Es ist aufgrund der erhaltenen PCR-Produkte eindeutig zu erkennen, dass es sich bei den Tieren 1, 2 und 6 um wildtypische Stathmin^(+/+)-Mäuse handelte. Die Tiere 3-5, 7 und 8 wurden als heterozygote Stathmin^(+/-)-Mäuse identifiziert, da sie zwei Banden mit den entsprechenden Produktgrößen lieferten. Bei den Tieren 9 und 10 handelte es sich um homozygote Stathmin^(-/-)-Mäuse.

Homozygote knock-out Männchen wurden mit heterozygoten Weibchen verpaart, da diese Weibchen größere Würfe lieferten und sich ihrer Brut gegenüber als weniger aggressiv zeigten als homozygote knock-out Weibchen. Die Nachkommen wurden ebenfalls in einer PCR auf ihren Genotyp hin untersucht und anschließend selektioniert. Einige der heterozygoten Weibchen wurden für die weitere Zucht verwendet.

5.1.6 Isolierung und Infektion primärer Knochenmarksmakrophagen (BMMΦ) mit *L. monocytogenes* EGD

Die primären Knochenmarksmakrophagen wurden aus 6–8 Wochen alten männlichen Mäusen isoliert. Die Tiere wurden durch zervikale Dislokation getötet und das Knochenmark (BM) aus den Oberschenkelknochen der hinteren Extremitäten isoliert. Die Monozyten wurden unter dem Lichtmikroskop ausgezählt und ausgesät. Aufgrund ihrer großen, runden Form mit einem gezahnten Rand waren sie sehr gut von Erythrozyten zu unterscheiden. Nach 3-4 Tagen bei 37° C wurde das Medium abgenommen, die Zellen vorsichtig gewaschen und mit antibiotikahaltigem BMMΦ-Kulturmedium versorgt. Man konnte zu diesem Zeitpunkt bereits erkennen, dass die Monozyten adhärent waren und begonnen hatten sich zu Makrophagen zu differenzieren. Sie wiesen im Lichtmikroskop eine spindelförmige Morphologie auf. Nach weiteren vier Tagen bei 37° C waren die BMMΦ ausdifferenziert und hatten einen konfluenten Zellrasen gebildet. Sie wurden in 1x PBS auf Eis vom Schalenboden abgelöst, erneut ausgesät und nach 48 h mit *L. monocytogenes* infiziert.

Parallel zur Entnahme der Oberschenkelknochen zur Isolierung der Primärzellen, wurde den Tieren zusätzlich die Milz für eine Proteinextraktion entnommen. Das Organ wurde homogenisiert und aufgeschlossen. Die Proteinlysate der

Stathmin^(-/-)- und Stathmin^(+/+)-Mäuse wurden in einem Minigel elektrophoretisch aufgetrennt. Ein anschließender Westernblot und Inkubation mit einem Kaninchen-anti-Stathmin-Antikörper sollte bestätigen, dass es sich bei Mäusen, die in der PCR als Stathmin^(-/-)- bzw. Stathmin^(+/+)-Tiere identifiziert wurden, auch wirklich um Stathmin knock-out bzw. wildtypische C57/BL6 Mäuse handelte. Wie in Abbildung 22 ersichtlich, konnte nur im Proteinlysate der wildtypischen C57/BL6-Maus auf der Laufhöhe von 19 kDa ein Protein mit dem anti-Stathmin-Antikörper nachgewiesen werden. Die Größe dieser Bande stimmt mit dem theoretischen Molekulargewicht von Stathmin überein. Im Proteinlysate der Stathmin^(-/-)-Maus konnte keine Bande detektiert werden.

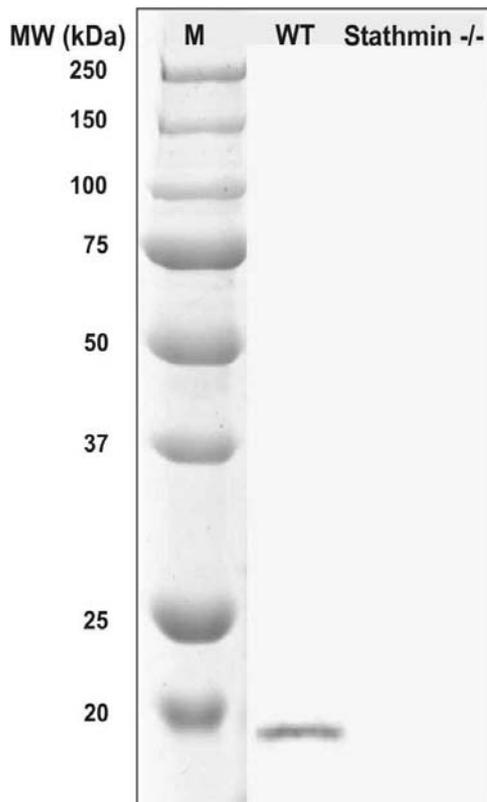


Abb. 22: Westernblot mit dem anti-Stathmin-Antikörper (1:1000 in PBS/2 % Ziegen Serum); Sekundärantikörper HRP-konjugierter Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper. Die Membran wurde mit Chloronaphthol entwickelt. Es wurden pro Spur 35 µg Protein aufgetragen. Im Extrakt aus wildtypischen C57/BL6 Mäusen wurde spezifisch eine Bande auf der Höhe von 19 kDa erkannt, im Extrakt aus stathmindefizienten Mäusen war kein Stathmin detektiert. MW: Molekulargewicht. M: Marker; WT: C57/BL6-Maus. Stathmin^{-/-}: Stathmin knock-out Maus.

5.1.6.1 Untersuchung des Einflusses von Stathmin auf die phagozytische Aktivität der BMMΦ

In Invasionsversuchen wurde ein möglicher Einfluss von Stathmin auf die phagozytische Aktivität der BMMΦ untersucht. Hierzu wurden ausdifferenzierte wildtypische und stathmindefiziente BMMΦ wie oben beschrieben ohne Antibiotikum in 12-Napf-Platten ausgesät und für 45 min infiziert. 1 h p. I. wurde die Anzahl intrazellulärer Bakterien durch Ausplattieren geeigneter Verdünnungsstufen bestimmt.

In Abb. 23 ist die relative Phagozytoserate der BMMΦ graphisch dargestellt. 1 h p. I. waren in Stathmin knock-out BMMΦ mehr Bakterien nachzuweisen als in wildtypischen BMMΦ, die Phagozytoserate lag hier bei 123 %. Dieser Wert wurde in Relation zur Phagozytoserate durch wildtypische BMMΦ bestimmt. Wenngleich diese Differenz zwischen den Phagozytoseraten reproduzierbar war, erwies sie sich im Students *t*-Test als nicht-signifikant ($p > 0,05$).

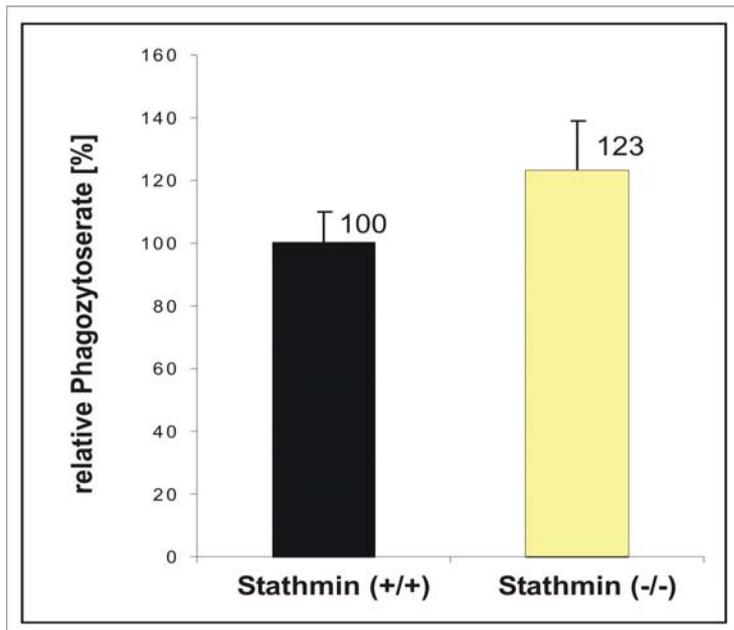


Abb. 23: Graphische Darstellung der Phagozytoserate von *L. monocytogenes* durch BMMΦ.

Listerien wurden von stathmindefizienten BMMΦ stärker phagozytiert. Dieser Unterschied erwies sich im *t*-Test als nicht-signifikant ($p = 0,99$). Die angegebene Phagozytoserate der Stathmin knock-out Makrophagen wurde in Relation zur Phagozytoserate wildtypischer BMMΦ (= 100 %) ermittelt.

5.1.6.2 Einfluss von Stathmin auf die Replikation von *L. monocytogenes* im Zytoplasma der BMMΦ

Um zu überprüfen, ob Stathmin die Replikation der Listerien im Zytoplasma der BMMΦ beeinflusst, wurden diese 48 h nach dem Aussäen mit einer niedrigen MOI infiziert. Die Anzahl intrazellulärer Bakterien wurde zu verschiedenen Zeitpunkten p. I. über einen Zeitraum von 24 h durch Ausplattieren geeigneter Verdünnungsstufen des Zelllysates auf BHI-Agar bestimmt. Wie in Abb. 24 graphisch dargestellt zeigte sich, dass innerhalb des beobachteten Zeitraumes kein Unterschied bezüglich der Anzahl intrazellulärer Listerien in wildtypischen und Stathmin knock-out BMMΦ festzustellen war.

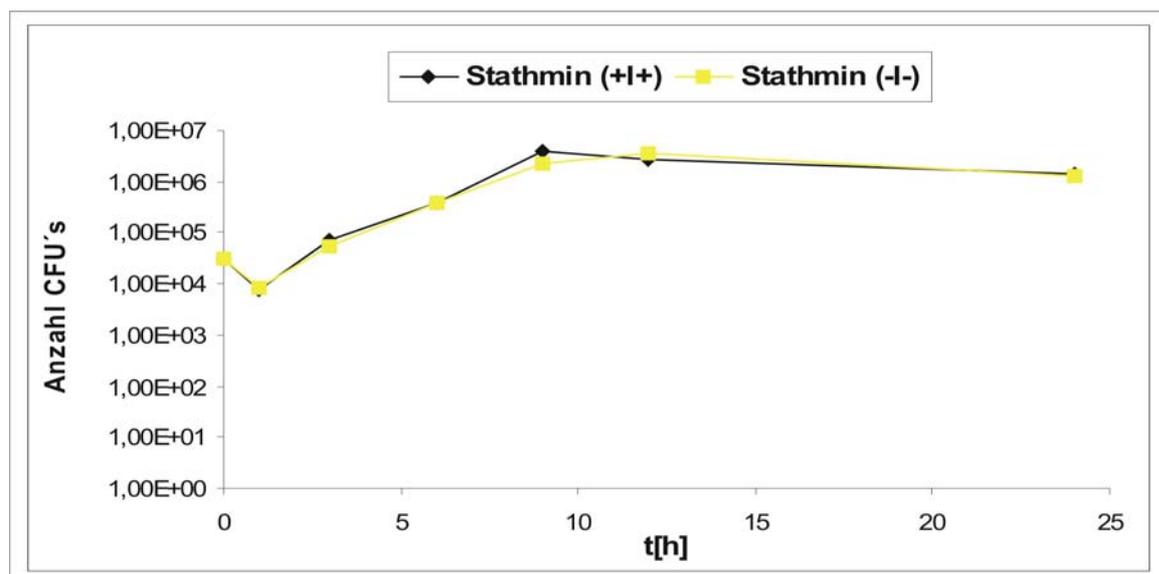


Abb. 24: Graphische Darstellung der intrazellulären Replikation von *L. monocytogenes* EGD in wildtypischen und Stathmin^(-/-)-BMMΦ.

Es war innerhalb des untersuchten Zeitrahmens bezüglich der Anzahl intrazellulärer Listerien kein Unterschied zwischen wildtypischen und Stathmin^(-/-)-BMMΦ zu ermitteln.

Parallel dazu wurden auf Deckgläsern kultivierte wildtypische und Stathmin^(-/-)-BMMΦ mit *L. monocytogenes* EGD infiziert und 1 h, 3 h und 6 h p. I. mit einer Giemsa-Lösung angefärbt. Als Resultat dieser Färbung erschienen die Zellkerne im Lichtmikroskop rotviolett, das Zytoplasma blau-violett und intrazelluläre Bakterien als dunkelviolette Stäbchen. Für eine weitere Auswertung wurden zufällige Stellen in den Präparaten eingestellt und alle im Sichtfeld vorliegenden Zellen gezählt. Anschließend wurde die Anzahl einzelner Bakterien in einem Makrophagen ausgezählt und unter Berücksichtigung der Zellzahl im Sichtfeld der Mittelwert an Listerien pro Zelle berechnet (Abb. 25).

Mit beiden Methoden wurde ein übereinstimmendes Ergebnis erhalten. Die Anzahl intrazellulärer Listerien in Stathmin knock-out BMMΦ entsprach der in wildtypischen BMMΦ, es konnte diesbezüglich zu keinem untersuchten Zeitpunkt p. I. ein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Demnach scheint sich die Inaktivierung von Stathmin nicht auf das intrazelluläre Überleben und die Replikation von *L. monocytogenes* im Zytoplasma der Makrophagen auszuwirken.

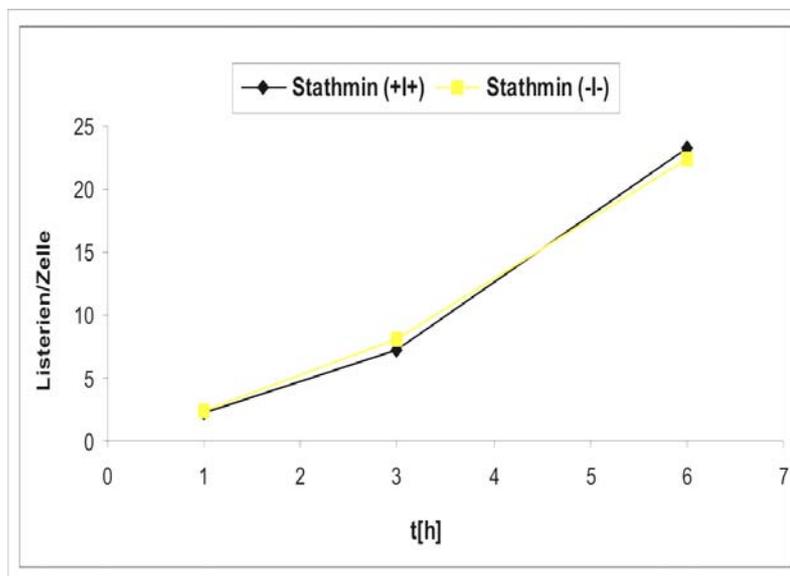


Abb. 25: Graphische Darstellung der Anzahl intrazellulärer Listerien in WT und stathmindefizienten BMMΦ. Für die Auswertung wurde eine beliebige Stelle im Präparat gewählt und die im Sichtfeld liegenden Zellen sowie darin enthaltene Bakterien gezählt. Im Diagramm aufgezeigte Werte entsprechen dem Mittelwert an Listerien pro Zelle im Sichtfeld.

5.1.6.3 Immunfluoreszenzanalysen infizierter BMMΦ mit einem anti-Stathmin-Antikörper

Die intrazelluläre Verteilung von Stathmin im Zytoplasma der BMMΦ wurde über Immunfluoreszenzfärbungen untersucht. Wildtypische und Stathmin^(-/-)-BMMΦ wurden mit *L. monocytogenes* EGD infiziert (MOI 1) und 4 h p. I. fixiert. Sie wurden mit einem Kaninchen-anti-Stathmin-Antikörper und einem Rhodamine RedTM-X-konjugierten Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper inkubiert. Es zeigte sich, dass die Inkubation mit dem anti-Stathmin-Antikörper in einer punktierten Färbung der Zellkerne und des Zytoplasmas der wildtypischen BMMΦ resultierte (Abb. 26, B und C). Intrazelluläre Listerien wiesen bei einer stärkeren Vergrößerung (hier nicht gezeigt) eine asymmetrische anti-Stathmin-Färbung auf ihrer Oberfläche auf. Die Stathmin-Verteilung ist besonders dort gut zu sehen, wo die Bakterien mit im Phasenkontrast gut sichtbaren Aktinschweifern assoziiert sind (Abb. 26, Pfeile). Es waren jedoch nicht alle Bakterien, sondern nur die in bestimmten Bereichen der Zelle vom anti-Stathmin-Antikörper angefärbt. Überraschenderweise wurden auch in Stathmin knock-out BMMΦ das

Zytoplasma, sowie Zellkerne und intrazelluläre Listerien vom anti-Stathmin-Antikörper angefärbt (Abb. 26, E und F). Es konnte bezüglich der Fluoreszenzintensität und Verteilung der gefärbten Strukturen und Bakterien zwischen den Präparaten der Stathmin^(+/+)- und Stathmin^(-/-)-BMMΦ kein Unterschied festgestellt werden.

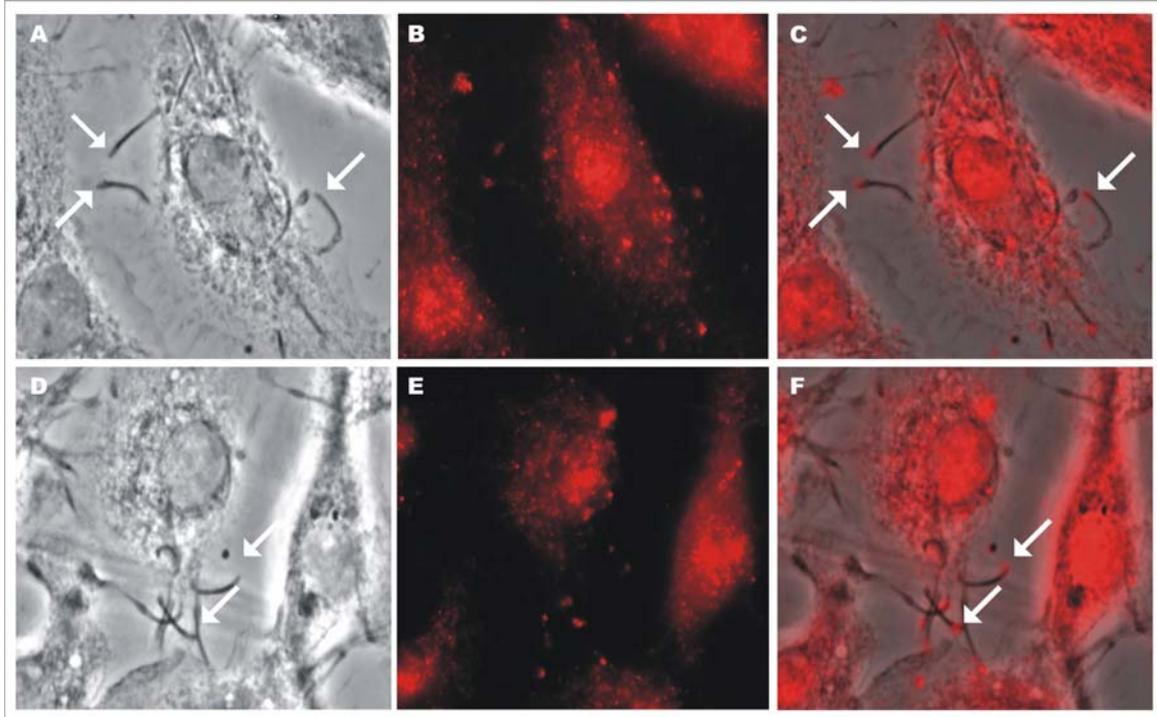


Abb. 26: Immunfluoreszenzanalyse *L. monocytogenes* EGD infizierter wildtypischer (A–C) und Stathmin knock-out (D–F) BMMΦ in 1000-facher Vergrößerung. **A:** Phasenkontrastaufnahme. **B:** Rotfluoreszenz des anti-Stathmin- Antikörpers. **C:** Überlagerung von A und B. **D:** Phasenkontrastaufnahme. **E:** Rotfluoreszenz des anti-Stathmin-Antikörpers. **F:** Überlagerung von D und E. Pfeile in C und D markieren Listerien, die mit Aktinschweifchen assoziiert sind.

Um zu überprüfen, ob die Färbung der Stathmin knock-out BMMΦ auf unspezifische Färbemuster bzw. Artefakte des verwendeten Rhodamine RedTM-X-konjugierten Sekundärantikörpers zurückzuführen sind, wurden die Makrophagen mit diesem Antikörper inkubiert, ohne dass eine Inkubation mit dem primären anti-Stathmin-Antikörper vorausgegangen war. Diese direkte Inkubation der infizierten BMMΦ mit einer hohen Konzentration des Sekundärantikörpers (1:20) blieb jedoch völlig negativ, es wurden von diesem keine zellulären Strukturen erkannt (Abb. 27, B und D). Bakterielle Strukturen intrazellulärer Listerien wurden von dem Antikörper alleine ebenfalls nicht angefärbt. Die Färbung extrazellulärer Listerien einer Übernachtskultur (Abb. 27 E) mit dem primären (1:200) und sekundären Antikörper (1:20) lieferte, wie in Abb. 27 F dargestellt, ebenfalls keine unspezifische Fluoreszenz. Der verwendete Rhodamine RedTM-X-konjugierte Sekundärantikörper zeigte keinerlei Kreuzreaktion mit zellulären bzw. listeriellen Proteinen. Worauf also die in den Stathmin knock-out BMMΦ mit dem anti-Stathmin-Antikörper erzielte Fluoreszenz zurückzuführen war, ist unklar, könnte aber auf Kreuzreaktionen des anti-Stathmin-Antikörpers mit Stathmin-verwandten Proteinen zurückgehen.

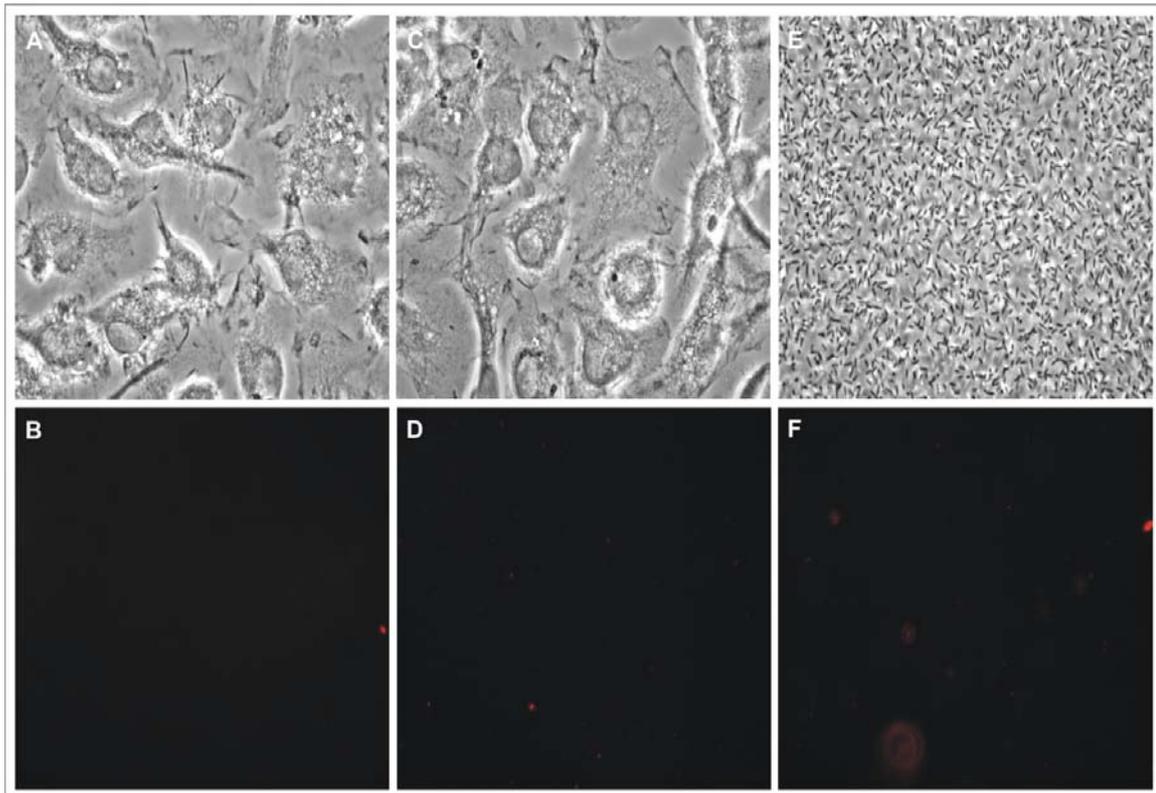


Abb. 27: Negativkontrollen (1000-fach vergrößert).

A: Phasenkontrastaufnahme wildtypischer infizierter BMMφ. **B:** Fluoreszenzaufnahme zu A. **C:** Phasenkontrastaufnahme infizierter Stathmin^(-/-)-BMMφ. **D:** Fluoreszenzaufnahme zu C. **E:** *L. monocytogenes* EGD. **F:** Fluoreszenzaufnahme zu E.

5.1.7 Untersuchung des Einflusses von Stathmin auf die Kolonisierungsfähigkeit von *L. monocytogenes* im Maus-Modell

Zur Untersuchung eines möglichen Einflusses von Stathmin auf eine Infektion mit *L. monocytogenes* EGD *in vivo* wurden wildtypische C57/BL6 und Stathmin knock-out Mäuse in Gruppen von jeweils 7 Tieren über die laterale Schwanzvene intravenös (i. v.) mit je 5×10^3 Listerien infiziert. 3 Tage p. I. wurden die Bakterien aus Leber und Milz isoliert und durch Ausplattieren geeigneter Verdünnungsstufen die Anzahl an Bakterien pro Organ bestimmt (Abb. 28).

Während einige der wildtypischen C57/BL6 Mäuse im Verlauf der Infektion einige Zeichen von Unwohlsein in Form von Abmagerung, stumpfem Fell und Ataxie äußerten, erschienen die infizierten Stathmin^(-/-)-Mäuse gesund und nach außen hin unauffällig. Obwohl die infizierten Stathmin knock-out Mäuse gesünder wirkten als wildtypische Mäuse, waren 3 Tage nach der Infektion in der Leber dieser Tiere um 1 log-Stufe erhöhte Bakterienzahlen, in der Milz waren die Bakterienzahlen im Vergleich zu wildtypischen Mäusen nur um das Doppelte erhöht (Abb. 28). Die Anzahl an Bakterien war dabei in der Milz jeweils höher als in der Leber. Die Unterschiede zwischen den beiden Maus-Stämmen bezüglich der Anzahl an Bakterien pro Organ erwies sich im *t*-Test als signifikant ($p = 0,019$ bzw. $0,011$).

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass Stathmin knock-out Mäuse 3 Tage p. I. empfänglicher für eine Infektion mit *L. monocytogenes* sind als wildtypische

C57/BL6 Mäuse. Es kann daher spekuliert werden, dass Stathmin in irgendeiner Weise an der Kontrolle der Besiedlung von Leber und Milz beteiligt ist.

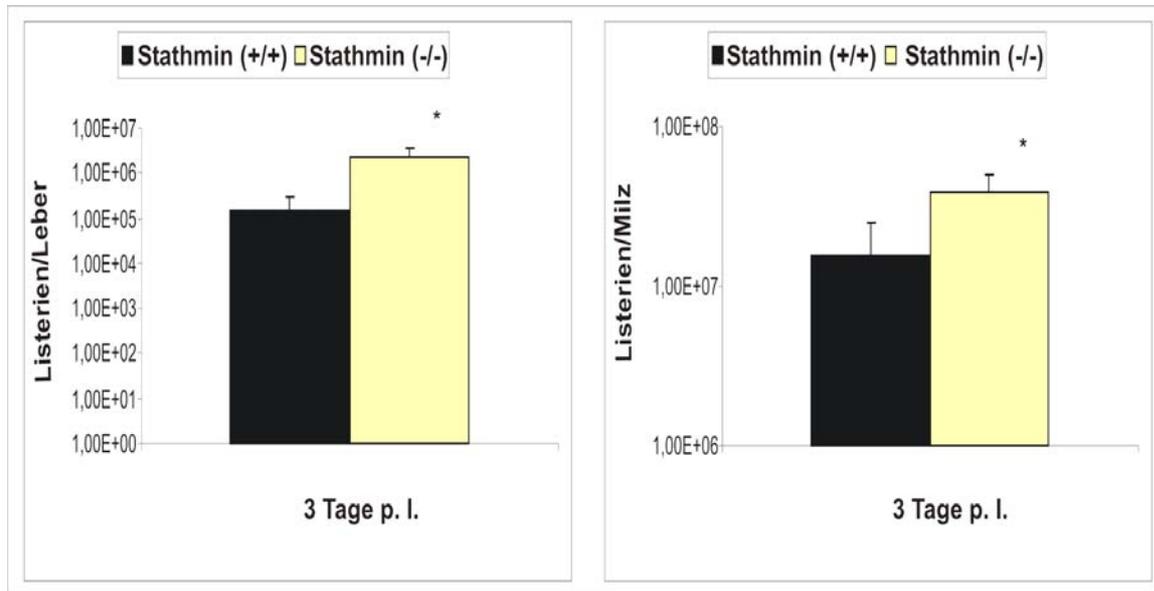


Abb. 28: Graphische Darstellung der Anzahl an Listerien in Leber und Milz von C57/BL6 WT und Stathmin^(-/-)-Mäusen nach i. v. Verabreichung von 5 × 10³ wildtypischen Listerien 3 Tage nach der Infektion.

5.1.8 Intrazelluläres Verhalten von *L. monocytogenes* Δ actA-PRR2/3 nach Infektion verschiedener Zelllinien

Über einen "Yeast Two-Hybrid Screen" wurden Stathmin und ein Teil von LaXp180 (AS 1085 – 1226) als Interaktionspartner identifiziert (Maucuer *et al.*, 1995). Pfeuffer *et al.* haben unter anderem durch Immunfluoreszenzanalysen gezeigt, dass LaXp180 ActA-abhängig an intrazelluläre Listerien rekrutiert wird (Pfeuffer *et al.*, 2000). Des Weiteren wurde mit einem anti-Stathmin-Serum in mit *L. monocytogenes* EGD-infizierten Zellen gezeigt, dass Stathmin ebenfalls, wahrscheinlich indirekt über LaXp180, mit der Oberfläche der intrazellulären Listerien interagiert. Um zu bestätigen, dass diese Kolokalisation von Stathmin mit der Bakterienoberfläche auf ActA zurückzuführen ist, wurden Cos-1 Zellen mit dem Listerien-Stamm *L. monocytogenes* Δ 2 (Hauf *et al.*, 1997) infiziert, dem die Gene *actA*, *plcB* und *mpl* fehlen. Das anti-Stathmin-Serum färbte die Oberfläche dieser Listerien nicht an woraus gefolgert wurde, dass Stathmin für eine Interaktion mit den Bakterien offenbar die Anwesenheit von ActA und LaXp180 benötigt (Pfeuffer *et al.*, 2000).

Wie bereits erwähnt konnten Bauer *et al.* mit Hilfe des Yeast Two-Hybrid Systems 14 C-terminale AS von LaXp180 und die PRR's 2 und 3 von ActA als Interaktionssequenzen dieser beiden Proteine identifizieren (Bauer *et al.*, 2003). Basierend auf diesen Ergebnissen wurde von Frau S. Bauer (Lehrstuhl für Mikrobiologie, Universität Würzburg) eine *L. monocytogenes* Δ actAPRR2/3 Mutante konstruiert, bei der die PRR 2 und 3 von ActA deletiert waren. Da bei diesem Stamm die Interaktion von LaXp180 und ActA aufgrund der Deletion ausbleiben sollte, dürfte gemäß der Hypothese, dass Stathmin über LaXp180 an die Oberfläche der Listerien rekrutiert wird, mit einem anti-Stathmin Antikörper keine Kolokalisation des Phosphoproteins Stathmin mit intrazellulären Bakterien

des Stammes *L. monocytogenes* $\Delta actAPRR2/3$ mehr nachweisbar sein. Dieser Stamm sollte von mir eingehend im Hinblick auf die Interaktion mit Wirtszellen charakterisiert werden.

5.1.8.1 Invasion von *L. monocytogenes* $\Delta actAPRR2/3$ in verschiedene Wirtszellen

Zunächst wurde die Invasivität der Mutante *L. monocytogenes* $\Delta actAPRR2/3$ für Cos-1 Fibroblasten und Caco-2 Epithelzellen im Vergleich zu wildtypischen Listerien untersucht. Eine weitere *actA*-Mutante, *L. monocytogenes* A49, wurde als Negativkontrolle eingesetzt da aufgrund von Angaben in der Literatur bekannt ist, dass ActA eine Rolle für die Aufnahme der Listerien durch bestimmte Wirtszellen spielt (Suárez *et al.*, 2001) und das Fehlen eines funktionalen ActA-Proteins daher die Invasivität verringern sollte. Das Ergebnis der Invasionsexperimente ist in Abb. 29 graphisch dargestellt. Es zeigte sich, dass die Aufnahme der *L. monocytogenes* $\Delta actAPRR2/3$ -Mutante in die Fibroblasten im Vergleich zu wildtypischen Bakterien zwar reduziert, jedoch nicht so deutlich reprimiert war wie im Falle des etwa um 80 % weniger invasiven *L. monocytogenes* A49-Stammes. Invasionsexperimente mit den Epithelzellen lieferten ein ähnliches Ergebnis (Abb. 29). Der *L. monocytogenes* A49-Stamm war in diesen Zellen fast überhaupt nicht mehr invasiv, während *L. monocytogenes* $\Delta actAPRR2/3$ seine Aufnahme durch diese normalerweise phagozytisch-inaktiven Zellen noch gut induzieren konnte. Die Invasionsrate lag für diesen Stamm bei 72 % von der des Wildtyps. Während die beobachteten Unterschiede im Invasionsverhalten zwischen WT und *L. monocytogenes* A49 statistisch signifikant waren ($p < 0,05$), waren die zwischen WT und *L. monocytogenes* $\Delta actAPRR2/3$ für beide Zelltypen jedoch statistisch nicht signifikant ($p > 0,05$).

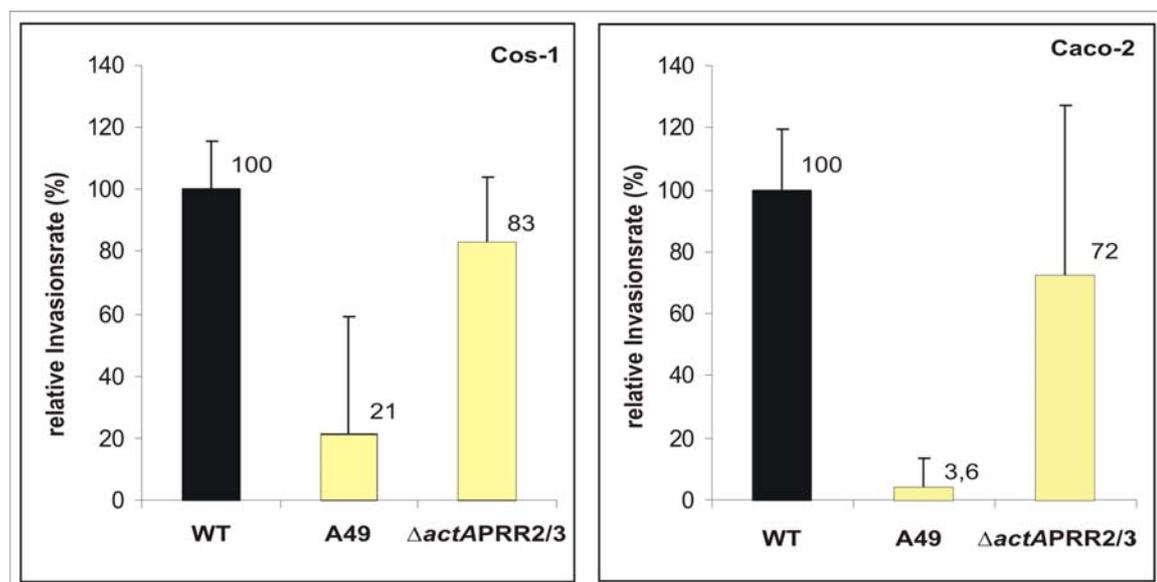


Abb. 29: Graphische Darstellung der Invasionsraten von *L. monocytogenes* A49 und *L. monocytogenes* $\Delta actAPRR2/3$ in Relation zum Wildtyp EGD.

Als Wirtszellen wurden Cos-1 Fibroblasten und Caco-2 Epithelzellen verwendet. Die Werte entsprechen der Invasionsrate in Relation zu der des Wildtyps EGD (= 100 %). Unterschiede im Invasionsverhalten zwischen Wildtyp und *L. monocytogenes* $\Delta actAPRR2/3$ zeigten sich im *t*-Test als nicht signifikant.

5.1.8.2 Replikation und Überleben von *L. monocytogenes* $\Delta actAPRR2/3$ im Zytoplasma von Wirtszellen

Die Fähigkeit von *L. monocytogenes* $\Delta actAPRR2/3$, im Zytoplasma der Wirtszelle zu überleben und zu replizieren, wurde in Cos-1 und Caco-2 Zellen untersucht. Die Zellen wurden mit *L. monocytogenes* EGD, A49 und *L. monocytogenes* $\Delta actAPRR2/3$ infiziert. Aufgrund der verringerten Invasivität von *L. monocytogenes* A49 für Wirtszellen wurde bei diesen Bakterien mit einer MOI = 25 infiziert. Die beiden anderen Stämme wurden mit einer MOI = 10 eingesetzt. Die Anzahl intrazellulärer Bakterien wurde 0, 1, 4 und 6 h p. i. durch Ausplattieren auf BHI-Agar bestimmt, das Ergebnis ist in Abb. 30 graphisch dargestellt. Wie anhand des Diagramms A ersichtlich, konnte zwischen den wildtypischen Listerien und den beiden Deletionsmutanten kein signifikanter Unterschied bezüglich des intrazellulären Überlebens in Cos-1 Zellen beobachtet werden. *L. monocytogenes* A49 und *L. monocytogenes* $\Delta actAPRR2/3$ replizierten beide wie der EGD-Stamm. Die Überlebensstudien in den Epithelzellen lieferten diesbezüglich ein ähnliches Ergebnis (Abb. 30 B). Obgleich *L. monocytogenes* EGD seine Aufnahme in Epithelzellen besser induzierte als die beiden Mutanten, konnte bezüglich des intrazellulären Überlebens und Replizierens keine signifikante Abweichung innerhalb der drei Stämme festgestellt werden.

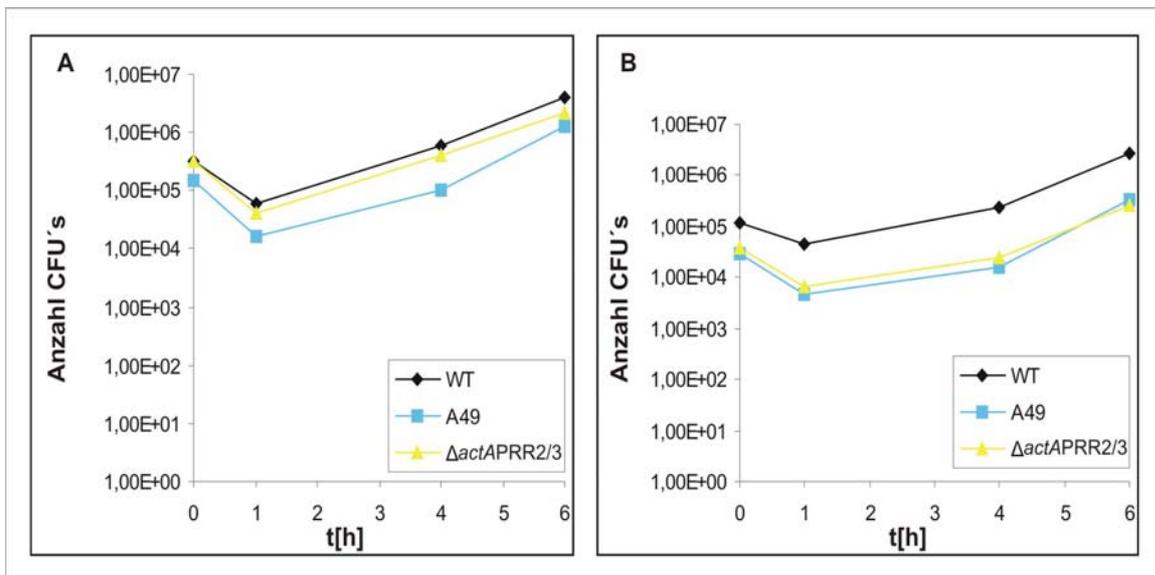


Abb. 30: Graphische Darstellung des intrazellulären Überlebens verschiedener *L. monocytogenes* Stämme in Cos-1 Fibroblasten (A) und Caco-2 Epithelzellen (B).

Parallel dazu wurden auf Deckgläsern kultivierte Fibroblasten und Epithelzellen ebenfalls mit diesen drei Stämmen infiziert. 1, 3 und 6 h p. i. wurde fixiert und mit einer frisch verdünnten Giemsa-Lösung angefärbt. Einige repräsentative Präparatausschnitte infizierter Cos-1 Zellen zu unterschiedlichen Zeiten p. i. sind in Abb. 31 dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, dass *L. monocytogenes* A49 (Abb. 31, B und E) im Zytoplasma der Zelle replizieren konnte, aufgrund der Deletion innerhalb von *actA* jedoch nicht mehr in der Lage war sich intrazellulär fortzubewegen und typische Mikrokolonien in der Nähe des Zellkerns ausbildete (Abb. 31 E, Pfeil). Bei mit *L. monocytogenes* $\Delta actAPRR2/3$ (Abb. 31 C und F)

infizierten Zellen konnten keine Mikrokolonien beobachtet werden. Es zeigte sich jedoch, dass diese Listerien im Gegensatz zum Wildtyp (Abb. 31 A und D) nicht gleichmäßig im Präparat verteilt waren, sondern sich zum Teil in kleinen Gruppen ansammelten (Abb. 31 F, Pfeile).

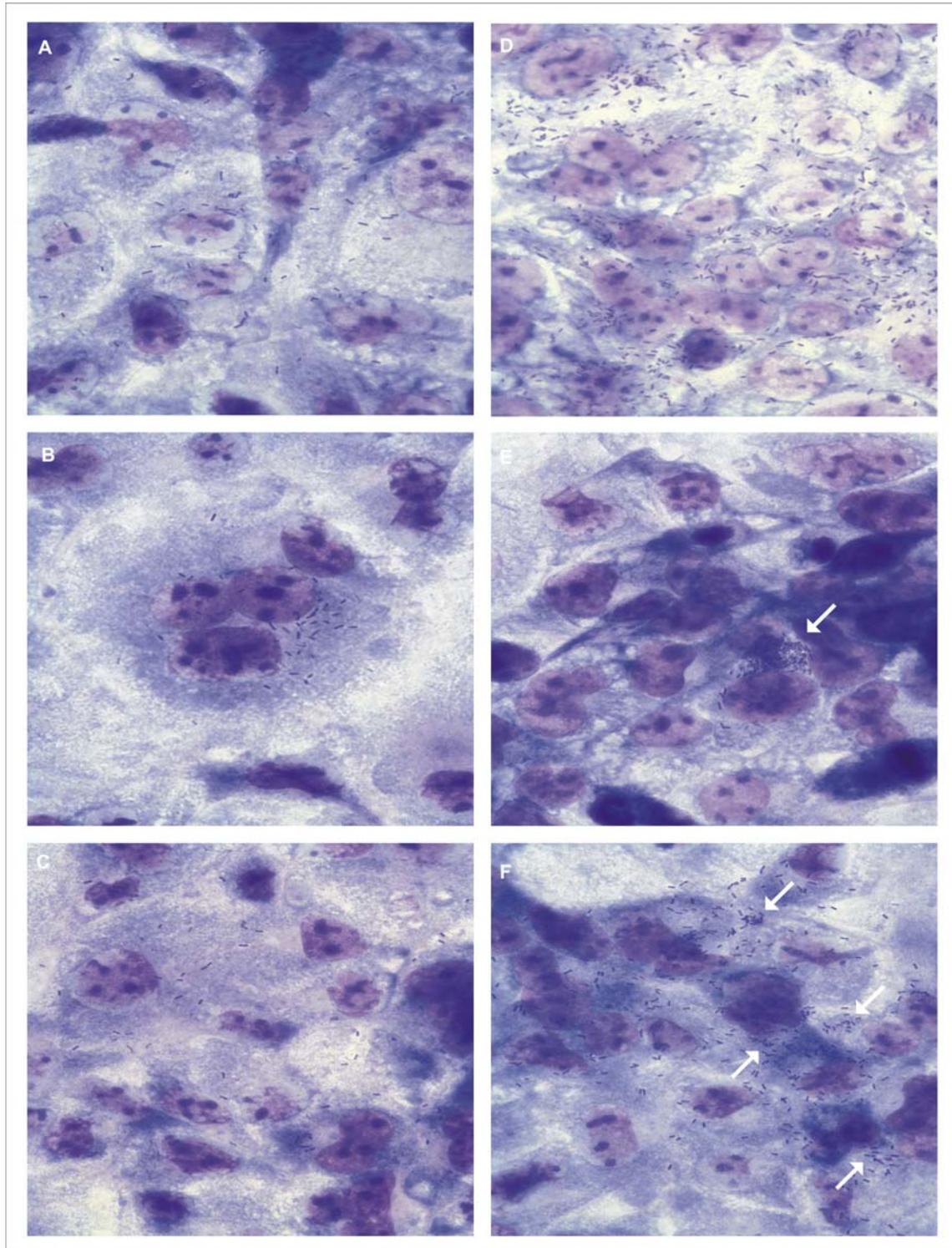


Abb. 31: Giemsa-Präparate *L. monocytogenes* EGD (A/D), A49 (B/E) und *L. monocytogenes* Δ actAPRR2/3 (C/F) infizierter Cos-1 Fibroblasten 3 h (A–C) und 6 h (D–F) p. i. bei 1000-facher Vergrößerung.

Es ist deutlich zu erkennen, dass *L. monocytogenes* A49 unbeweglich ist und sich nicht im Zytoplasma der Wirtszellen ausbreiten konnte. Dieser Stamm bildete typische Mikrokolonien (E,

Pfeil) in der Nähe des Zellkernes. *L. monocytogenes* $\Delta actAPRR2/3$ (C/F) konnte wie der Wildtyp (A/D) replizieren, die Ausbreitung in benachbarte Zellen erfolgte jedoch mit weniger Effizienz.

Diese Beobachtung ist auf die Deletion der PRR 2 und 3 zurückzuführen. Diese stellen Interaktionsstellen zu zellulären Proteinen dar, welche die Effizienz der Aktinpolymerisation erhöhen und somit die Fortbewegungsgeschwindigkeit der Listerien beeinflussen (Chakraborty *et al.*, 1995; Lasa *et al.*, 1997). In der lichtmikroskopischen Auswertung der Präparate wurde die durchschnittliche Anzahl an Bakterien pro Zelle ausgezählt und in Tabelle 2 zusammengefasst. Zusätzlich wurde noch der prozentuale Teil infizierter Wirtszellen berechnet.

Aufgrund ihrer Deletion innerhalb von *actA* konnte sich *L. monocytogenes* A49 nicht im Zellrasen ausbreiten. Dadurch nahm die Anzahl intrazellulärer Bakterien deutlich zu, während der prozentuale Anteil infizierter Wirtszellen im Laufe der Infektion gleich blieb.

	t [h] p. l.	EGD		A49		$\Delta actAPRR2/3$	
		Anteil inf. WZ	Bakterien/ Zelle	Anteil inf. WZ	Bakterien/ Zelle	Anteil inf. WZ	Bakterien/ Zelle
Cos-1	1	15 %	4	17 %	3	18 %	4
	3	26 %	20	19 %	20	26 %	18
	6	60 %	66	16 %	180	39 %	53
Caco-2	1	28 %	5	29 %	5	18 %	4
	3	51 %	40	25 %	97	31 %	47
	6	94 %	150	30 %	∞	81 %	173

Tab. 2: Prozentualer Anteil infizierter Wirtszellen und Anzahl Listerien/infizierter Wirtszelle 1-6 h p. l.

Aufgrund der Unbeweglichkeit der *actA*-Mutante *L. monocytogenes* A49 veränderte sich der Anteil infizierter Zellen nicht im Verlaufe der Infektion. Die *L. monocytogenes* $\Delta actAPRR2/3$ -Mutante konnte sich sowohl in Cos-1 als auch in den Epithelzellen innerhalb des Zellrasens ausbreiten und benachbarte Zellen infizieren.

L. monocytogenes $\Delta actAPRR2/3$ konnte ähnlich wie der Wildtyp innerhalb der infizierten Wirtszellen replizieren, breitete sich jedoch mit einer etwas geringeren Effizienz im Zellrasen aus.

5.1.8.3 Intra- und interzelluläre Bewegung von *L. monocytogenes* $\Delta actAPRR2/3$

Um zu überprüfen, ob die beobachtete herabgesetzte intra- und interzelluläre Motilität von *L. monocytogenes* $\Delta actAPRR2/3$ auf eine verminderte Aktinpolymerisation und Aktinschweifbildung zurückzuführen war, wurden Caco-2 Zellen mit diesem Stamm, sowie mit *L. monocytogenes* EGD als Positivkontrolle und dem *L. monocytogenes* A49-Stamm als Negativkontrolle infiziert. 4 Stunden p. l. wurden die Zellen fixiert, mit FITC-Phalloidin angefärbt und die Präparate unter einem Fluoreszenzmikroskop analysiert.

Es zeigte sich, dass *L. monocytogenes* A49 wie bereits beschrieben (Pfeuffer, 2000) aufgrund der Deletion innerhalb des *actA*-Gens nicht mehr in der Lage war, Aktin zu polymerisieren und sich zu bewegen (Abb. 32 B, Mittlere und rechte Spalte). Bakterien dieses Stammes wurden vom FITC-Phalloidin nicht angefärbt. Bei mit *L. monocytogenes* $\Delta actAPRR2/3$ infizierten Präparaten färbte FITC-

Phalloidin neben dem Aktinskelett auch das von den Bakterien polymerisierte zelluläre Aktin (Abb. 32 C, Mittlere und rechte Spalte). Die gebildeten Aktinschweife unterschieden sich hinsichtlich ihrer Länge nicht von denen wildtypischer Bakterien. Es waren in den Präparaten der *L. monocytogenes* $\Delta actAPRR2/3$ infizierten Zellen jedoch deutlich weniger Schweife aufzufinden als im Falle wildtypischer Bakterien. Die bereits festgestellte reduzierte interzelluläre Ausbreitung von *L. monocytogenes* $\Delta actAPRR2/3$ scheint daher nicht von der Fähigkeit, Aktin zu polymerisieren herzurühren sondern, wie in der Literatur von Lasa *et al.* beschrieben, der Polymerisierungsgeschwindigkeit zugrunde zu liegen (Lasa *et al.*, 1997).

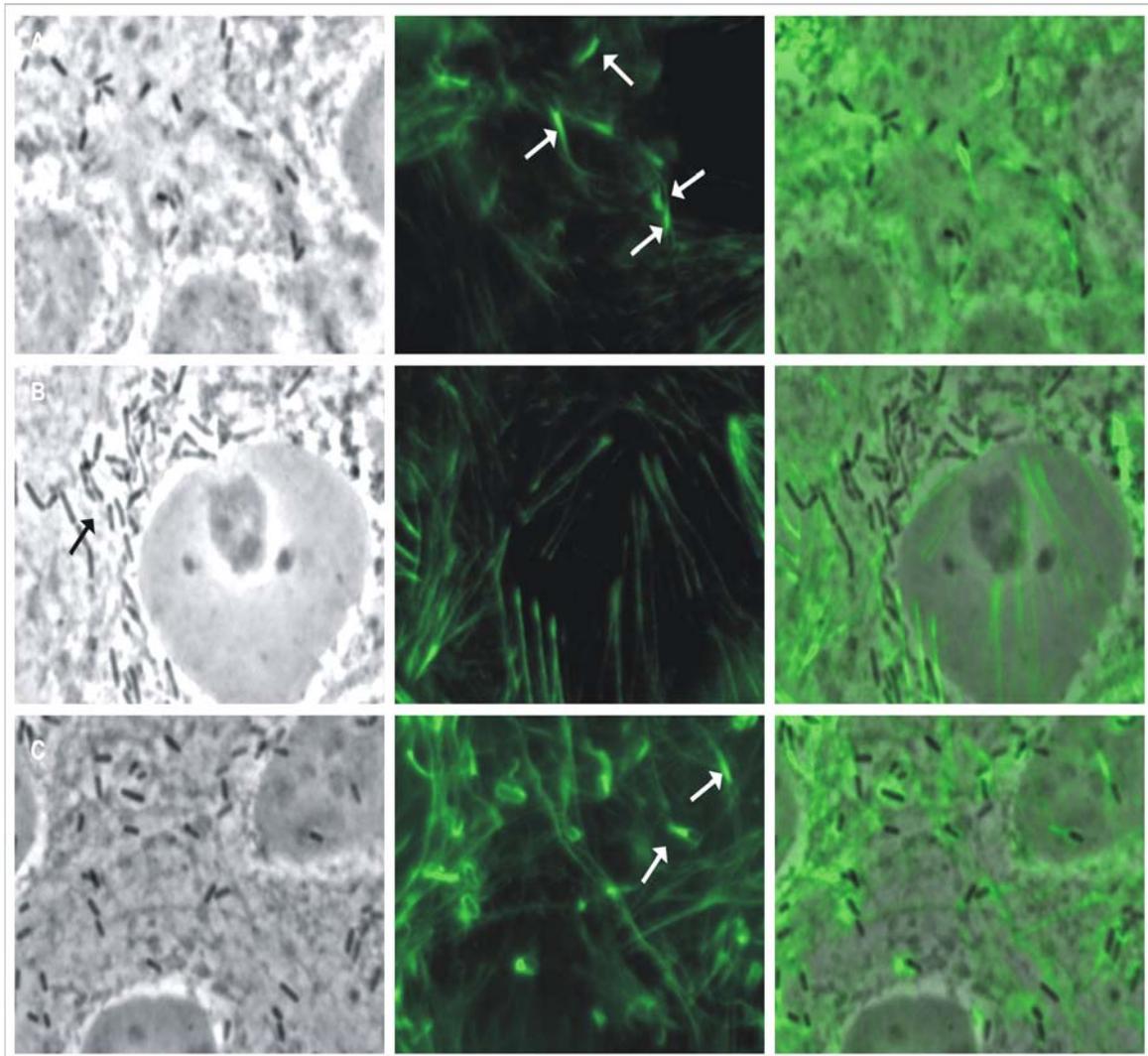


Abb. 32: FITC-Phalloidin-Färbung *L. monocytogenes* EGD (A), A49 (B) und *L. monocytogenes* $\Delta actAPRR2/3$ (C) infizierter Caco-2 Zellen bei 1000-facher Vergrößerung.

Die Aufnahmen einer Reihe zeigen den gleichen Bildausschnitt des gleichen Präparates, Ausschnitte in unterschiedlichen Reihen stammen von unterschiedlichen Präparaten. Linke Spalte: Phasenkontrastaufnahme. Mittlere Spalte: FITC-Phalloidin-Färbung in der Grünfluoreszenz. Rechte Spalte: Jeweilige Überlagerung der linken und mittleren Bildausschnitte. Es ist deutlich zu erkennen, dass die $\Delta actAPRR2/3$ -Mutante Aktin an die Oberfläche rekrutieren und Aktinschweife ausbilden konnte wie der Wildtyp. Im Präparat der *L. monocytogenes* A49 Mutante konnten keine Bakterien gefunden werden, die vom FITC-Phalloidin angefärbt wurden, obwohl die Bakterien im Phasenkontrast gut sichtbar sind (B, schwarzer Pfeil). Auf Aktinschweife ist mit weißen Pfeilen verwiesen.

Um die Ausbreitung von *L. monocytogenes* EGD und *L. monocytogenes* $\Delta actAPRR2/3$ im Zellrasen miteinander vergleichen zu können, wurden diese beiden Stämme mit dem P_{actA} -*gfp*-Plasmid (Dietrich *et al.*, 1998) transformiert. Das auf diesem Plasmid codierte GFP steht unter der Kontrolle des ActA-Promotors, welcher erst nach dem Entkommen der Listerien aus dem Phagosom und dem Eintreten in das Zytoplasma der Wirtszelle aktiviert wird und somit lebende Listerien grün fluoreszieren lässt. Caco-2 Epithelzellen wurden mit den beiden transformierten Stämmen infiziert und der Verlauf der Infektion über einen Zeitraum von 24 h mit einem inversen Fluoreszenzmikroskop überwacht und photographiert.

Intrazelluläre wildtypische Listerien hatten 24 h p. I. im Zellrasen große Infektionsfoci ausgebildet, die stark fluoreszierten (Abb. 33, links). Die Foci, die von *L. monocytogenes* $\Delta actAPRR2/3$ in der gleichen Zeit gebildet wurden, waren deutlich kleiner. Diese Beobachtung bestätigte das Ergebnis früherer Experimente (s. 5.1.8.2), wonach diese Mutante aufgrund ihrer Deletion innerhalb von *actA* eine reduzierte interzelluläre Motilität besitzt.

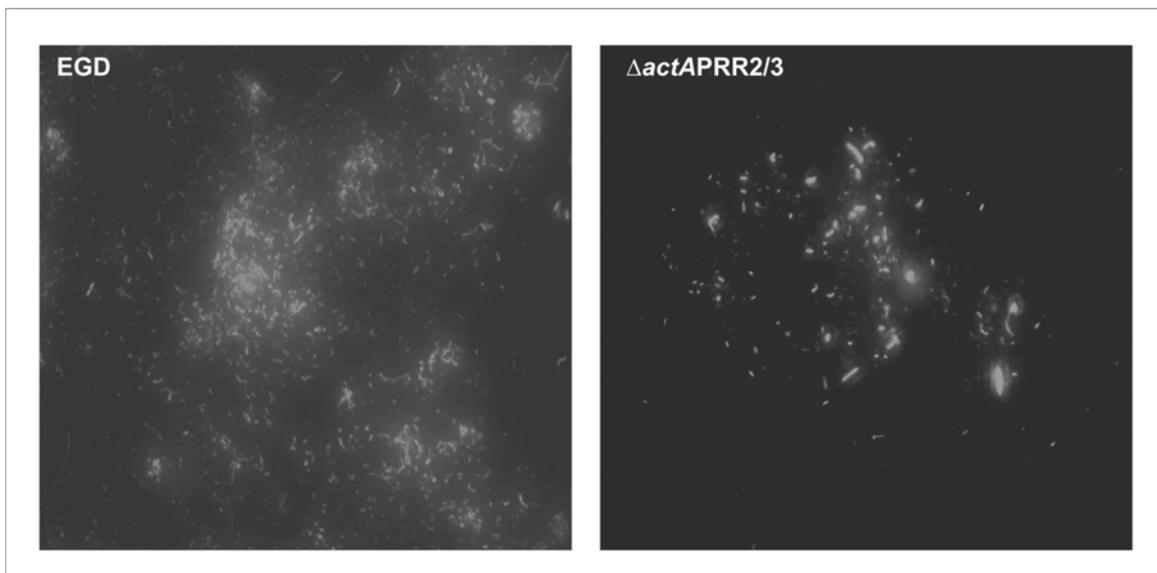


Abb. 33: Interzelluläre Ausbreitung von *L. monocytogenes* EGD- P_{actA} -*gfp* und *L. monocytogenes* $\Delta actAPRR2/3$ - P_{actA} -*gfp* in Caco-2 Epithelzellen 24 h p. I.

5.1.9 Immunfluoreszenzanalysen zur Untersuchung der Interaktion von Stathmin und intrazellulären Listerien

Über Immunfluoreszenzanalysen mit einem anti-Stathmin-Antikörper sollte bestätigt werden, dass durch die Deletion der Interaktionssequenz von ActA für die Bindung von LaXp180 auch Stathmin nicht mehr an die Oberfläche der Listerien rekrutiert wird. Hierzu wurden Cos-1 Fibroblasten mit *L. monocytogenes* EGD (MOI = 20), A49 (MOI = 50) und *L. monocytogenes* $\Delta actAPRR2/3$ (MOI = 20) infiziert und 4 h p. I. mit dem anti-Stathmin-Antikörper inkubiert. Der wildtypische Stamm sollte dabei als Positivkontrolle, der A49-Stamm als Negativkontrolle fungieren. Die Ergebnisse der Färbung sind in Abb. 34 dargestellt.

In den mit *L. monocytogenes* EGD infizierten Zellen wurden die Listerien wie erwartet vom anti-Stathmin-Antikörper angefärbt. Es konnte eine deutliche Kolokalisation von Stathmin mit der Bakterienoberfläche beobachtet werden (Abb. 34 A, rechte Spalte).

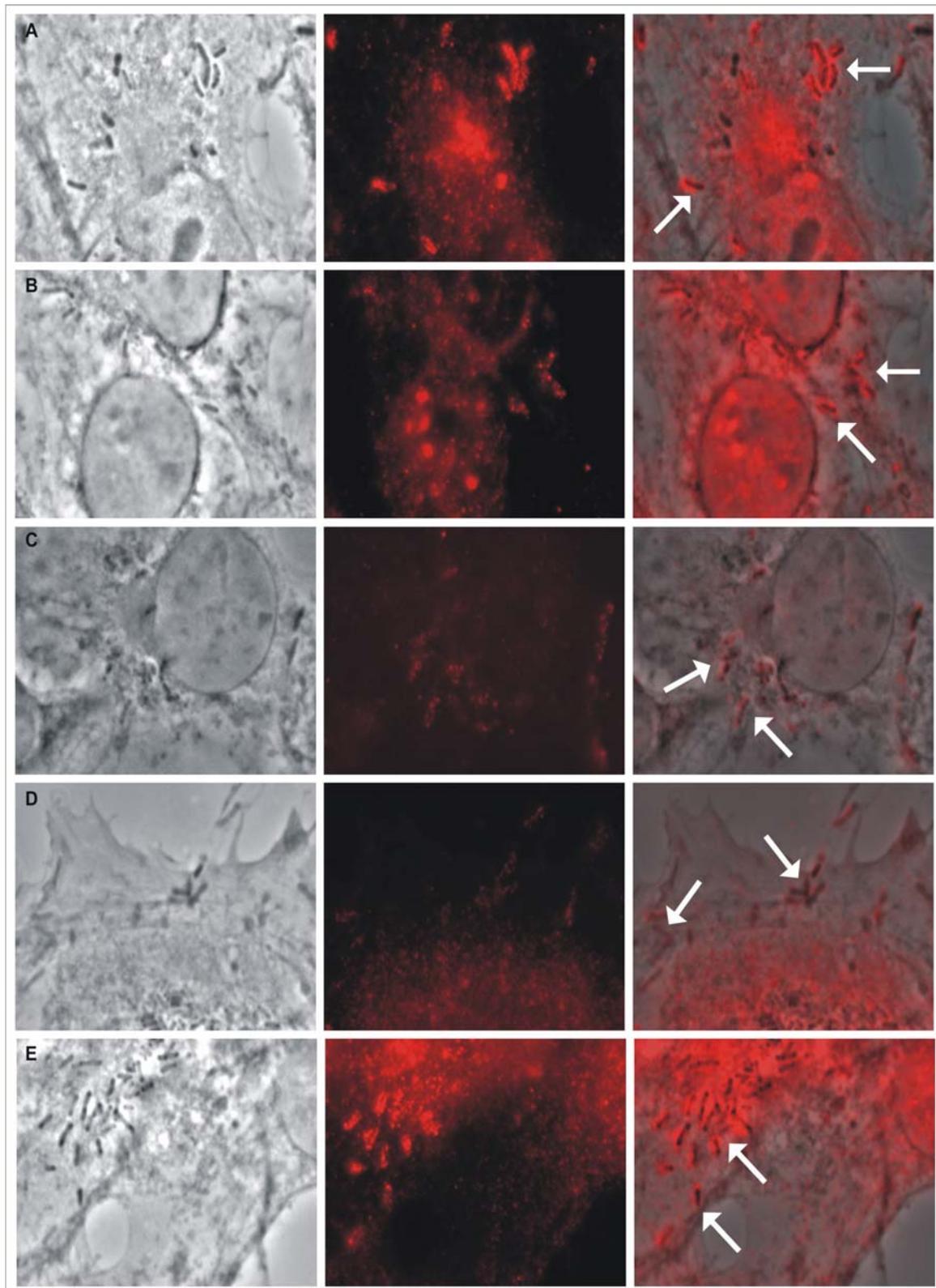


Abb. 34: Immunfluoreszenzanalyse zur intrazellulären Verteilung von Stathmin in mit verschiedenen *L. monocytogenes*-Stämmen infizierten Cos-1 Fibroblasten. Reihe in 1000-facher Vergrößerung. **A:** *L. monocytogenes* EGD. **B:** *L. monocytogenes* A49. **C:** *L. monocytogenes* $\Delta actAPRR2/3$. **D:** *L. monocytogenes* $\Delta actA1$ **E:** *L. monocytogenes* $\Delta 2$.

Die Aufnahmen einer Reihe zeigen jeweils den gleichen Bildausschnitt. Linke Spalte: Phasenkontrastaufnahme. Mittlere Spalte: anti-Stathmin-Färbung in der Rotfluoreszenz. Rechte Spalte: Überlagerung der entsprechenden Linken und mittleren Aufnahme. Bei jedem der verwendeten

Listerien-Stämme konnte eine Kolokalisation zwischen Bakterienoberfläche und zellulärem Stathmin beobachtet werden (Pfeile). Obwohl die zellulären und bakteriellen Strukturen in C und D nur sehr schwach vom Antikörper angefärbt wurden, ist eine deutliche Kolokalisation zwischen Stathmin und den Bakterien zu beobachten (Pfeile in der rechten Spalte).

In den mit *L. monocytogenes* A49 infizierten Zellen konnte jedoch wider Erwarten ebenfalls eine Kolokalisation zwischen intrazellulären Bakterien und Stathmin beobachtet werden (Abb. 34 B, rechte Spalte). Eine genaue Analyse der roten anti-Stathmin Färbung zeigte, dass die Bakterienoberfläche ungleichmäßig angefärbt war und, wie auch in den mit wildtypischen Bakterien infizierten Präparaten, die angefärbten Bakterien nicht gleichmäßig im Zellrasen verteilt waren, sondern sich auf bestimmte Bereiche beschränkten. Bei der *L. monocytogenes* $\Delta actA$ -PRR2/3-Mutante konnte ebenfalls eine Rekrutierung von Stathmin an die bakterielle Oberfläche beobachtet werden. Obwohl das Präparat insgesamt nur sehr schwach vom anti-Stathmin-Antikörper angefärbt wurde, war eine deutliche Kolokalisation zwischen Listerien und der Rotfluoreszenz zu beobachten (Abb. 34 C, rechte Spalte).

Bei *L. monocytogenes* A49 und *L. monocytogenes* $\Delta actAPRR2/3$ sind jeweils die Bereiche von ActA deletiert, die für eine Interaktion der beiden Proteine ActA und LaXp180 als notwendig identifiziert worden sind (Bauer *et al.*, 2003). Da bei diesen Stämmen dennoch eine Kolokalisation von Stathmin mit der bakteriellen Oberfläche beobachtet werden konnte wurde spekuliert, dass für die Rekrutierung von Stathmin an die Listerien neben den PRR noch weitere Bereiche von ActA verantwortlich sein könnten. Cos-1 Zellen wurden daraufhin mit *L. monocytogenes* $\Delta actA1$ infiziert. Dieser Stamm synthetisiert aufgrund einer Deletion innerhalb von *actA* ein ActA-Protein, dem bis auf einige wenige N- und C-terminale AS die komplette Sequenz fehlt. Zusätzlich wurden Zellen noch mit dem *L. monocytogenes* $\Delta 2$ -Stamm infiziert, dem das komplette *actA*-Gen fehlt (Hauf *et al.*, 1997). Mit diesem Stamm hatten Pfeuffer *et al.* keine Kolokalisation zwischen Stathmin und intrazellulären Bakterien mehr nachweisen können (Pfeuffer *et al.*, 2000). Wie jedoch anhand der Abbildungen 34 D und E, rechte Spalten ersichtlich, konnte auch in mit diesen Bakterien infizierten Zellen überraschenderweise eine Rekrutierung von Stathmin an die Oberfläche der intrazellulären Listerien beobachtet werden. Die mit der $\Delta 2$ -Mutante infizierten Zellen unterschieden sich, abgesehen von der schwächeren Fluoreszenzintensität, nur hinsichtlich der von den Bakterien gebildeten Mikrokolonien von den mit dem Wildtyp infizierten Präparaten. Der anti-Stathmin-Antikörper färbte wie auch hier die gesamte Oberfläche der Bakterien an (vgl. Abb. 34 A und E, Mittlere und rechte Spalten).

Um unspezifische Bindungen der verwendeten Antikörper ausschließen zu können, wurden verschiedene Negativkontrollen durchgeführt. Zunächst wurden die für die Färbungen verwendeten *L. monocytogenes* Stämme in BHI-Medium gezogen und mit einer 1:200 Verdünnung des anti-Stathmin-Antikörpers und einer 1:20 Verdünnung des CyTM3-konjugierten Sekundärantikörpers inkubiert. In keinem der Präparate wurden die Bakterien vom anti-Stathmin-Antikörper und dem Sekundärantikörper angefärbt. Es bestand demnach keine Kreuzreaktion zwischen den Antikörpern und listeriellen Proteinen (Abb. 35).

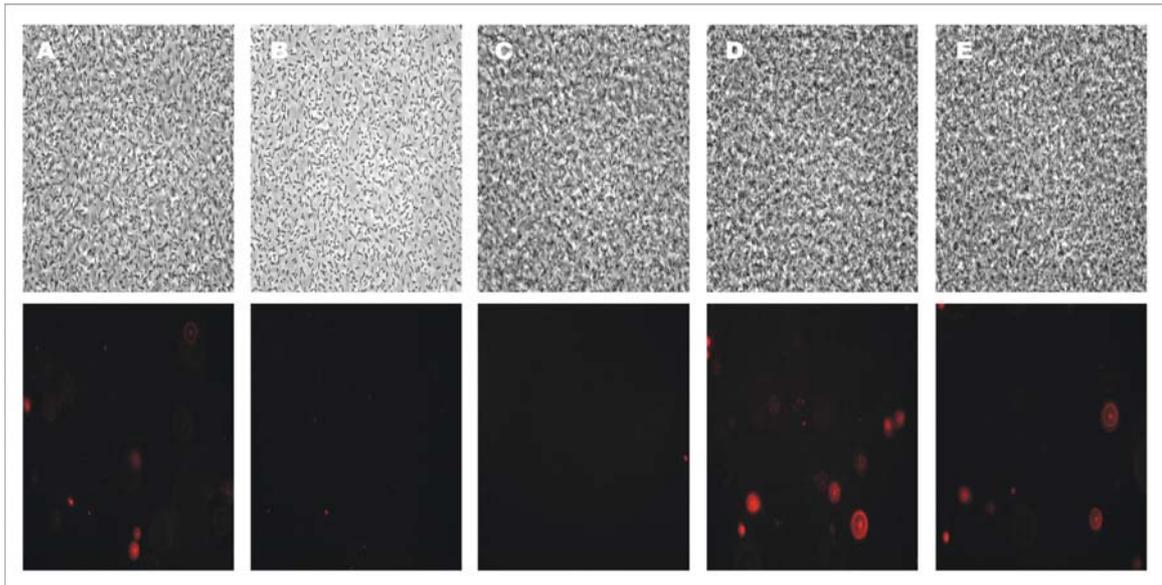


Abb. 35: Negativkontrolle (1000-fach vergrößert).

L. monocytogenes EGD (A), A49 (B), $\Delta actAPRR2/3$ (C), $\Delta actA1$ (D) und *L. monocytogenes* $\Delta 2$ (E) nach der Inkubation mit dem anti-Stathmin-Antikörper mit einer 1:20 Verdünnung des CyTM3-gekoppelten Ziege-anti-Kaninchen-Antikörpers inkubiert und nach langer Belichtungszeit photographiert. Die Aufnahmen einer Spalte zeigen jeweils den gleichen Bildausschnitt im Phasenkontrast (obere Reihe) und in der Rotfluoreszenz (untere Reihe).

Um zu überprüfen ob die verwendeten Bakterienstämme die gewünschte Mutation noch enthielten wurden sie mittels geeigneter Primer in einer PCR auf die Korrektheit ihrer in frame Deletionen überprüft. Das Ergebnis ist in Abb. 36 dargestellt. Die Primer wurden so gewählt, dass sie innerhalb eines spezifischen Bereiches der genomischen Sequenz von *actA* binden sollten. Die erhaltenen ActA-spezifischen PCR-Produkte liefen wie erwartet für den wildtypischen Stamm (Abb. 36, Spur 2) auf der Höhe von 1161 bp, für A49 (Spur 3) bei 321 bp und für *L. monocytogenes* $\Delta actAPRR2/3$ (Spur 5) auf der Höhe von 951 bp. *L. monocytogenes* $\Delta actA1$ (Spur 1) und *L. monocytogenes* $\Delta 2$ (Spur 4) lieferten wie erwartet aufgrund ihrer Deletionen mit den verwendeten Primern kein *actA*-spezifisches Produkt.

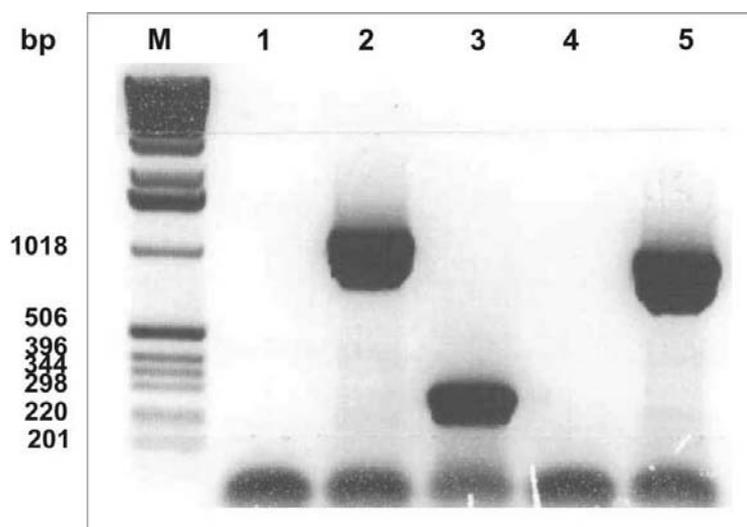


Abb. 36: PCR mit ActA-spezifischen Primern und Lysaten verschiedener *L. monocytogenes* (*L. m.*) Stämme als Template.

Spur 1: *L. m.* $\Delta actA1$; 2: *L. m.* EGD; 3: *L. m.* A49; 4: *L. m.* $\Delta 2$; 5: *L. m.* $\Delta actAPRR2/3$. Die Größe der erhaltenen PCR-Produkte stimmt mit den theoretischen Größen überein. **M:** Marker. **bp:** Basenpaare

Es wurde außerdem noch überprüft, ob der CyTM3-gekoppelte Sekundärantikörper unspezifisch mit zellulären Strukturen interagiert. Nicht-infizierte Fibroblasten wurden nach der Fixierung mit Methanol mit einer 1:600 Verdünnung des Sekundärantikörpers inkubiert. Färbungen der Zellen blieben jedoch aus was bestätigte, dass der Sekundärantikörper alleine nicht mit zellulären Strukturen reagiert (Abb. 37).

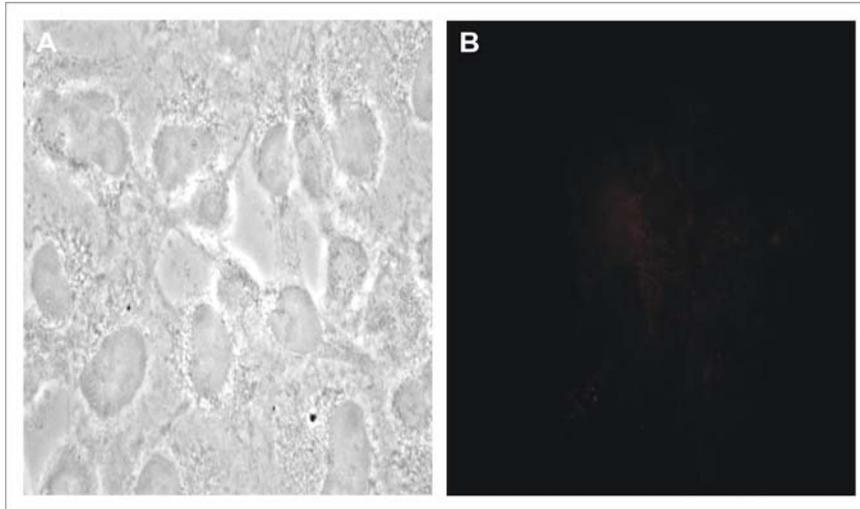


Abb. 37: Negativkontrolle (1000-fache Vergrößerung). **A:** Phasenkontrast. **B:** Fluoreszenzaufnahme. Cos-1 Fibroblasten wurden mit einer 1:600 Verdünnung des CyTM3-konjugierten Antikörpers inkubiert und mit relativ langer Belichtungszeit photographiert. Es wurden keine zellulären Strukturen gefärbt.

Da diese Kontrollen mögliche Fehlerquellen ausschlossen, kann aus den hier erhaltenen Ergebnissen der Immunfluoreszenzfärbungen infizierter Fibroblasten gefolgert werden, dass Stathmin entgegen der Erwartung aufgrund von Angaben in der Literatur (Pfeuffer *et al.*, 2000) ActA-unabhängig an intrazelluläre Listerien rekrutiert wird.

5.2 Konstruktion und Charakterisierung von *L. monocytogenes* Mutanten mit in frame Deletionen in individuellen Response Regulatorgenen.

5.2.1 *In silico* Analyse der Zweikomponentensysteme von *L. monocytogenes*

Die erst vor wenigen Jahren veröffentlichte genomische Sequenz von *L. monocytogenes* EGDe ermöglichte es, die bisher nicht näher charakterisierten listeriellen TCS durch computergesteuerte *in silico* Analyse genauer zu betrachten. Diese Analyse wurde von Frau PD Dr. D. Beier (Lehrstuhl für Mikrobiologie, Universität Würzburg) durchgeführt und zur Verfügung gestellt (Tab. 3). Die Klassifizierung der Histidinkinasen erfolgte nach der Methode von Fabret *et al.* (1999) aufgrund der den konservierten Histidin-Rest flankierenden Sequenzen der Phosphotransferdomäne. Bis auf einige wenige Ausnahmen wurden alle Kinasen der Gruppe IIIA zugeordnet. Lmo2011 ist eine Kinase der Klasse I, Lmo1021 gehört zur Klasse II HK. CheA, AgrC und Lmo1173 ließen sich hingegen keiner Klasse zuordnen. Während AgrC im Vergleich zu den anderen HK deutlich mehr TMD aufweist, sind CheA und Lmo1173 rein zytoplasmatische Histidin Kinasen, die keine TMD besitzen. Im Falle von CheA wurde die Signalübertragung schon eingehend untersucht (Bilwes *et al.*, 1999). Der Aktivierungsmechanismus für Lmo1173 ist, wie auch für einige andere listerielle HK, noch unbekannt.

Die Response Regulatoren wurden nicht aufgrund der den Aspartat-Rest tragenden Receiverdomäne, sondern aufgrund der Homologie ihrer Outputdomäne zu Outputdomänen bereits beschriebenen RR klassifiziert (Fabret *et al.*, 1999). Wie anhand der Tabelle ersichtlich sind bis auf *lmo2515 (degU)* alle listeriellen RR-Gene genetisch mit einem ORF verknüpft, der für eine HK kodiert. Die Outputdomänen der meisten listeriellen RR weisen DNA-Bindungscharakter vom *E. coli* OmpR-Typ auf. OmpR ist Bestandteil des OmpR/EnvZ TCS von *E. coli* und an der Osmoregulation beteiligt. Die Outputdomäne von DegU weist wie die von Lmo1022 ein DNA-Bindungsmotiv vom NarL-Typ auf. NarL reguliert in *E. coli* zusammen mit seiner HK die anaerobe Atmung als Antwort auf Nitrat oder Nitrit.

Histidin Kinase	HK-Gruppe	TMD (extrazytoplasmatische Loops)	Response Regulator	Output Domäne
AgrC (Lmo0050)		6	AgrA (Lmo0051)	LytTr
YycG (Lmo0288)	IIIA	2 (158)	YycF (Lmo0287)	OmpR
CheA (Lmo0692)		-	CheY (Lmo0691)	
Lmo1021	II	2 (22)	Lmo1022	NarL
Lmo1061	IIIA	2 (125)	Lmo1060	OmpR
Lmo1173		-	Lmo1172	ANTAR
LisK (Lmo1378)	IIIA	2 (144)	LisR (Lmo1377)	OmpR
Lmo1508	IIIA	2 (142)	Lmo1507	OmpR
Lmo1741	IIIA	2 (10)	Lmo1745	OmpR
ResE (Lmo1947)	IIIA	2 (146)	ResD (Lmo1948)	OmpR
Lmo2011	I	2 (252)	Lmo2010	AraC-HTH
CesK (Lmo2421)	IIIA	2 (40)	CesR (Lmo2422)	OmpR
PhoR (Lmo2500)	IIIA	2 (147)	PhoP (Lmo2501)	OmpR
??			DegU (Lmo2515)	NarL
Lmo2582	IIIA	2 (137)	Lmo2583	OmpR
KdpD (Lmo2679)	IIIA	4	KdpE (Lmo2678)	OmpR

Tab. 3: *L. monocytogenes* TCS Proteine und deren *in silico* Analyse (modifiziert aus Williams *et al.*, 2005).

Die Einteilung der HK und RR basiert auf der Klassifizierung der TCS Proteine von *B. subtilis* nach Fabret *et al.*, (Fabret *et al.*, 1999). Die Transmembrandomänen wurden über den "DAS Transmembrane Prediction server" (<http://www.sbc.su.se/~miklos/DAS/tmdas.cgi>) ermittelt. Die Größe der extrazytoplasmatischen Loops bei Proteinen mit 2 TMD in ihrem N-Terminus ist in Klammern mit angegeben.

Lmo2010 enthält eine extrem lange Outputdomäne mit einem Transkriptionsaktivierenden AraC Helix-turn-Helix Motiv an seinem C-Terminus. Die Outputdomäne von Lmo1172 besitzt keinen DNA-Bindungscharakter, sondern das RNA-Bindungsmotiv ANTAR. Dieses Motiv findet sich auch beim Ami R-Protein von *Pseudomonas aeruginosa* und bei anderen Transkriptions-antiterminationsregulatorischen Proteinen (O'Hara *et al.*, 1999; Shu *et al.*, 2002). CheY bildet eine Ausnahme zu den übrigen RR, da er lediglich aus der phosphorylierbaren Receiver Domäne besteht. Auch wirkt CheY nicht als Transkriptionsaktivator bzw. Regulator wie die meisten der listeriellen RR, sondern interagiert direkt mit seinen Zielproteinen, den Mot-Proteinen der Flagelle.

5.2.2 Konstruktion von Deletionsmutanten der Response Regulatoren Gene in *L. monocytogenes* EGD

Um den Einfluss der einzelnen Zweikomponentensysteme auf die Virulenz von *L. monocytogenes* genauer untersuchen zu können wurden von Frau S. Bauer (Lehrstuhl für Mikrobiologie, Universität Würzburg) Mutanten des Wildstammes Sv1/2a EGD konstruiert, die große in frame Deletionen in den individuellen Response Regulatoren Genen tragen.

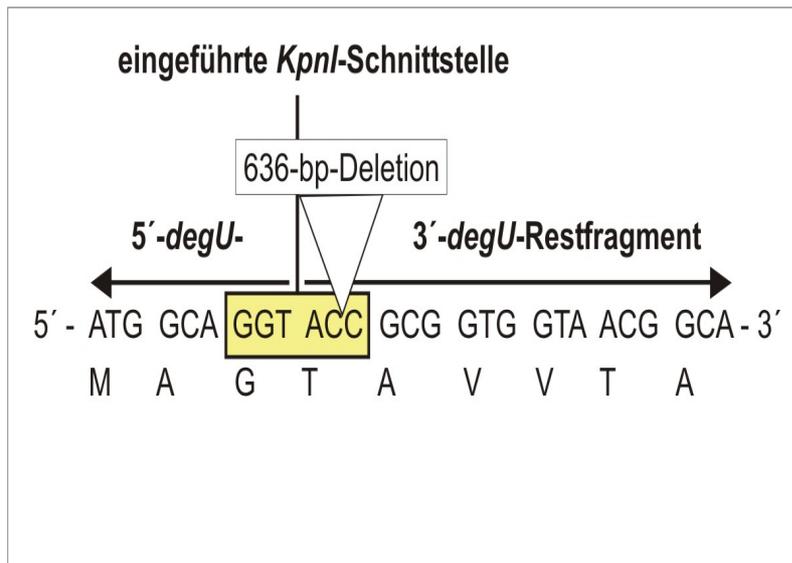


Abb. 38: Nukleinsäuresequenzausschnitt des $\Delta degU$ -Gens. Die 636 bp in frame Deletion im *degU*-Gen führte zu keiner Leserasterverschiebung. An der Übergangsstelle zwischen dem 5'- und 3'-terminalen Fragment wurde eine *KpnI*-Schnittstelle (gelber Kasten) eingeführt.

Mit der unter 4.9 beschriebenen Methode der Allelaustausch-Mutagenese konnten bei 15 der 16 listeriellen Response Regulatoren Genen bis auf ein paar Basentriplets fast die komplette kodierende Region deletiert werden (Abb. 38; Tab. 4). Eine Ausnahme hierzu bildeten *Imo1022* und *Imo2010*. Bei diesen beiden Genen musste aus klonierungstechnischen Gründen ein größerer Teil des ORFs bestehen bleiben. Wie auch schon bei Kallipolitis *et al.* (2003) beschrieben war es auch im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich, im Gen für *YycF* (*Lmo0287*), welches homolog ist zum essentiellen *yycF* von *B. subtilis*, eine in frame Deletion einzuführen.

deletiertes Gen	verbleibender ORF (AS)
<i>agrA</i> (<i>Imo0051</i>)	MLP <u>G</u> TV Stop
<i>yycF</i> (<i>Imo0287</i>)	Keine Mutante erhalten
<i>cheY</i> (<i>Imo0691</i>)	ML <u>G</u> TK Stop
<i>Imo1022</i>	MIKVLVDDHEMVRIGVSAYLSVQDDMEVV <u>G</u> TK Stop
<i>Imo1060</i>	ME <u>G</u> TE Stop
<i>Imo1172</i>	MTGMN <u>G</u> RV <u>P</u> Stop
<i>lisR</i> (<i>Imo1377</i>)	M <u>N</u> G <u>T</u> T Stop
<i>Imo1507</i>	M <u>K</u> G <u>T</u> TVRGVGYKFD <u>E</u> T <u>E</u> Stop
<i>Imo1745</i>	M <u>V</u> G <u>T</u> E Stop
<i>resD</i> (<i>Imo1948</i>)	M <u>S</u> G <u>T</u> D Stop
<i>Imo2010</i>	MLKIVLVDD <u>E</u> PLILK <u>G</u> LESIIPEFEQSIEIIGTAKNGAVALDLFANQEVDVLL TDIEMPVMNGLEILID <u>E</u> WKKRQPATKTIVLSGFEDFHYYV <u>K</u> RGLSAGIENY LLKPLNEQELK <u>E</u> T <u>L</u> IQIEKKQMTDSVIP <u>R</u> G <u>T</u> Stop
<i>cesR</i> (<i>Imo2422</i>)	MT <u>G</u> T <u>I</u> Stop
<i>phoP</i> (<i>Imo2501</i>)	M <u>V</u> G <u>T</u> GFGYKM <u>E</u> N <u>V</u> K Stop

<i>degU</i> (<i>Imo2515</i>)	MAGTAVVTAIKHGWVYIR Stop
<i>Imo2583</i>	MKGTR Stop
<i>kdpE</i> (<i>Imo2678</i>)	MNSKRLVLIVEDEDGISKGT Stop

Tab. 4: Übersicht über die verbleibenden ORFs und die 5'-3'-Übergangsstellen im deletierten Bereich der einzelnen in frame Deletionsmutanten.

Bei den unterstrichenen AS handelt es sich um klonierungstechnisch eingeführte Aminosäuren. In *yycF* (*Imo0287*) konnte keine in frame Deletion eingeführt werden.

5.2.3 Untersuchungen zur Replikation der *L. monocytogenes* Δ TCS RR-Mutanten in BHI-Medium unter verschiedenen Bedingungen

Bevor die konstruierten Deletionsmutanten im Zellkultursystem mit *L. monocytogenes* EGD verglichen wurden, wurden sie zunächst auf ihr extrazelluläres *in vitro* Verhalten untersucht. Ihr Wachstum wurde zunächst in Flüssigkulturen untersucht. Hierzu wurden Übernachtskulturen der einzelnen Stämme 1:50 verdünnt und auf einem Schüttler bei unterschiedlichen Temperaturen inkubiert. Die optische Dichte der Kulturen wurde in regelmäßigen Abständen über einen Zeitraum von 9 h und erneut nach 24 h im Klett-Photometer bestimmt und eine Wachstumskurve für jeden Stamm erstellt. Es zeigte sich, dass unter Standard-Bedingungen in BHI-Medium bei 37° C kein Unterschied im Wachstum zwischen wildtypischen Listerien und den einzelnen Δ TCS RR-Mutanten bestand. Bei Temperaturen von 20° C und 43° C konnte ebenfalls kein Unterschied in den Verdoppelungszeiten zwischen WT und den individuellen Deletionsmutanten aufgezeigt werden. Die Zugabe von 9 % NaCl, 0,025 % H₂O₂ oder ein Absenken des pH-Wertes auf 5,5 hatte ebenfalls keinen Einfluss auf die Replikation der einzelnen Δ TCS RR-Mutanten, ihr Wachstum unterschied sich nicht von dem des Wildtyps (Tab. 5). Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass keines der Zweikomponentensysteme eine signifikante Rolle für das Wachstum der Listerien in einem Temperaturbereich von 20° C - 43° C und unter den induzierten Stress-Bedingungen bei 37° C spielt.

<i>L. m.</i>	37°C *	20°C *	43°C *	37°C + NaCl *	37°C + H ₂ O ₂ *	37°C pH 5.5 *	37°C + EtOH	37°C+ KNO ₃ , anaerob
Δ <i>agrA</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
Δ <i>cheY</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
Δ <i>Imo1022</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
Δ <i>Imo1060</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
Δ <i>Imo1172</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
Δ <i>lisR</i>	+	+	+	+	+	+	++	+
Δ <i>Imo1507</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
Δ <i>Imo1745</i>	+	+	+	+	+	+	-	+
Δ <i>resD</i>	+	+	+	+	+	+	-	+
Δ <i>Imo2010</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
Δ <i>cesR</i>	+	+	+	+	+	+	++	+
Δ <i>phoP</i>	+	+	+	+	+	+	-	+
Δ <i>degU</i>	+	+	+	+	+	+	k. W.	+
Δ <i>Imo2583</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
Δ <i>kdpE</i>	+	+	+	+	+	+	+	+

Tab. 5: Übersicht über die *in vitro* Wachstumscharakteristika der einzelnen *L. monocytogenes* Δ TCS RR-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp.

Ergebnisse

Übernachtskulturen der Stämme wurden 1:50 im entsprechenden Medium verdünnt und, sofern nicht anders angegeben, bei 37° C inkubiert. In Zeitintervallen von jeweils einer Stunde wurde die optische Dichte im Klettphotometer bzw. im Photometer bei OD_{600nm} gemessen. *L. m.*: *L. monocytogenes*. +: Gewachsen wie Wildtyp. -: Wachstum langsamer als WT. ++: Wachstum besser als WT. k. W.: Kein Wachstum. H₂O₂-Konzentration: 0,025 %. NaCl-Konzentration: 9 %. EtOH-Konzentration: 5 %. KNO₃-Konzentration: 0,2 %. Das Sternchen in der Kopfzeile der Tabelle verweist auf Experimente, die von Frau S. Bauer (Lehrstuhl für Mikrobiologie, Universität Würzburg) durchgeführt und zur Verfügung gestellt wurden.

Unter Zugabe von 5 % Ethanol ins Medium zeigte sich im Vergleich zum Wildtyp bei einigen der TCS-Deletionsmutanten ein verändertes Wachstum (Abb. 39). Verglichen mit dem Wachstum wildtypischer Listerien hatte der Alkohol einen hemmenden Effekt auf das Wachstum der Stämme *L. monocytogenes* $\Delta resD$, $\Delta phoP$ und *L. monocytogenes* $\Delta 1745$. Die $\Delta degU$ -Mutante konnte unter diesen Bedingungen fast gar nicht wachsen. Im Gegensatz dazu wirkte sich die Anwesenheit von 5 % EtOH positiv auf das Wachstumsverhalten von *L. monocytogenes* $\Delta cesR$ und *L. monocytogenes* $\Delta lisR$ aus. Beide Stämme wuchsen signifikant besser als der Wildtyp. Die übrigen *L. monocytogenes* ΔTCS RR-Mutanten verhielten sich jedoch auch unter diesen Bedingungen bezüglich der Replikation wie der Wildtyp, stellvertretend für diese ist der Deletionsstamm *L. monocytogenes* $\Delta 1060$ mit im Diagramm dargestellt.

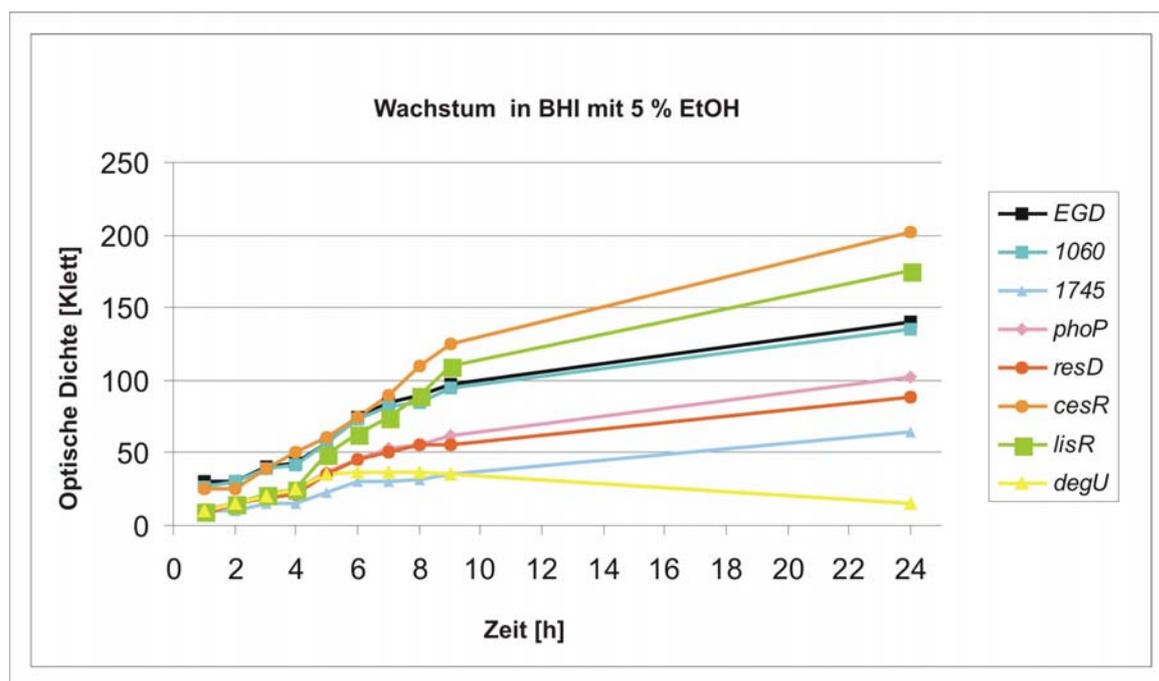


Abb. 39: Graphische Darstellung des Wachstums einiger *L. monocytogenes* ΔTCS RR-Mutanten in BHI mit 5 % EtOH.

Übernachtskulturen wurden 1:50 verdünnt und unter aeroben Bedingungen bei 37° C in BHI mit 5 % EtOH kultiviert. Die optische Dichte wurde in Zeitintervallen von jeweils einer Stunde im Klettphotometer gemessen. Zur besseren Übersicht sind neben *L. monocytogenes* EGD und *L. monocytogenes* $\Delta 1060$ nur die ΔTCS RR-Mutanten dargestellt, die im Vergleich zum EGD ein verändertes Wachstumsverhalten in Anwesenheit des Alkohols aufzeigten. Die *L. monocytogenes* $\Delta 1060$ -Mutante steht stellvertretend für die ΔTCS RR-Mutanten, die sich wie der Wildtyp verhielten.

In *B. subtilis* ist das Zweikomponentensystem ResDE durch die Aktivierung des Gens *fnr* an der Regulation der Nitrat-Atmung unter anaeroben Bedingungen beteiligt. Um zu überprüfen, ob *L. monocytogenes* unter anaeroben Bedingungen

in Anwesenheit von Nitrat ebenfalls Nitratatmung durchführt und somit das TCS ResD/E eine ähnliche Rolle spielen könnte wie bei *B. subtilis*, wurde mit über Nacht anaerob gewachsenen Kulturen das Wachstumsverhalten der einzelnen Stämme unter anaeroben Bedingungen in Gegenwart von 0,2 % KNO_3 überwacht. Die ΔTCS RR-Mutanten Stämme wuchsen zwar insgesamt unter anaeroben Bedingungen deutlich langsamer als unter aeroben, es konnte jedoch kein Unterschied im Wachstumsverhalten zu wildtypischen Listerien beobachtet werden. Auch die *resD*-Deletionsmutante zeigte kein verändertes Wachstum (Tab. 5).

5.2.4 Antibiotikasensitivitätstest

Für das Zweikomponentensystem VanR/S konnte gezeigt werden, dass es in *Enterococcus spp.* eine Resistenz gegen das Antibiotikum Vancomycin vermittelt, indem es die Expression von Genen kontrolliert, die für modifizierte Zellwandproteine kodieren (Arthur und Quintiliani, 2001). Kallipolitis *et al.* konnten zeigen, dass das listerielle Homolog zu VanR/S, CesR/K, ebenfalls an der Vermittlung von Resistenz gegen Vancomycin und Antibiotika der β -Lactam-Familie beteiligt ist (Kallipolitis *et al.*, 2003). Um zu überprüfen, ob noch weitere der listeriellen Zweikomponentensysteme an der Regulation von Genen beteiligt sind, die eine Toleranz gegen Antibiotika vermitteln, wurde die Sensitivität von *L.*

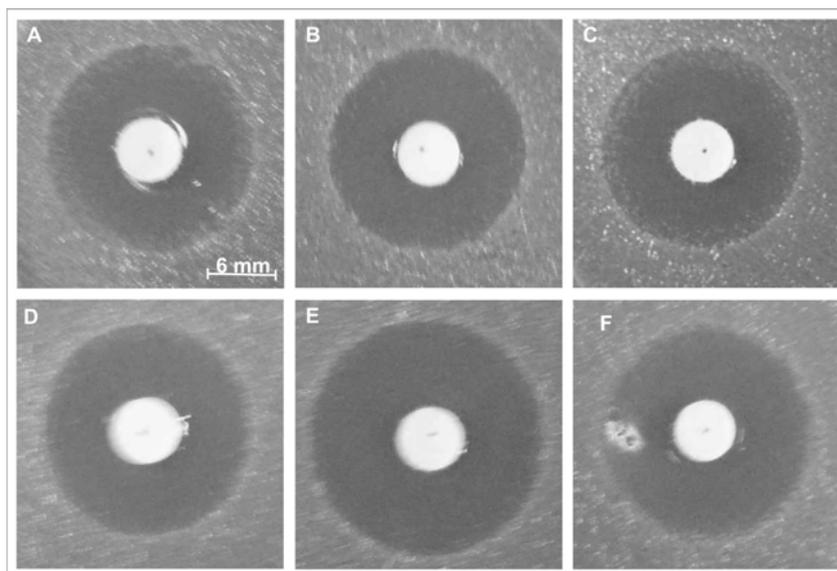


Abb. 40: Antibiotika-sensitivitätstest.

Hier sind die Hemmhöfe von *L. monocytogenes* EGD (A), ΔcesR (B), ΔlisR (C), ΔdegU (D), ΔresD (E) und *L. monocytogenes* ΔkdpE (F) dargestellt. Die Aufnahmen stammen von einer Digital-kamera.

monocytogenes EGD und den ΔTCS RR-Mutanten gegen verschiedene Antibiotika in Agar Diffusions-Assays miteinander vergleichen. Abbildung 40 zeigt stellvertretend einige Ergebnisse eines Diffusions-Assays, bei dem die einzelnen Mutanten im Vergleich zu *L. monocytogenes* EGD auf ihre Sensitivität für Gentamycin getestet wurden. Wie anhand der 6 Aufnahmen ersichtlich gab es keinen signifikanten Unterschied in der Größe der entstandenen Hemmhöfe zwischen dem Wildtyp Stamm (Abb. 40 A) und den einzelnen Deletionsmutanten (Abb. 40 B-F). Demnach sind alle getesteten Stämme gleich sensitiv für Gentamycin. Auch in Diffusions-Assays mit anderen Antibiotika (Abb. 41) konnte nur für *L. monocytogenes* ΔcesR ein Unterschied in der Größe der einzelnen Hemmhöfe zwischen wildtypischen Listerien und den einzelnen ΔTCS RR-Mutanten festgestellt werden. Die *L. monocytogenes* ΔcesR -Mutante, für die eine

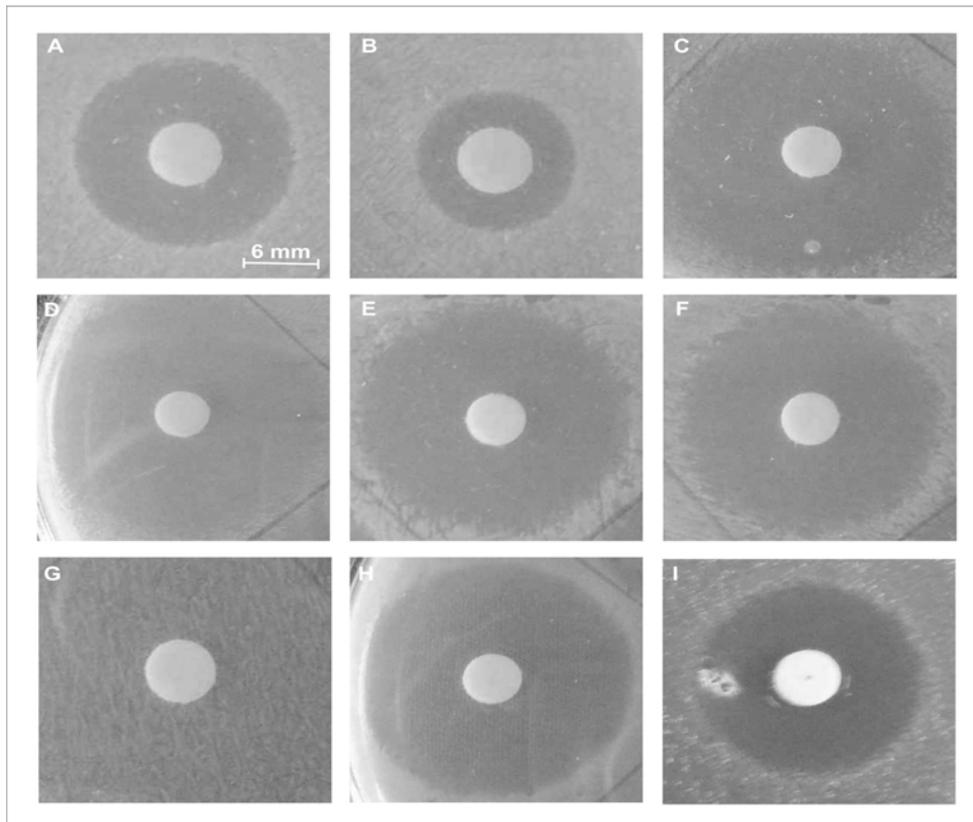


Abb. 41: Antibiotikasensitivitätstest.

Die Aufnahmen zeigen die Hemmhöfe von *L. monocytogenes* $\Delta agrA$ für Kanamycin (A), Streptomycin (B), Penicillin G (C), Ampicillin (D), Chloramphenicol (E), Tetracyclin (F), Nalidixinsäure (G), Erythromycin (H) und Gentamycin (I) und sind repräsentativ für die Ergebnisse der Versuchsreihe mit den restlichen 14 ΔTCS RR-Mutanten. Die Aufnahmen stammen von einer Standard-Digitalkamera.

erhöhte Sensitivität für Ampicillin und Penicillin G bereits nachgewiesen werden konnte (Kallipolitis *et al.*, 2003), zeigte sich für diese β -Lactam-Antibiotika sensitiver als der Wildtyp. Überraschenderweise zeigten sich alle getesteten Stämme resistent gegenüber 30 μ g Nalidixinsäure (Abb. 41 G). Nalidixinsäure wird im Gegensatz zu den anderen getesteten Antibiotika synthetisch hergestellt. Es wirkt normalerweise bakteriostatisch, indem es spezifisch die DNA-Replikation hemmt (Pschyrembel, 1994). In Tabelle 6 sind die Ergebnisse der einzelnen Antibiotikasensitivitätstests zusammengestellt. Die Daten sprechen dafür, dass neben CesR/K kein weiteres listerielles Zweikomponentensystem die Expression von Resistenzgenen gegen die getesteten Antibiotika reguliert.

<i>L. m.</i>	Amp, 25 μ g	Cm, 30 μ g	Gen, 20 μ g	Em, 30 μ g	Kan, 30 μ g	Pen G, 10 μ g	Sm, 25 μ g	Tet, 30 μ g
EGD	3,0	2,7	2,0	2,9	1,9	2,8	1,3	3,0
$\Delta agrA$	2,9	2,6	2,0	2,9	1,8	2,8	1,1	3,0
$\Delta cheY$	3,0	2,7	2,0	3,1	1,9	2,8	1,2	3,1
$\Delta Imo1022$	3,0	2,5	2,2	3,0	1,9	3,0	1,4	3,2
$\Delta Imo1060$	3,2	2,9	2,2	3,4	2,1	3,1	1,5	3,6
$\Delta Imo1172$	2,9	2,7	1,9	3,0	1,7	2,7	1,3	3,2
$\Delta lisR$	3,1	2,6	2,0	2,9	1,8	3,1	1,4	3,1
$\Delta Imo1507$	3,0	2,6	1,8	3,0	1,8	2,8	1,2	3,0
$\Delta Imo1745$	3,0	2,7	2,2	3,0	2,0	3,0	1,4	3,1

$\Delta resD$	3,3	2,8	2,3	3,3	2,1	3,0	1,5	3,4
$\Delta Imo2010$	3,2	2,8	2,0	3,1	1,9	3,1	1,4	3,1
$\Delta cesR$	3,8	2,9	2,3	3,2	2,1	3,8	1,5	3,5
$\Delta phoP$	3,3	2,9	2,3	3,4	1,9	3,1	1,4	3,5
$\Delta degU$	3,2	2,6	2,1	3,0	1,8	3,1	1,3	3,1
$\Delta Imo2583$	3,1	2,7	1,9	2,9	1,9	2,8	1,2	3,0
$\Delta kdpE$	2,9	2,7	2,0	3,0	1,9	2,7	1,3	3,1

Tab. 6: Ergebnis der Agar Diffusions-Assays mit *L. monocytogenes* EGD und den Δ TCS RR-Mutanten zur Überprüfung der Sensitivität der einzelnen Stämme für verschiedene Antibiotika. Die Werte entsprechen den durchschnittlichen Durchmessern der Hemmhöfe in cm. *L. m.*: *L. monocytogenes*. Amp: Ampicillin. Cm: Chloramphenicol. Gen: Gentamycin. Em: Erythromycin. Kan: Kanamycin. Pen G: Penicillin G. Sm: Streptomycin. Tet: Tetrazyklin.

5.2.5 Motilitätstest der *L. monocytogenes* Δ TCS RR-Mutanten auf semi-Weichagar

Um zu überprüfen, ob die listeriellen TCS einen Einfluss auf die Flagellen-basierende Motilität der Listerien ausüben, wurde diese in einem so genannten Schwimm-Assay auf semi-Weichagarplatten untersucht. Das Schwimmen von Bakterien äußert sich durch die Bildung kreisförmiger Höfe auf und im Agar um den Einstichkanal herum. Es wurden in Doppelansätzen Einzelkolonien der 15 RR-Deletionsstämme und des Wildtyps in 0,25 % TSB-Agarplatten eingestochen und diese für 24 h bei 24° C oder 37° C inkubiert.

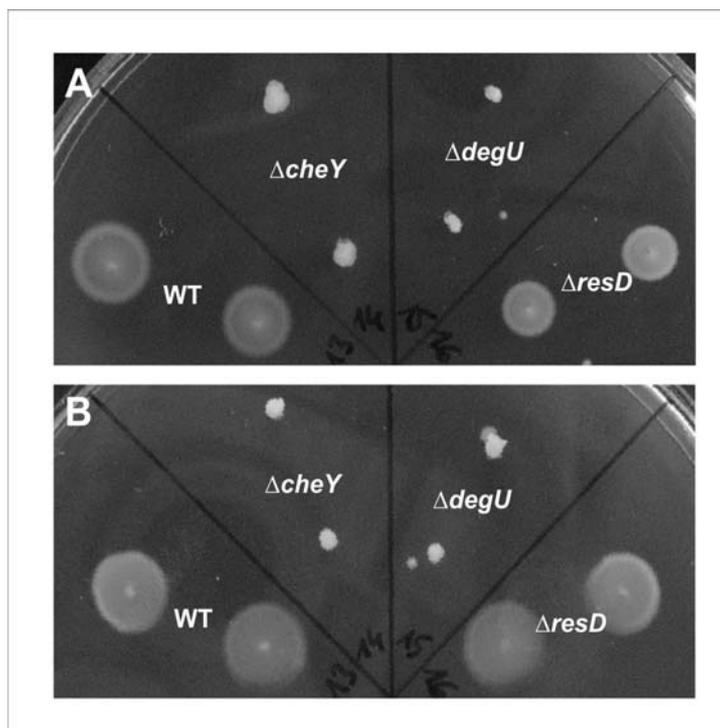


Abb. 42: Kolonien verschiedener *L. monocytogenes*-Stämme in semi-Weichagar bei 24° C (A) und 37° C (B). Es sind jeweils nur die Ergebnisse für *L. monocytogenes* EGD, $\Delta cheY$, $\Delta degU$ und *L. monocytogenes* $\Delta resD$ präsentiert. Die Aufnahmen stammen von einer Standard-Digitalkamera. Die Kolonien der *L. monocytogenes* $\Delta resD$ -Mutante sind stellvertretend für die der restlichen Δ TCS RR-Mutanten hier dargestellt, die sich nicht von denen des Wildtyps unterscheiden.

Die Kolonien der bei 24° C inkubierten Δ TCS RR-Mutanten unterschieden sich bezüglich der Form und Größe nicht von wildtypischen Bakterien (Abb. 42 A). Wie bereits beschrieben (Dons *et al.*, 2004) erwies sich die $\Delta cheY$ -Mutante als unbeweglich. Eine Ausbreitung dieses Stammes war nur entlang des Einstichkanals zu beobachten, da der zur Interaktion mit den Motorproteinen der Flagelle notwendige RR fehlt. Überraschenderweise war auch die $\Delta degU$ -Mutante unbeweglich: Die Größe der Kolonien betrug reproduzierbar nur 1/5

von der Größe wildtypischer Kolonien. Offensichtlich ist DegU bei *L. monocytogenes* wie auch bei *B. subtilis* an der Regulation der Flagelle oder der Chemotaxis beteiligt.

Abb. 42 B zeigt die bei 37° C inkubierten Platten. Obwohl die Flagellensynthese ein thermisch regulierter Prozess ist und bei diesen Temperaturen normalerweise keine Flagellensynthese mehr stattfinden sollte (Peel *et al.*, 1988), waren sowohl der Wildtyp als auch die *L. monocytogenes* Δ TCS RR-Mutanten bei dieser Temperatur noch zum Schwimmen fähig. Die Durchmesser der hier gewachsenen Kolonien waren jedoch im Vergleich zu den bei 24° C gewachsenen Kolonien etwas kleiner.

Offenbar handelte es sich bei denen in dieser Arbeit verwendeten *L. monocytogenes*-Stämmen um wie in der Literatur erwähnte (Way *et al.*, 2004) laboradaptierte Linien, die ihre Flagellen temperaturunabhängig synthetisieren. Die Deletionsstämme *L. monocytogenes* Δ *cheY* und *L. monocytogenes* Δ *degU* waren, wie schon bei 24° C beobachtet, auch bei dieser Temperatur unbeweglich. Einige Ergebnisse der Motilitätstests sind in Abb. 43 in einem Balkendiagramm zusammengefasst.

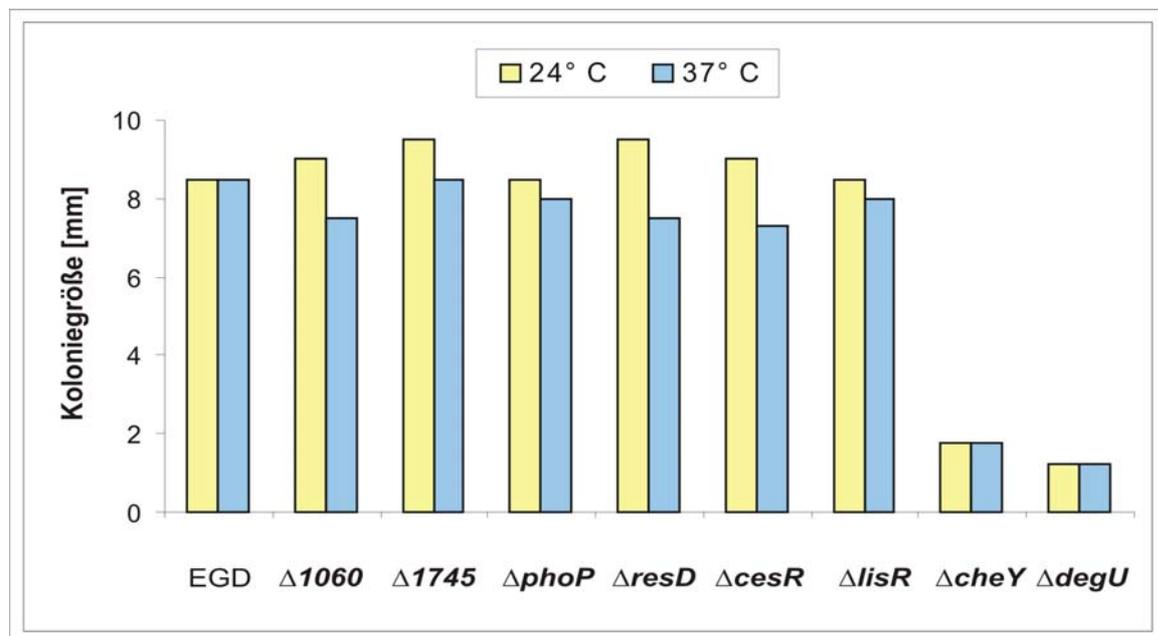


Abb. 43: Graphische Darstellung der Koloniegößen im Motilitätstest bei 24° C und 37° C. Einzelkolonien der jeweiligen Stämme wurden auf Semi-Weichagar aufgetragen und über Nacht bei 24° C und 37° C inkubiert. Zur besseren Übersicht sind hier nur einige der 15 Δ TCS RR-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp dargestellt. Gelbe Balken: Koloniedurchmesser bei 24° C. Blaue Balken: Koloniedurchmesser bei 37° C.

5.2.6 Elektronenmikroskopische Analyse von *L. monocytogenes* EGD, Δ *degU* und *L. monocytogenes* Δ *cheY*

Da der Stamm *L. monocytogenes* Δ *degU* im oben beschriebenen "Schwimm-Assay" den Verlust seiner Beweglichkeit zeigte, sollte durch Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen gezeigt werden, ob dies auf einem Defekt in der Flagellensynthese beruht. Hierzu wurden die Bakterien über Nacht in Flüssigkultur gezogen und zur Negativkontrastierung mit 0,5 % Uranylacetat angefärbt. Wildtypische Listerien sowie die Δ *cheY*-Mutante wurden als Positivkontrollen ebenfalls angefärbt und mikroskopiert. Von dieser Mutante ist

aus der Literatur bekannt, dass sie zwar aufgrund ihrer Deletion den Flagellenmotor nicht mehr regulieren kann und unbeweglich ist, dennoch aber Flagellen bildet (Dons *et al.*, 2004).

In Abb. 44 sind einzelne Bakterien der Stämme *L. monocytogenes* EGD, $\Delta degU$ und *L. monocytogenes* $\Delta cheY$ in 20.000-facher Vergrößerung abgebildet. Abb. 44 A, B und E zeigen bei 24° C kultivierte Bakterien, Abb. 44 C und D bei 37° C gewachsene Listerien. *L. monocytogenes* EGD besitzt bei 24° C mehrere lange Flagellen (Abb. 44 A, Pfeile), die asymmetrisch auf der Bakterienoberfläche verteilt sind. Im Überstand dieser Bakterien wurden ebenfalls Flagellen gefunden. Im Gegensatz zur unbeweglichen $\Delta cheY$ -Mutante (Abb. 44 E), bei der wie beim EGD-Stamm gut ausgeprägte Flagellen sowohl im Überstand als auch mit den Listerien selbst assoziiert zu finden waren, konnten bei der $\Delta degU$ -Mutante weder bei 24° C (Abb. 44 B), noch bei 37° C (Abb. 44 D) Flagellen nachgewiesen werden. Diese Beobachtungen lassen darauf schließen, dass der listerielle RR DegU wie bei *B. subtilis* an der Regulation der Flagellengen-Expression beteiligt ist.

Der in dieser Arbeit verwendete wildtypische EGD-Stamm war wie in Abb. 43 B ersichtlich auch bei 37° C noch beweglich. Die elektronenmikroskopische Auswertung zeigte, dass dieser Stamm auch bei 37° C noch Flagellen aufweist (Abb. 44 C). Insgesamt waren jedoch in diesen Präparaten weniger Flagellen aufzufinden als in den Präparaten der bei 24° C gezogenen Listerien. Es ist möglich, dass es sich bei diesem Stamm um eine laboradaptierte Linie handelt, die ihre Flagellen temperaturunabhängig synthetisiert (Way *et al.*, 2004).

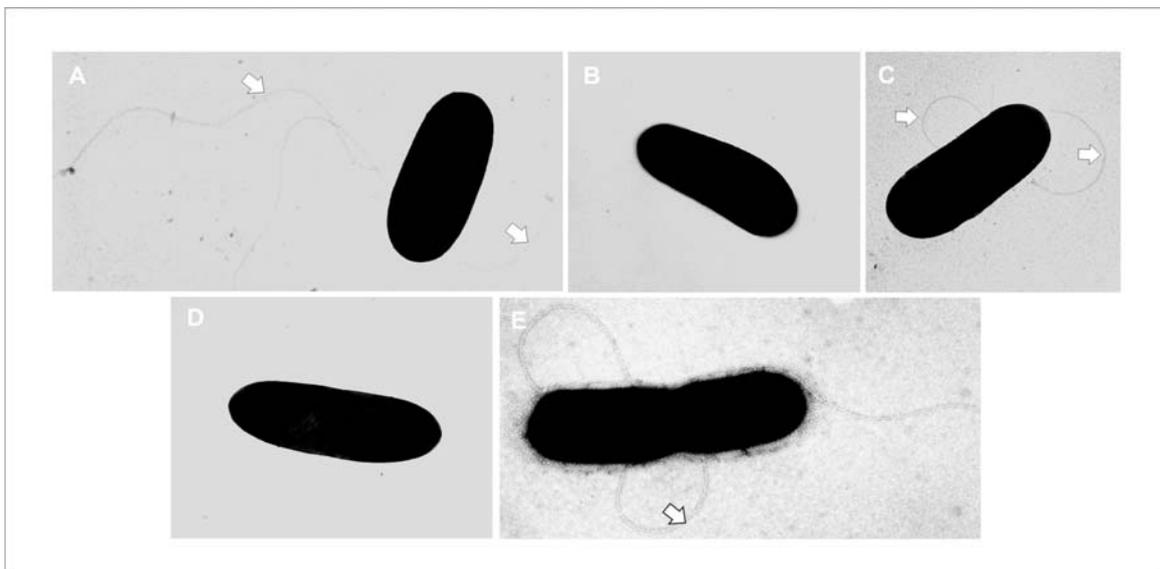


Abb. 44: Elektronenmikroskopische Aufnahmen des flagellierten *L. monocytogenes* EGD (**A** und **C**) und des unflagellierten $\Delta degU$ -Stammes (**B** und **D**). Die flagellierte, unbewegliche $\Delta cheY$ -Mutante ist in **E** dargestellt.

Die Bakterien wurden bei 24° C (A, B und E) oder 37° C (C und D) gezogen und im Transmissions-Elektronenmikroskop bei 20.000-facher Vergrößerung untersucht. Auf Flagellen ist mit weißen Pfeilen verwiesen.

5.2.7 Nachweis der Expression verschiedener Virulenzfaktoren in *L. monocytogenes* ΔTCS RR-Mutanten

Um zu überprüfen, ob die Inaktivierung der einzelnen Zweikomponentensysteme einen Einfluss auf die Expression bekannter Virulenzgene von *L. monocytogenes*

hat, wurden Überstandsproteine und Gesamtzell-Proteinextrakte auf die Anwesenheit der sekretierten Proteine LLO und PlcB und auf Zellwand-gebundenes ActA untersucht. LLO ist an der Befreiung der Listerien aus dem Phagosom beteiligt, während ActA und PlcB eine entscheidende Rolle bei der inter- und intrazellulären Motilität der Bakterien spielen.

Zelluläre- und Überstandsproteine wurden aus bis zur späten exponentiellen Phase (180 KE bzw. $OD_{600nm} = 1,0$) gewachsenen Bakterien gewonnen, über SDS-PAGE aufgetrennt und in Western-Blots mit den entsprechenden Antikörpern analysiert. Als Negativkontrolle wurden Protein-extrakte von *L. monocytogenes* A49, Δhly und *L. monocytogenes* $\Delta plcB$ aufgetrennt, bei denen jeweils die Gene für ActA teilweise (Hauf *et al.*, 1997) bzw. für LLO (Jones und Protnoy, 1994) und PlcB (Hauf *et al.*, 1997) vollständig deletiert sind. Als Positivkontrolle dienten Extrakte des Wildtyp-Stammes EGD.

Abbildung 45 zeigt eine Zusammenstellung dieser Westernblot-Analysen. In allen Proteinextrakten aus *L. monocytogenes* Δ TCS RR-Mutanten konnten die entsprechenden Virulenzproteine detektiert werden. Sie exprimieren die drei Virulenzfaktoren LLO, PlcB und ActA demnach im gleichen Maße wie der Wildtyp. Die Gesamtzellprotein-Extrakte wurden zusätzlich noch mit entsprechenden Antikörpern auf die Anwesenheit der Oberflächenproteine Internalin und InIB untersucht. Auch diese beiden Proteine wurden von den *L. monocytogenes* Δ TCS RR-Mutanten exprimiert wie vom Wildtyp (Daten nicht gezeigt). Daraus folgt, dass die Inaktivierung der individuellen listeriellen TCS keinen offensichtlichen Einfluss auf die Expression dieser fünf wichtigen Virulenzfaktoren in der späten exponentiellen Wachstumsphase unter den angewandten Kulturbedingungen hat.

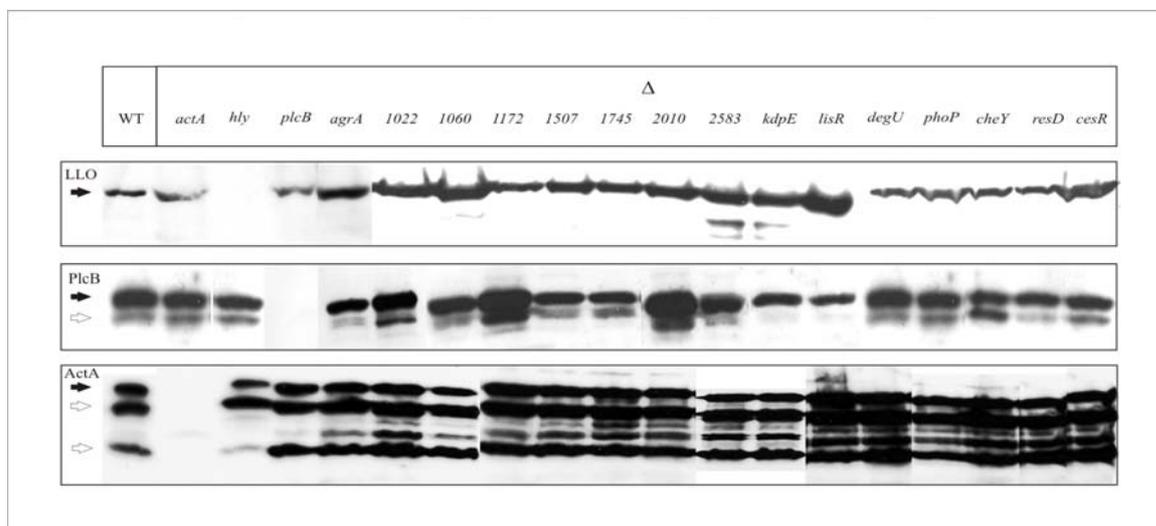


Abb. 45: Westernblot mit anti-LLO-, anti-PlcB- und anti-ActA-Antikörpern. Schwarze Pfeile verweisen auf die Hauptbande, weiße Pfeile auf spezifische Abbauprodukte. Bei der hier als *L. monocytogenes* $\Delta actA$ bezeichneten Mutante handelt es sich um *L. monocytogenes* A49.

Im Westernblot zeigte sich schon, dass erwartungsgemäß *L. monocytogenes* EGD, sowohl die einzelnen Δ TCS RR-Mutanten dazu fähig sind LLO zu exprimieren. Die Fähigkeit der einzelnen Stämme zur β -Hämolyse wurde dennoch auf Blutagar überprüft. β -Hämolyse äußert sich durch die Bildung von durchsichtigen Höfen um die Bakterienkolonien. Diese entstehen durch das

Austreten von Hämoglobin als Antwort auf die Schädigung der Erythrozytenmembran durch LLO (Pschyrembel, 1994).

Blut-Agarplatten wurden im doppelten Ansatz punktförmig mit Einzelkolonien der zu untersuchenden Stämme angeimpft und diese über Nacht bei 37° C inkubiert. Als Negativkontrolle wurden die Platten mit *L. monocytogenes* Δhly , als Positivkontrolle mit *L. monocytogenes* EGD angeimpft. In diesem Test zeigten alle 15 Δ TCS RR-Mutanten β -hämolytische Aktivität. Einige von ihnen sind zusammen mit dem Wildtyp in Abbildung 46 dargestellt. Der *L. monocytogenes* Δhly -Stamm (B) zeigte normales Wachstum, war jedoch wie erwartet aufgrund seiner Deletion ahämolytisch. Bei der punktförmigen hellen Stelle in der Mitte der Aufnahme handelt es sich lediglich um die Einstichstelle im Agar. Die Größe der entstandenen Hämolysehöfe unterschied sich bei keiner der Δ TCS RR-Mutanten signifikant von denen des WT. Die Deletion der Response Regulatorgene und die daraus resultierende Inaktivierung der TCS scheint also weder die Expression, noch die hämolytische Aktivität von LLO zu beeinflussen.

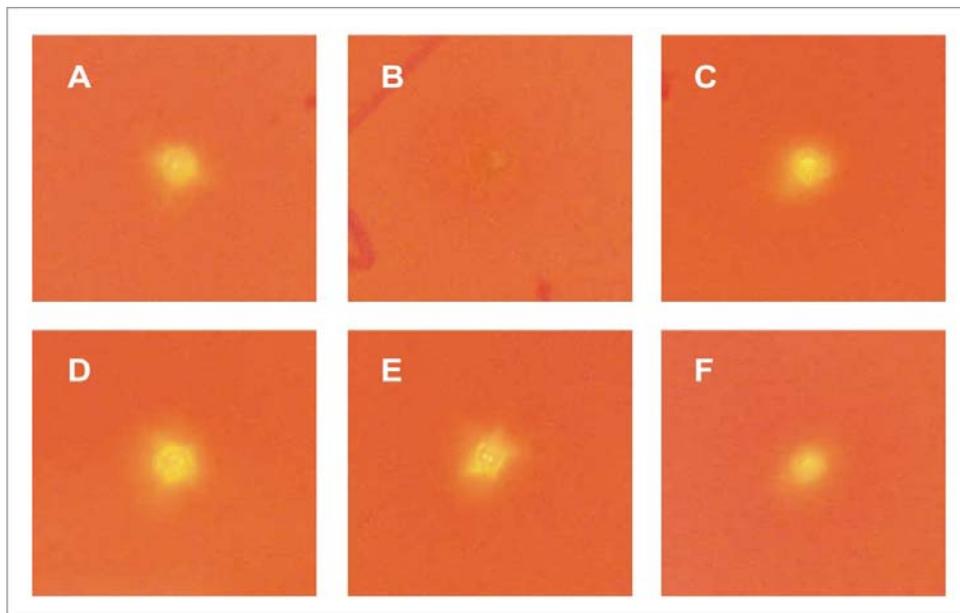


Abb. 46: Hämolyseintest

A: *L. monocytogenes* (*L. m.*) EGD. **B:** *L. m.* Δhly . **C:** *L. m.* $\Delta cheY$. **D:** *L. m.* $\Delta kdpE$. **E:** *L. m.* $\Delta lisR$. **F:** *L. m.* $\Delta 1172$. Die Hämolysehöfe waren jeweils deutlich um die Einstichstelle herum zu erkennen. *L. monocytogenes* Δhly (B) zeigte aufgrund seiner Deletion keine hämolytische Aktivität. Sowohl der WT als auch die Δ TCS RR-Mutanten waren hämolytisch. Die Aufnahmen stammen von einer Standard Digitalkamera.

5.2.8 Untersuchungen zum intrazellulären Verhalten der *L. monocytogenes* Δ TCS RR-Mutanten nach Infektion verschiedener Zelllinien

Die Fähigkeit der einzelnen Δ TCS RR-Mutanten, in eukaryotischen Zellen den für *L. monocytogenes* typischen intrazellulären Lebenszyklus erfolgreich zu durchlaufen, wurde in verschiedenen Zellkultur-Systemen untersucht.

5.2.8.1 Invasionsverhalten der *L. monocytogenes* Δ TCS RR-Mutanten

Zunächst wurde die Invasivität der Deletionsmutanten in Cos-1 Fibroblasten bestimmt und mit der Invasionsrate wildtypischer Listerien verglichen. Die Zellen

wurden in dreifachen Ansätzen infiziert, 1 h p. I mit Triton-X-100 lysiert und die Anzahl intrazellulärer Bakterien bestimmt. Als Positivkontrolle wurden die Fibroblasten mit dem EGD-Stamm, als Negativkontrolle mit der *L. monocytogenes* $\Delta inlAB$ Mutante infiziert. Bei dieser *inlAB*-Doppelmutante sind die Gene für Internalin und InlB deletiert. Sie weist aufgrund dessen im Vergleich zum Wildtyp eine deutlich geringere Invasionsrate auf (Greiffenberg *et al.*, 1997). In Abbildung 47 sind die Invasionsraten einiger *L. monocytogenes* ΔTCS RR-Mutanten für Cos-1 Zellen graphisch dargestellt. Die meisten der Deletionsmutanten zeigten im wesentlichen Invasionsraten vergleichbar mit wildtypischen Bakterien, als Beispiel hierfür ist *L. monocytogenes* $\Delta agrA$ abgebildet. Nur zwei Mutanten, *L. monocytogenes* $\Delta 1507$ und *L. monocytogenes* $\Delta lisR$ waren für diese Zellen signifikant ($p < 0,05$) weniger invasiv als der Wildtyp. Ihre Invasionsrate lag jedoch noch deutlich über der von *L. monocytogenes* $\Delta inlAB$. Die beiden unbeweglichen Stämme *L. monocytogenes* $\Delta degU$ und *L. monocytogenes* $\Delta cheY$, sowie *L. monocytogenes* $\Delta 1022$ und *L. monocytogenes* $\Delta phoP$ zeigten eine erhöhte Invasionsrate in Cos-1. Die erwähnten Unterschiede zeigten sich im *t*-Test jeweils als statistisch signifikant ($p < 0,05$).

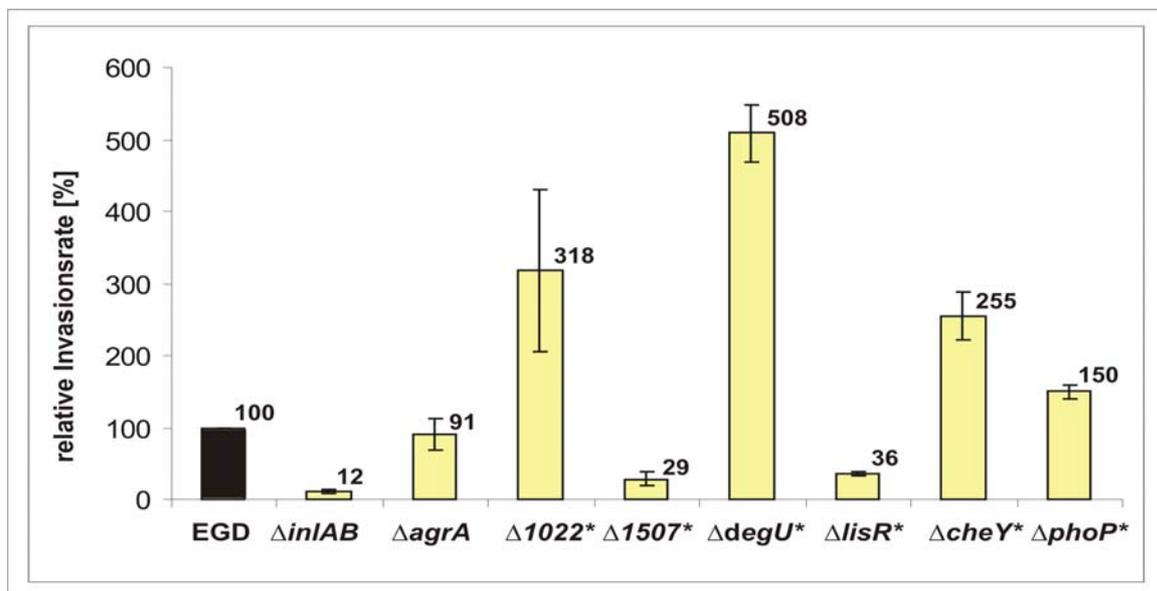


Abb. 47: Relative Invasionsrate in Cos-1 Fibroblasten.

Hier sind die Invasionsraten einiger ΔTCS RR-Mutanten graphisch dargestellt, die eine veränderte Invasionsrate im Vergleich zu *L. monocytogenes* EGD aufzeigten. Die Invasionsrate von *L. monocytogenes* $\Delta agrA$ ist stellvertretend für die der Deletionsmutanten dargestellt, die keine veränderte Invasionsrate aufzeigten. Bei den Werten handelt es sich um die Mittelwerte eines repräsentativen Versuches. Die RR-Deletionsstämme, deren Invasionsrate sich statistisch signifikant von der des Wildtyps unterscheidet, sind mit einem Sternchen versehen ($p < 0,05$).

Um ausschließen zu können, dass die beobachteten Unterschiede im Invasionsverhalten einzelner Stämme auf eine unterschiedliche Sensitivität der Mutanten für das zur Lyse der Zellen verwendete Triton-X-100 zurückzuführen ist, wurde der Einfluss dieses Detergens auf die Viabilität der Listerien überprüft. Hierzu wurden die Stämme im doppelten Ansatz in 1x PBS mit und ohne Triton-X-100 inkubiert und anschließend die Lebendzellzahl der Bakterien durch Ausplattieren geeigneter Verdünnungsstufen auf BHI-Agar bestimmt. Dabei zeigte sich kein Unterschied in der Anzahl CFU behandelter und nicht-behandelter Ansätze. Demnach sind die Unterschiede im Invasionsverhalten nicht auf den Einfluss von

Triton-X-100 zurückzuführen, sondern auf den Effekt der Deletion des jeweiligen Response Regulatorgens (Ergebnisse nicht gezeigt).

Die Ergebnisse zur anschließend untersuchten Invasion der Deletionsmutanten in Caco-2 Zellen sind zum Teil in Abbildung 48 graphisch abgebildet. Die Negativkontrolle *L. monocytogenes* $\Delta inlAB$ zeigte für diesen Zelltyp eine noch geringere Invasivität als für Cos-1 Fibroblasten. Für die meisten der 15 Δ TCS RR-Mutanten konnte kein verändertes Invasionsverhalten in Epithelzellen festgestellt werden. Sie wiesen Invasionsraten auf, die sich von denen wildtypischer Listerien kaum unterschieden. *L. monocytogenes* $\Delta agrA$ und *L. monocytogenes* $\Delta lisR$ zeigten sich im Vergleich zum Wildtyp EGD für Caco-2 Zellen signifikant ($p < 0,05$) weniger invasiv. *L. monocytogenes* $\Delta 2583$, $\Delta degU$, $\Delta cheY$ und *L. monocytogenes* $\Delta phoP$ zeigten zwar eine erhöhte Invasivität, die sich jedoch im t -Test als nicht-signifikant ($p > 0,05$) erwies. Aus diesen Ergebnissen wird gefolgert, dass nur die Zweikomponentensysteme LisR/K und AgrA/C an der Regulation von Genen beteiligt sind, die eine Invasion in Epithelzellen verstärken.

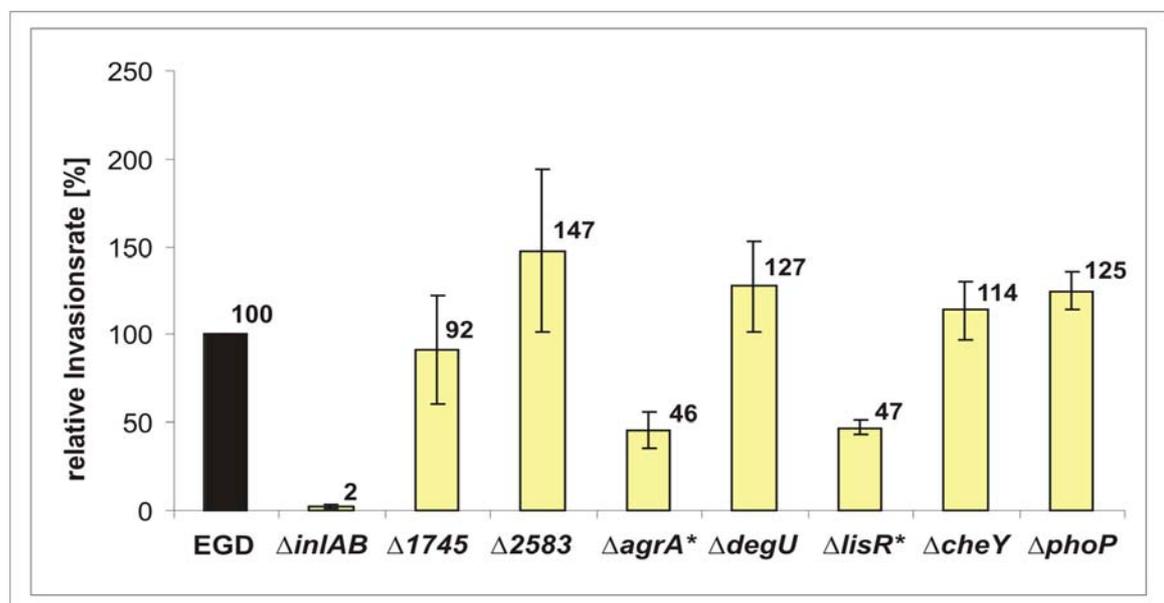


Abb. 48: Relative Invasionsrate in Caco-2 Epithelzellen.

Bis auf *L. monocytogenes* $\Delta agrA$ und *L. monocytogenes* $\Delta lisR$ zeigte keine der Δ TCS RR-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp ein signifikant verändertes Invasionsverhalten in Caco-2 Epithelzellen. Bei den Werten handelt es sich um die Mittelwerte eines repräsentativen Versuches. Die Invasionsraten sind in Prozent in Relation zur Invasionsrate wildtypischer Listerien (100 %) angegeben. Das Sternchen markiert die RR-Deletionsstämme, deren Invasionsrate im Vergleich zum Wildtyp signifikant verändert ist ($p < 0,05$).

5.2.8.2 Replikation der *L. monocytogenes* Δ TCS RR-Mutanten im Zytoplasma von Makrophagen

Die Fähigkeit der Δ TCS RR-Mutanten intrazellulär zu überleben und zu replizieren, wurde in J774 Makrophagen überprüft. Hierzu wurden die Zellen auf runden Deckgläsern ausgesät und mit einer niedrigen MOI infiziert. 1 h, 3 h und 6 h p. I. wurden die Zellen auf den Deckgläsern fixiert und mit Giemsa-Lösung gefärbt.

Abbildung 49 zeigt mit Giemsa gefärbte *L. monocytogenes* EGD-infizierte J774 Makrophagen 3 h (A) und 6 h (B) p. I. Es ist deutlich zu erkennen, dass die

Bakterien 3 Stunden p. I. bereits mit der Ausbreitung von Zelle zu Zelle begonnen haben. Nach 6 Stunden waren bereits alle umliegenden Nachbarzellen infiziert. Diese Aufnahmen stehen stellvertretend für alle angefertigten Präparate, da bei keiner der 15 RR-Deletionsmutanten ein Unterschied im intrazellulären Überleben zu wildtypischen *Listerien* zu erkennen war. In der lichtmikroskopischen Auswertung wurde die Anzahl intrazellulärer Bakterien pro Zelle 1 h, 3 h und 6 h p. I. bestimmt. In Abb. 49 C sind die Ergebnisse dieser Auszählungen graphisch zusammengefasst. Daraus ist ersichtlich, dass die Mutanten im Zytoplasma der Makrophagen im Wesentlichen wie der Wildtyp replizieren können. Obgleich die Streuungen 3 h bzw. 6 h p. I. annehmen lassen, dass einige der Deletionsmutanten, z. B. *L. monocytogenes* $\Delta 2583$ oder *L. monocytogenes* $\Delta 2010$ im Zytoplasma der WZ besser replizieren als wildtypische *Listerien*, erwiesen sich diese Unterschiede im *t*-Test ausnahmslos als nicht-signifikant ($p > 0,05$).

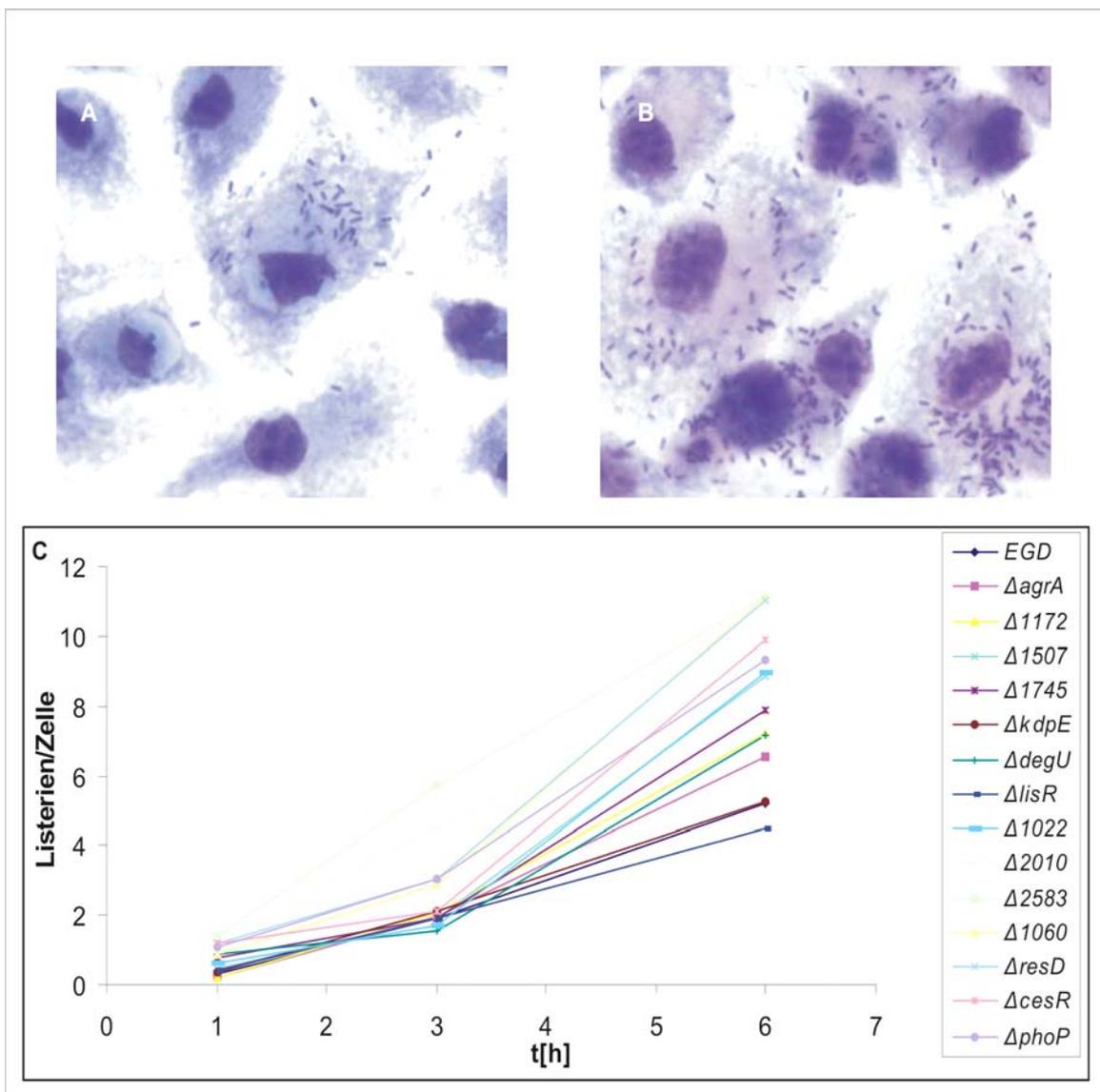


Abb. 49: Intrazelluläre Vermehrung im Zytoplasma von J774 Makrophagen *L. monocytogenes* EGD-infizierte J774-Makrophagen 3 h (A) und 6 h (B) p. I. C: Graphische Darstellung der intrazellulären Vermehrung der Δ TCS RR-Mutanten im Zytoplasma der Makrophagen über einen Zeitraum von 6 Stunden. Diese Versuche wurden von Frau S. Bauer (Lehrstuhl für Mikrobiologie, Universität Würzburg) durchgeführt und zur Verfügung gestellt.

5.2.8.3 Intra- und interzelluläre Bewegung von *L. monocytogenes* Δ TCS RR-Mutanten

Das listerielle Oberflächenprotein ActA spielt bei der intra- und interzellulären Motilität der Bakterien eine entscheidende Rolle. Es ist unter anderem für die Rekrutierung von Aktinfilamenten verantwortlich sowie für die Aktinpolymerisation und Aktinschweifbildung (Domann *et al.*, 1992). Um zu überprüfen, ob die einzelnen TCS die ActA-abhängige intrazelluläre Motilität der Listerien beeinflussen, wurden die Zellen nach der Infektion zunächst mit FITC-Phalloidin angefärbt. Diese Färbungen sollten Aufschluss darüber geben, ob sich die Aktinschweife der Δ TCS RR-Mutanten in irgendeiner Weise von denen wildtypischer Listerien unterscheiden.

Caco-2 Epithelzellen wurden auf Deckgläsern ausgesät und mit einer MOI = 5 der entsprechenden Bakterienstämme infiziert. 4 h p. I. wurden die infizierten Zellen fixiert und mit FITC-Phalloidin gefärbt. Die mikroskopische Auswertung der einzelnen Präparate erfolgte in der Grünfluoreszenz (Abb. 50). Sie ergab, dass alle Δ TCS RR-Mutanten Aktin an ihre Oberfläche rekrutieren können und Aktinschweife ausbilden, die sich in ihrer Größe von denen wildtypischer Listerien nicht unterscheiden (Pfeile).

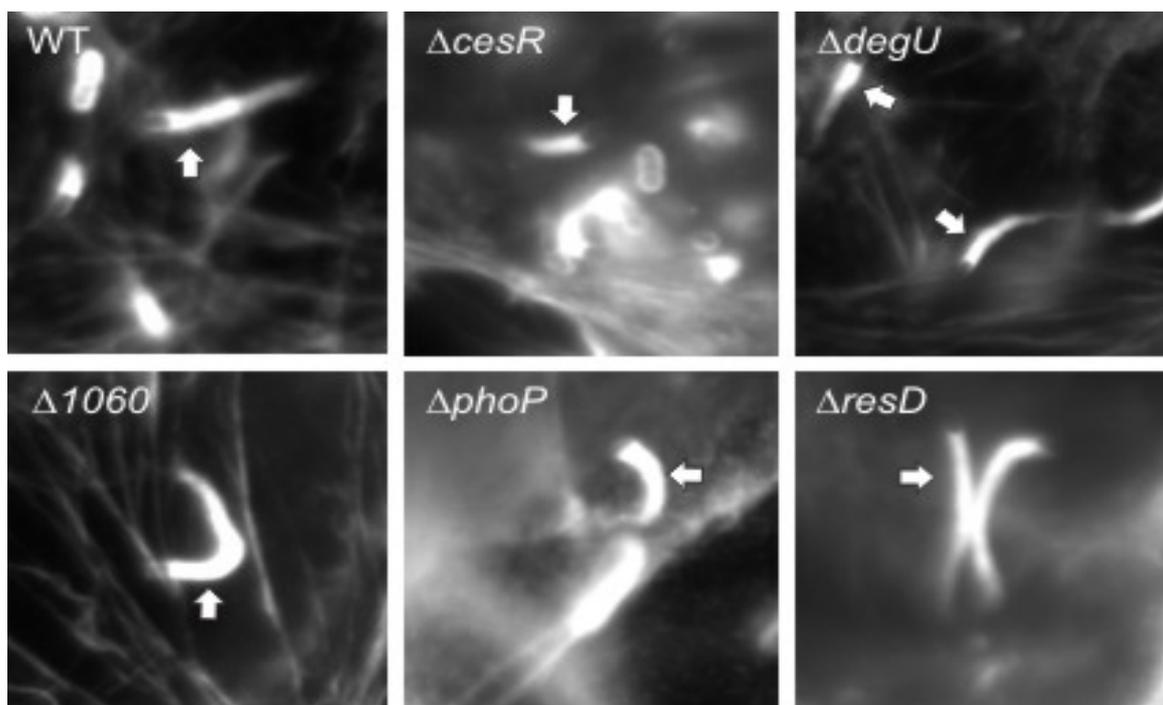


Abb. 50: Fluoreszenz-Aufnahmen FITC-Phalloidin-gefärbter *L. monocytogenes* Stämme 4 h p. I. Die weißen Pfeile verweisen auf Aktinschweife. Die Aufnahmen stammen von einer elektronischen Kamera (Princeton Instruments) und wurden mit den Softwareprogrammen Metamorph (Universal Imaging Corporation) und Adobe Photoshop überarbeitet. Dieser Versuch wurde von Frau S. Bauer (Lehrstuhl für Mikrobiologie, Universität Würzburg) durchgeführt und zur Verfügung gestellt.

Die Befähigung der einzelnen Δ TCS RR-Mutanten zur Ausbreitung von Zelle zu Zelle wurde mit *gfp*-exprimierenden Bakterien untersucht. Der Wildtyp und die einzelnen *L. monocytogenes* Δ TCS RR-Mutanten wurden mit dem P_{actA} -*gfp* Plasmid (Dietrich *et al.*, 1998) transformiert und die Ausbreitung der Bakterien im Zellrasen über 24 h mit einem inversen Mikroskop protokolliert.

Caco-2 Zellen wurden mit den einzelnen Stämmen infiziert (MOI = 1) und ab t_0 mit gentamycinhaltigem Medium weiter inkubiert. Die Infektionsherde der *gfp*-exprimierenden und dadurch grün fluoreszierenden intrazellulären Bakterien wurden zu verschiedenen Zeitpunkten p. I. mit einem inversen Fluoreszenzmikroskop überwacht und photographiert. Die Auswertung der Lebendpräparate ergab, dass die Infektionsherde in mit Δ TCS RR-Mutanten infizierten Zellen zu jedem Zeitpunkt p. I. genauso groß waren, wie die von wildtypischen Listerien. Offensichtlich ist keine der 15 Deletionsmutanten in der Ausbreitung von Zelle zu Zelle beeinträchtigt. In Abbildung 51 sind die Infektionsfoci des Wildtyps und einiger stellvertretender Deletionsmutanten dargestellt.

Unter Berücksichtigung aller Ergebnisse, die anhand der Zellkulturversuche mit den verwendeten *L. monocytogenes*-Stämmen erhalten wurden kann zusammenfassend gefolgert werden, dass sich die individuellen Δ TCS RR-Mutanten, abgesehen von einigen Unterschieden bei der Invasion, in ihrem intrazellulären Verhalten nicht von wildtypischen Listerien unterscheiden. Sie zeigen bezüglich ihrer intrazellulären Replikation, Aktinpolymerisation bzw. Schweifbildung zur intra- und interzellulären Fortbewegung keinen Unterschied zu *L. monocytogenes* EGD. Diese Ergebnisse decken sich mit den Beobachtungen, wonach die wichtigen Virulenzfaktoren LLO, ActA, PlcB, InlA und InlB in den einzelnen Mutanten gleich stark exprimiert werden wie im Wildtyp. Es scheint, dass keiner der listeriellen Response Regulatoren für ein Durchlaufen des Infektionszyklus unter den angewandten Versuchsbedingungen notwendig ist.

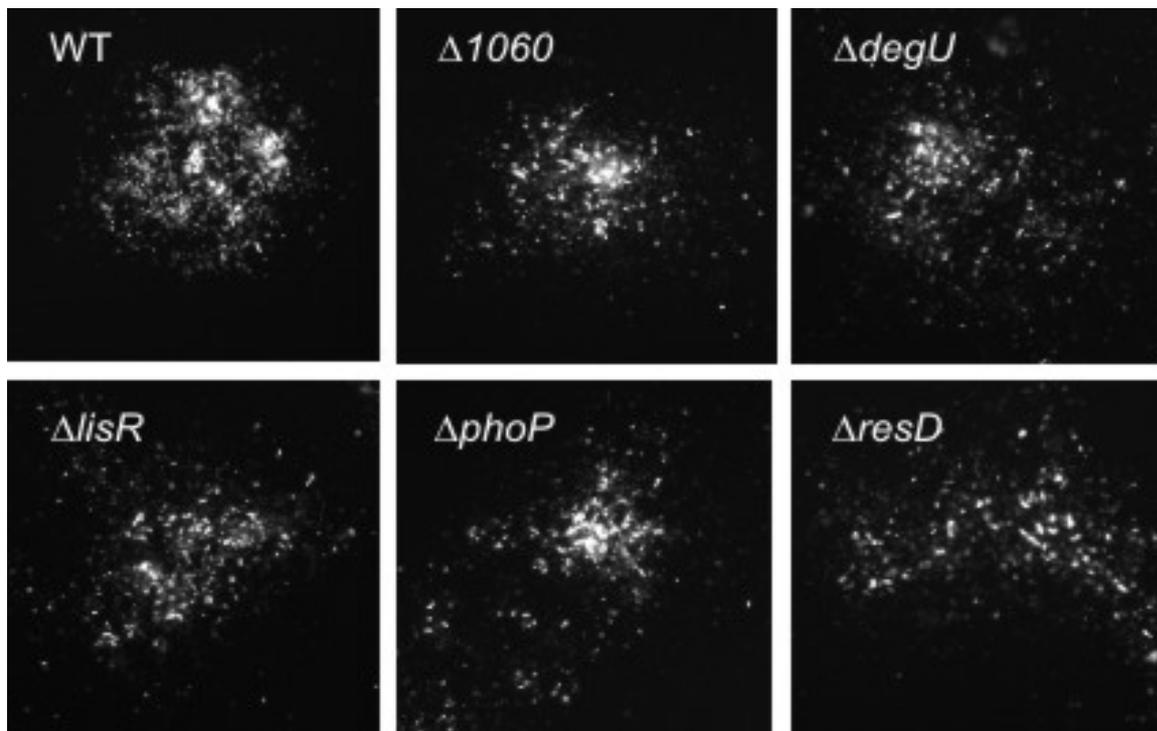


Abb. 51: Fluoreszenzaufnahmen *gfp*-exprimierender *L. monocytogenes*-Stämme in lebenden Caco-2 Zellen 24 h p. i. Die Aufnahmen stammen von einer elektronischen Kamera (Princeton Instruments) und wurden mit den Softwareprogrammen Metamorph (Universal Imaging Corporation) und Adobe Photoshop überarbeitet. Dieser Versuch wurde von Frau S. Bauer (Lehrstuhl für Mikrobiologie, Universität Würzburg) durchgeführt und zur Verfügung gestellt.

5.2.9 Infektion von BALB/c Mäusen mit *L. monocytogenes* Δ TCS RR-Mutanten

Ein möglicher Einfluss der einzelnen Response Regulatoren auf die Virulenz von *L. monocytogenes* *in vivo* wurde im Mausmodell untersucht. Gruppen 6 - 8 Wochen alter weiblicher BALB/c Mäuse (Harlan Winkelmann, Deutschland) wurden über die laterale Schwanzvene mit je 5×10^3 Bakterien der einzelnen Stämme infiziert.

Die zu injizierenden Listerien wurden bis zur mittleren logarithmischen Wachstumsphase kultiviert und in je 100 μ l endotoxinfreiem PBS i. v. verabreicht. 3 Tage p. I. wurden die Mäuse durch zervikale Dislokation getötet und Leber und Milz unter aseptischen Bedingungen entfernt. Die Organe wurden jeweils in sterilem Wasser homogenisiert, verdünnt und durch Ausplattieren geeigneter Verdünnungsstufen die Anzahl an Bakterien in Leber und Milz für jede Maus bestimmt.

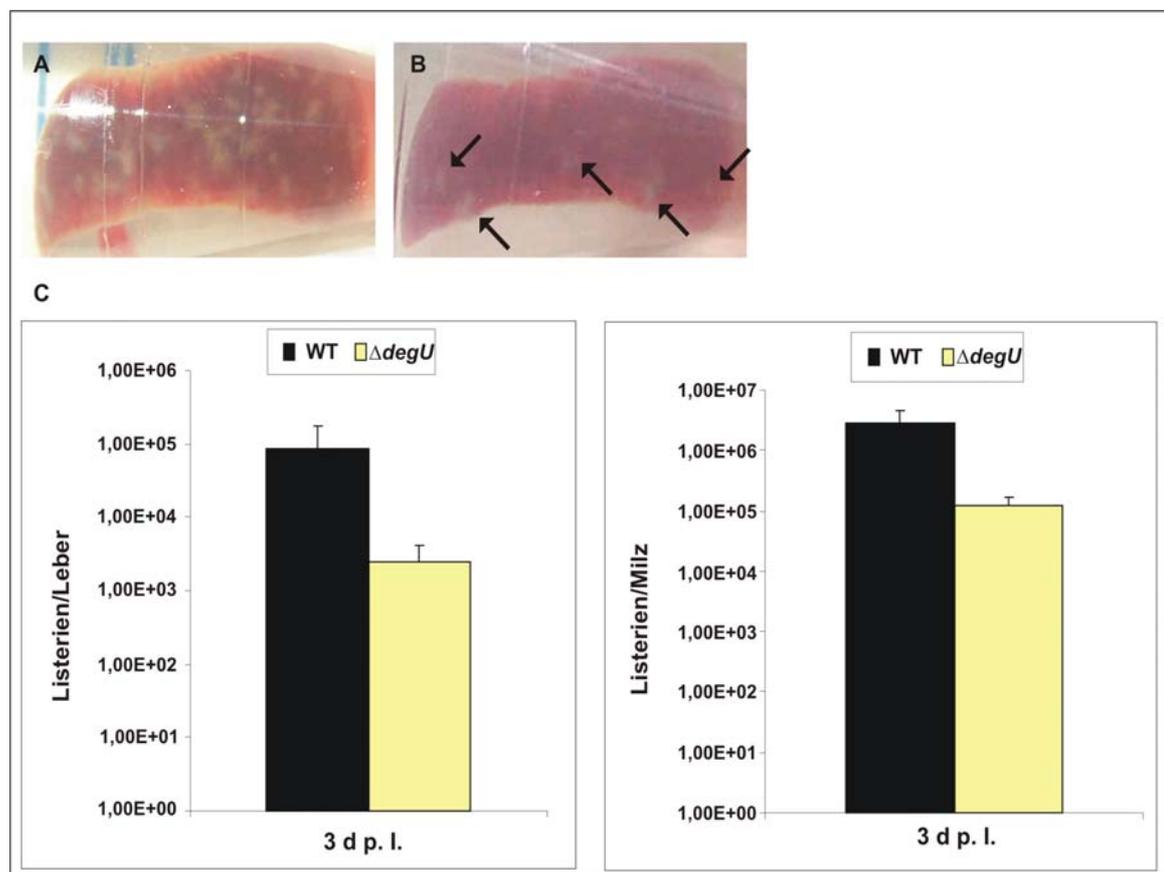


Abb. 52: Virulenz-Assay in der Maus.

A: Stark vergrößerte Milz *L. monocytogenes* EGD infizierter BALB/c-Maus. **B:** Stark vergrößerte Milz *L. monocytogenes* Δ *degU* infizierter BALB/c-Maus. Nekrotische Infektionsfoci sind deutlich in Form weißer Flecken auf den Organen zu erkennen. Bei der *L. monocytogenes* Δ *degU*-infizierten Maus waren deutlich weniger Foci auf der Milz (s. Pfeile). **C:** graphische Darstellung der Anzahl an Listerien in Milz und Leber nach 72 h. Bei den Werten handelt es sich um die Mittelwerte aus Gruppen von je 10 BALB/c Mäusen. Die beobachteten Unterschiede in der Anzahl *L. monocytogenes* EGD und *L. monocytogenes* Δ *degU* in Leber in Milz waren statistisch signifikant ($p < 0,05$). d = Tage.

Während einige der Mäuse, die mit *L. monocytogenes* EGD sowie verschiedenen Mutanten infiziert waren, innerhalb dieser drei Tage deutliche Krankheitssymptome zeigten (Gewichtsabnahme, glasige Augen, Ataxie), waren die mit der $\Delta degU$ -Mutante infizierten Tiere phänotypisch ohne Befund. Die Lebern und Milzen dieser *L. monocytogenes* $\Delta degU$ -infizierten Mäuse wiesen 3 Tage nach der Infektion deutlich weniger Mikroabszesse auf als die Organe der mit wildtypischen Bakterien infizierten Mäuse (vgl. Abb. 52 A und B). In Hepatozaten entstehen solche Foci nach der Ausschüttung von Chemokinen durch die Rekrutierung von mehrkernigen Neutrophilen an infizierte Zellen (Rogers *et al.*, 1996). Nach 2–4 Tagen p. i. werden die Neutrophilen nach und nach durch haemopoetische, mononukleäre Zellen und Lymphozyten ersetzt und es entstehen Abszesse (Vázquez-Boland *et al.*, 2001).

Es zeigte sich, dass mit *L. monocytogenes* $\Delta degU$ infizierte Mäuse im Vergleich zu den mit dem EGD-Stamm infizierten Tieren 3 Tage p. i. reproduzierbar 1 Log-Stufe weniger Bakterien in ihrer Milz und mehr als 1,5 Log-Stufen weniger Listerien in ihrer Leber aufwiesen. Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass DegU die Virulenz der Listerien beeinflusst. Für alle anderen getesteten Mutanten zeigten sich die Unterschiede in der Anzahl an Listerien pro untersuchtem Organ im Vergleich zum Wildtyp 3 Tage nach intravenöser Verabreichung als weniger stark ausgeprägt und in den meisten Fällen auch als statistisch nicht signifikant. Diese Resultate sprechen dafür, dass nur die Deletion von *degU* zu einer starken Virulenzattenuation führt und der RR DegU eine Rolle in der murinen Listeriose spielt.

5.2.10 Vergleichende Proteomanalyse mittels 2D-Gelelektrophorese und massenspektrometrische Analyse

Da *L. monocytogenes* $\Delta degU$ unflagelliert und als einzige der ΔTCS RR-Deletionsmutanten virulenzattenuiert ist, wurde das Proteom dieser Mutante analysiert.

5.2.10.1 Proteinmuster zellulärer Proteine aus *L. monocytogenes* EGD und *L. monocytogenes* $\Delta degU$

Das Proteom des $\Delta degU$ -Stammes wurde mittels zweidimensionaler SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (2DGE) analysiert. Hierzu wurden zelluläre Proteine aus stationären Kulturen dieses Stammes isoliert und die Proteinkonzentration mit dem BIO RAD-Assay bestimmt. Parallel dazu wurden zelluläre Proteine aus *L. monocytogenes* EGD isoliert und ebenfalls die Proteinkonzentration bestimmt. Es wurden in der anschließenden IEF Proteine eines jeden Stammes in einem pH-Bereich von 4-7 fokussiert und diese anschließend in einem 12 %-igen PAA-Gel aufgetrennt. Nach erfolgter elektrophoretischer Auftrennung wurden die Gele mit Silbernitrat angefärbt.

Beim Vergleich der Gele, die mit zellulären Proteinen von bei 37° C gewachsenen Bakterien beladen waren (Abb. 53), konnten im Proteinmuster von *L. monocytogenes* $\Delta degU$ (Abb. 53 B) keine Spots identifiziert werden, die deutlich und reproduzierbar stärker bzw. schwächer ausgeprägt waren als beim Wildtyp (Abb. 53 A).

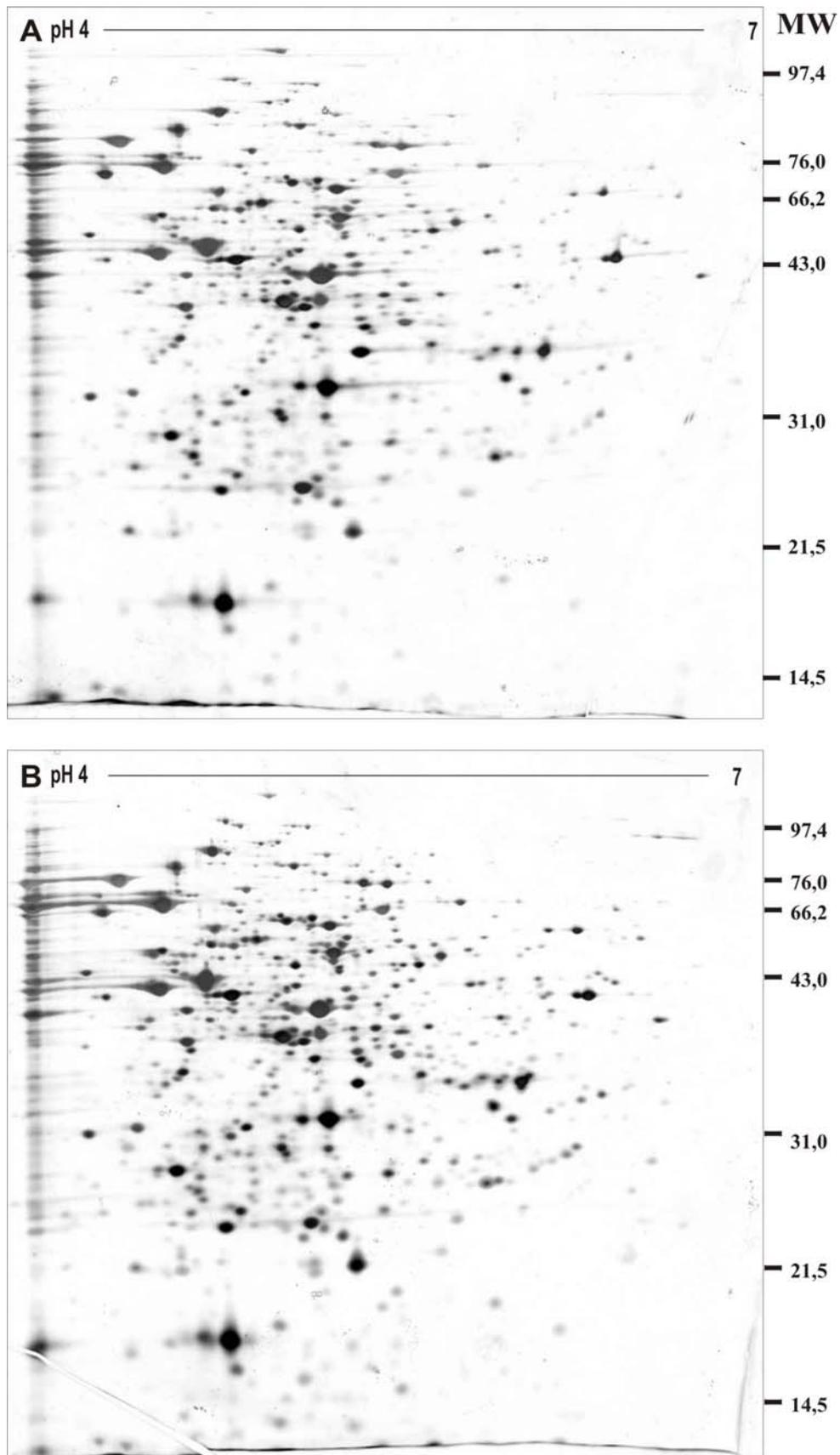


Abb. 53: Silbergefärbte 2D-Gele von bei 37°C kultivierten *L. monocytogenes* EGD (**A**) und *L. monocytogenes* $\Delta degU$ (**B**). Es wurden jeweils 75 μ g Protein aufgetragen. Rechts wurde ein Größenstandard angefügt. Im linken Bereich des Gels sind Proteine zu erkennen, die während der IEF nicht vollständig fokussiert wurden. MW: Molekulargewicht (kDa).

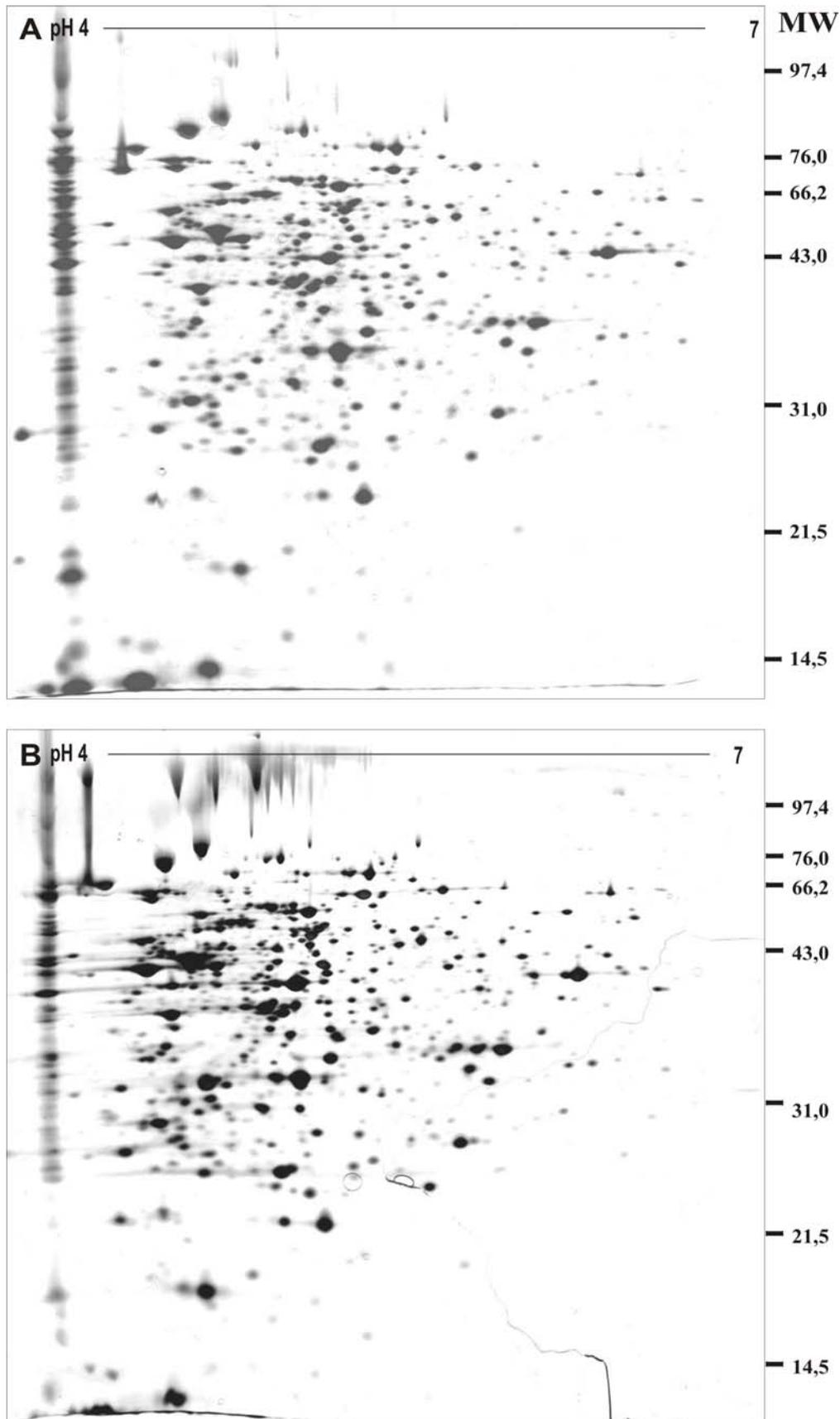


Abb. 54: Silbergefärbte 2D-Gele von bei 24°C kultivierten *L. monocytogenes* EGD (**A**) und *L. monocytogenes* $\Delta degU$ (**B**). Es wurden jeweils 75 μg Protein aufgetragen. Rechts wurde ein Größenstandard angefügt. Im linken Bereich des Gels sind Proteine zu erkennen, die während der IEF nicht vollständig fokussiert wurden. MW: Molekulargewicht (kDa).

In den Proteinmustern der 2D-Gele von bei 24° C kultivierten Stämme (Abb. 54) konnten ebenfalls keine zellulären Proteine ausgemacht werden, deren Expression in der $\Delta degU$ -Mutante (Abb 54 B) stärker oder schwächer erschien als im Wildtyp (Abb 54 A).

Die 2D-Gele in den Abbildungen 53 und 54 sind im Vergleich zu den folgenden 2D-Gele in Abb. 55-57 größer dargestellt um zu zeigen, dass zwischen den Proteinmustern auf diesen Gelen keine signifikanten Unterschiede zu sehen waren.

5.2.10.2 Proteinmuster der Überstandsproteine aus *L. monocytogenes* EGD und *L. monocytogenes* $\Delta degU$

Die Überstandsproteine von *L. monocytogenes* EGD und *L. monocytogenes* $\Delta degU$ wurden ebenfalls mittels 2DGE untersucht. Die entsprechenden Proteine wurden während der IEF in einem pH-Bereich von 4-7, in der anschließenden zweiten Dimension in einem 12 %-igen PAA Gel aufgetrennt.

Es konnten in den Proteinmustern der bei 37° C kultivierten Stämme reproduzierbar 7 Proteinspots detektiert werden, die in der $\Delta degU$ Deletionsmutante (Abb. 55 B) im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 55 A) stärker (Spot 1, 3, 4, 5 und 6, schwarze Pfeile) bzw. schwächer (Spot 2 und 7, rote Pfeile) exprimiert erschienen.

Um diese Proteine zu identifizieren, sollten sie nach der Extraktion aus dem Gel und tryptischem Verdau einer massenspektrometrischen Analyse unterzogen werden. Das Prinzip der angewandten Matrix-assistierten-Laser-Desorptions-Ionisation (MALDI) beruht darauf, dass die Proben in Kristalle einer Matrixsubstanz mit hohem UV-Absorptionsvermögen eingebaut werden. Das Proben-Matrix-Gemisch wird gezielt mit einem gepulsten Laserstrahl beschossen. Dies hat zur Folge, dass Protonen von der sauren UV-absorbierenden Matrixsubstanz auf die Probenmoleküle übertragen werden, wodurch diese positiv geladen werden. Diese Ionen werden in einem elektrischen Feld beschleunigt und überwinden eine feldfreie Driftstrecke bis zum Detektor. Aufgrund des spezifischen Masse- und Ladungsverhältnisses der Ionen erreichen diese individuelle Geschwindigkeiten und Flugzeiten, die mit dem Flugzeitanalysator TOF (time of flight) bestimmt werden.

Für die MALDI-TOF Analysen wurden neue 2D-Gele angefertigt. Es wurden je 600 µg Protein während der IEF in einem immobilisierten pH-Gradienten von 4-7 fokussiert und anschließend in einem 12 %-igen PAA-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Nach der Fixierung wurden die Gele mit kolloidalem Coomassie angefärbt. Durch die MALDI-TOF Analyse, durchgeführt von Herrn A. Bosserhoff (ZMBH der Universität Heidelberg), konnten 5 der 7 Proteine identifiziert werden. Sie sind in Tabelle 7 aufgeführt. Die Spots 5 und 7 waren in den eingeschickten Gelen zu schwach um die Proteine identifizieren. Es stellte sich heraus, dass es sich bei den in der Mutante stärker exprimierten Proteinen 1 und 4 um TufA (Lmo2653) bzw. Tsf (Lmo1657) handelt. Beide Proteine sind Mitglieder der Translationsmaschinerie (Berg *et al.*, 2002) und werden von den Genen *tufA* (*lmo2653*) und *tsf* (*lmo1657*) codiert. Spot 3 wurde als GAP (Lmo2459) identifiziert und wird von *gap* codiert. Diese Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase spielt eine zentrale Rolle in der Glykolyse bzw. im Calvin-Zyklus (Berg *et al.*, 2002).

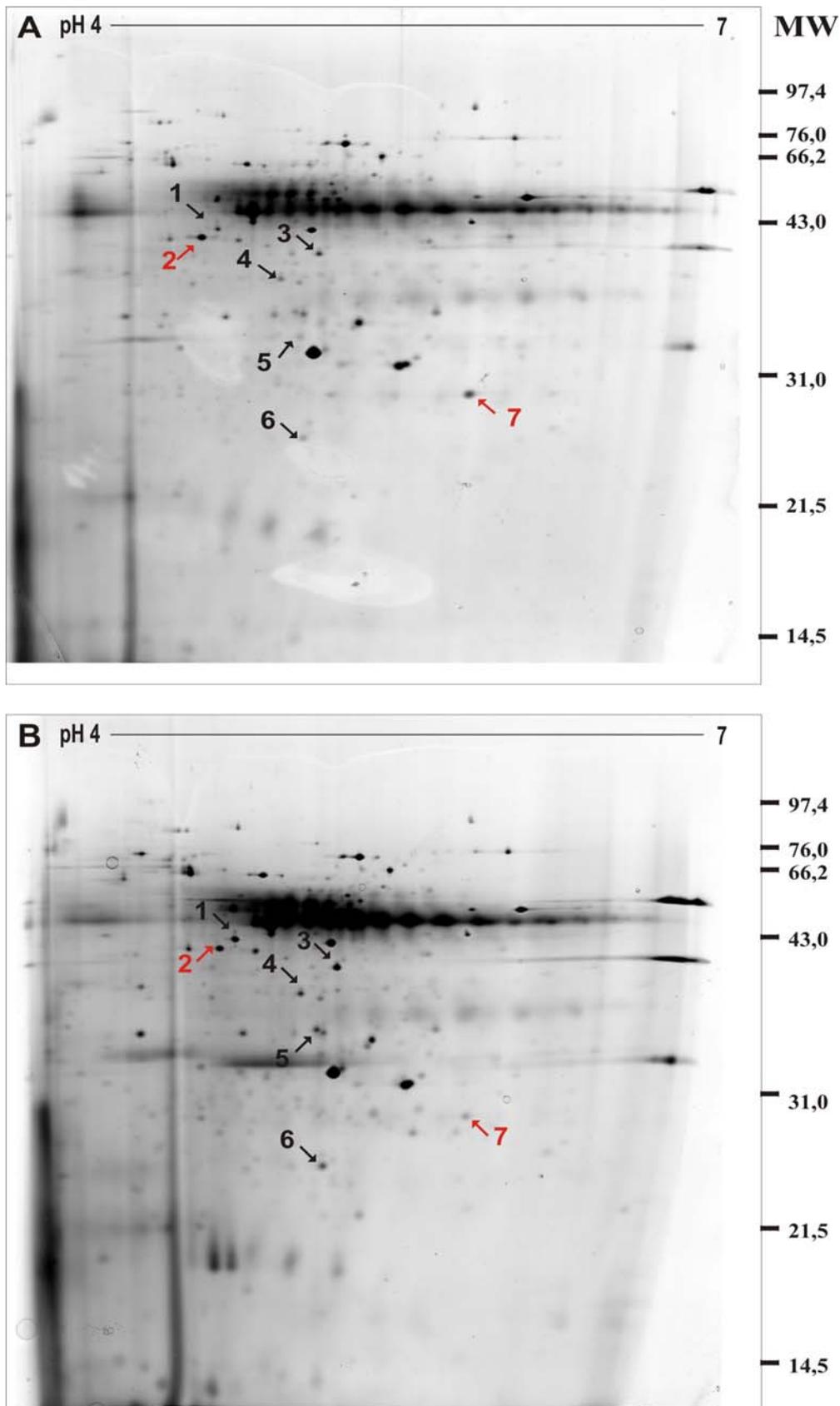


Abb. 55: Silbernitratgefärbte 2D-Gele von Überstandsproteinen aus bei 37° C kultivierten Listerien. **A:** *L. monocytogenes* EGD. **B:** *L. monocytogenes* $\Delta degU$. Pro Gel wurden 150 μ g Protein aufgetragen. Es konnten 5 Proteinspots identifiziert werden, die reproduzierbar in der Deletionsmutante im Vergleich zum Wildtyp stärker exprimiert erschienen (schwarze Pfeile), und 2 Proteine, die schwächer exprimiert erschienen (rote Pfeile). MW: Molekulargewicht (kDa).

Spot Nr. 6 wurde als Superoxid Dismutase SOD identifiziert und war ein in der $\Delta degU$ Mutante ebenfalls stärker exprimiertes Protein. SOD ist ein Antioxidanz welches die Umwandlung von Superoxid zu Sauerstoff und Wasserstoffperoxid katalysiert (Brehm *et al.*, 1992). Proteinspot 2, eines der beiden in der Mutante schwächer exprimierten Proteine, wurde als Lmo0699 identifiziert. Eine Funktion dieses Proteins wurde bisher nicht beschrieben. Warum diese 5 Proteine in der *L. monocytogenes* $\Delta degU$ -Mutante stärker bzw. schwächer exprimiert werden als in wildtypischen Bakterien, konnte noch nicht weiter geklärt werden.

Spot	Gene	Protein	MW	IP
1*	<i>TufA (lmo2653)</i>	stark homolog zum Translationselongationsfaktor EF-Tu	43 kDa	4.81
2	<i>lmo0644</i>	unbekannt, homolog zu konserviertem hypothetischem Protein anderer Organismen	69 kDa	5.42
3*	<i>gap (lmo2459)</i>	stark homolog zur Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase GAP	36 kDa	5.20
4*	<i>tsf (lmo1657)</i>	Translationselongationsfaktor	33 kDa	5.11
5*				
6*	<i>sod (lmo1439)</i>	Superoxid-Dismutase SOD	23 kDa	5.23
7				

Tab. 7: Massenspektrometrisch identifizierte DegU-regulierte extrazelluläre Proteine von *L. monocytogenes* EGD. Die Proteine wurden aus bei 37° C bis zur log-Phase kultivierten Bakterien isoliert. Die theoretischen Molekulargewichte und IP-Werte der Proteine wurden anhand der in der NCBI Protein Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez>) angegebenen Aminosäuresequenz mit dem ExPASy Proteomics-Werkzeug "Compute pI/Mw" (<http://www.expasy.ch>) berechnet. Putative Signalsequenz-Schnittstellen in den Proproteinen der identifizierten Proteine wurden mit dem ExPASy Proteomics-Werkzeug "SignalP" bestimmt. Das Sternchen beschreibt die Proteine, die in der $\Delta degU$ -Mutante im Vergleich zum Wildtyp stärker exprimiert wurden. Spots 5 und 7 waren zu schwach um die Proteine zu identifizieren. MW: Molekulargewicht; IP: isoelektrischer Punkt. kDa: Kilodalton

Die Überstandsproteine von bei 24° C kultivierten *L. monocytogenes* $\Delta degU$ wurden ebenfalls aufgetrennt und die Proteinmuster im 2D-Gel miteinander verglichen (Abb. 56). Im Proteinmuster der mit wildtypischen Proteinen beladenen Gele (Abb. 56 A) wurden einige signifikante Unterschiede zum Proteinmuster der Deletionsmutante detektiert: Eine ganze Reihe Proteinspots sind im mit $\Delta degU$ -Proteinen beladenen Gel (Abb. 56 B) deutlich schwächer. Aus der Vielzahl der Proteine wurden 11 ausgewählt (Abb. 56 A, rote Pfeile), die in der MALDI-TOF Analyse identifiziert werden sollten.

Die Ergebnisse dieser MALDI-TOF-Analyse sind in Tabelle 8 zusammengefasst. Bei den Proteinen, die in der $\Delta degU$ Mutante nicht exprimiert werden, handelt es sich fast ausschließlich um Proteine die am Aufbau der Flagelle beteiligt sind: Das Hauptprotein FlaA (Lmo0690, Spots 4 und 5), die Hakenproteine FlgE (Lmo0697, Spot 1) und FlgL (Lmo0706, Spots 6 und 7) sowie die Basalkörperproteine FlgG, FlgC und FlgB (Lmo0682, Lmo0711 und Lmo0710, Spots 9, 10 und 11). Diese Ergebnisse erklären die Beobachtung wonach die $\Delta degU$ -Mutante im Motilitätstest temperaturunabhängig unbeweglich ist und im Elektronenmikroskop keine Flagellen besitzt.

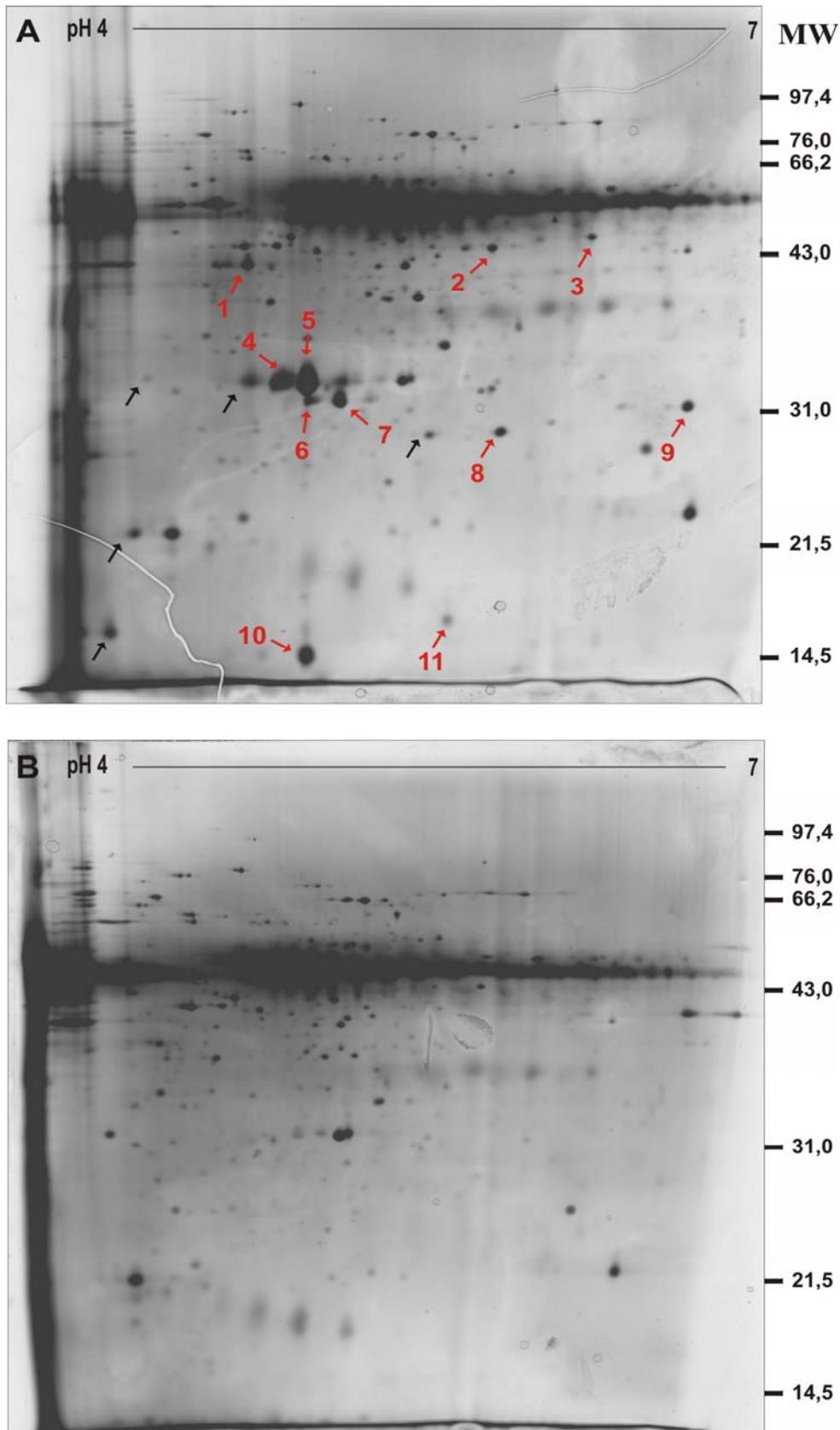


Abb. 56: Silbernitratgefärbte 2D-Gele.

Jedes Gel war mit 150 µg Überstandsproteinen von bei 24° C gewachsenen *L. monocytogenes* EGD (**A**) oder *L. monocytogenes* $\Delta degU$ (**B**) beladen. Die Proteine wurden während der IEF für 63.000 Vh in einem pH Bereich von 4 - 7 fokussiert und über Nacht bei 90 V in der SDS-PAGE aufgetrennt. Es sind in A deutliche Proteinspots zu erkennen (Pfeile), die in B fehlen bzw. deutlich

schwächer exprimiert sind. Die Proteinspots, die für eine MALDI-TOF-Analyse ausgesucht wurden, sind mit roten Pfeilen und Nummern markiert. MW: Molekulargewicht (kDa).

Spot 6 wurde als Mischung des Flagellenhaken-assoziierten Proteins 3, FlgL, und einem Protein mit Homologie zu einem Phagen-Protein identifiziert. Offensichtlich setzte sich Spot 6 aus mehreren Proteinen zusammen. Die Expression einer Transglykosylase (Lmo0717, Spot 8) wird ebenfalls durch die Deletion von DegU beeinflusst, da der Spot im Proteinmuster der Mutante nicht aufzufinden war. Über die Funktion von Lmo0695 (Spot 2) ist bisher noch nichts bekannt. Warum ein Penicillin-Bindungsprotein (Lmo2754, Spot 3) zusammen mit Flagellenproteinen in wildtypischen *Listerien* stärker exprimiert erschien, konnte nicht geklärt werden.

Spot	Gen	Protein	MW	IP
1	<i>lmo0697</i>	homolog zum Flagellen Hakenprotein FlgE	43 kDa	4.75
2	<i>lmo0695</i>	Lmo0695	39 kDa	5.47
3	<i>lmo2754</i>	homolog zu Penicillin-Bindungsprotein	47 kDa	5.67
4	<i>flaA (lmo0690)</i>	Flagellin	30 kDa	4.91
5	<i>flaA (lmo0690)</i>	Flagellin	30 kDa	4.91
6	<i>lmo0706</i>	homolog zum Flagellenhaken assoziierten Protein 3 FlgL	32 kDa	5.03
		homolog zu Phagenprotein		4.97
7	<i>lmo0706</i>	homolog zum Flagellenhaken assoziierten Protein 3 FlgL	32 kDa	5.03
8	<i>lmo0717</i>	homolog zu einer Transglykosylase	24 kDa	5.59
9	<i>lmo0682</i>	homolog zum Flagellen Haken Basalkörperprotein FlgG	28 kDa	6.20
10	<i>lmo0711</i>	homolog zum Flagellen Basalkörper Schaftprotein FlgC	15 kDa	4.97
11	<i>lmo0710</i>	homolog zum Flagellen Basalkörper Schaftprotein FlgB	14 kDa	5.60

Tabelle 8: Durch Massenspektrometrie identifizierte, DegU-regulierte extrazelluläre Proteine von *L. monocytogenes* EGD.

Die Proteine wurden aus bei 24° C bis zur log-Phase kultivierten Bakterien isoliert. Bei Spot 6 handelte es sich um einen Mix aus mindestens zwei Proteinen. Die theoretischen Molekulargewichte und IP-Werte der Proteine wurden anhand der in der NCBI Protein Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez>) angegebenen Aminosäuresequenz mit dem ExPASy Proteomics-Werkzeug "Compute pI/Mw" (<http://www.expasy.ch>) berechnet. Putative Signalsequenz-Schnittstellen in den Proproteinen der identifizierten Proteine wurden mit dem ExPASy Proteomics-Werkzeug "SignalP" bestimmt. MW: Molekulargewicht; IP: isoelektrischer Punkt. kDa: Kilodalton.

Da der im Zuge dieser Arbeit verwendete *L. monocytogenes* EGD Stamm auch bei der für die Flagellensynthese nicht-permissiven Temperatur von 37° C noch Flagellen aufwies, wurden außerdem noch die Proteinmuster von bei 24° C und 37° C kultivierten *L. monocytogenes* EGD miteinander verglichen (Abb. 57).

Entgegen den Erwartungen bestätigten sich die Angaben aus der Literatur (Dons *et al.*, 1992) wonach die für den Flagellenaufbau notwendigen Proteine bei 37° C nicht mehr synthetisiert werden und die Flagellensynthese ein temperatur-regulierter Prozess ist: Die jeweiligen Proteine, die in der vorhergegangenen MS-Analyse als Flagellenproteine identifiziert wurden, werden ausschließlich bei 24° C exprimiert (Abb. 57 A). Sie waren im Proteinmuster der bei 37° C kultivierten

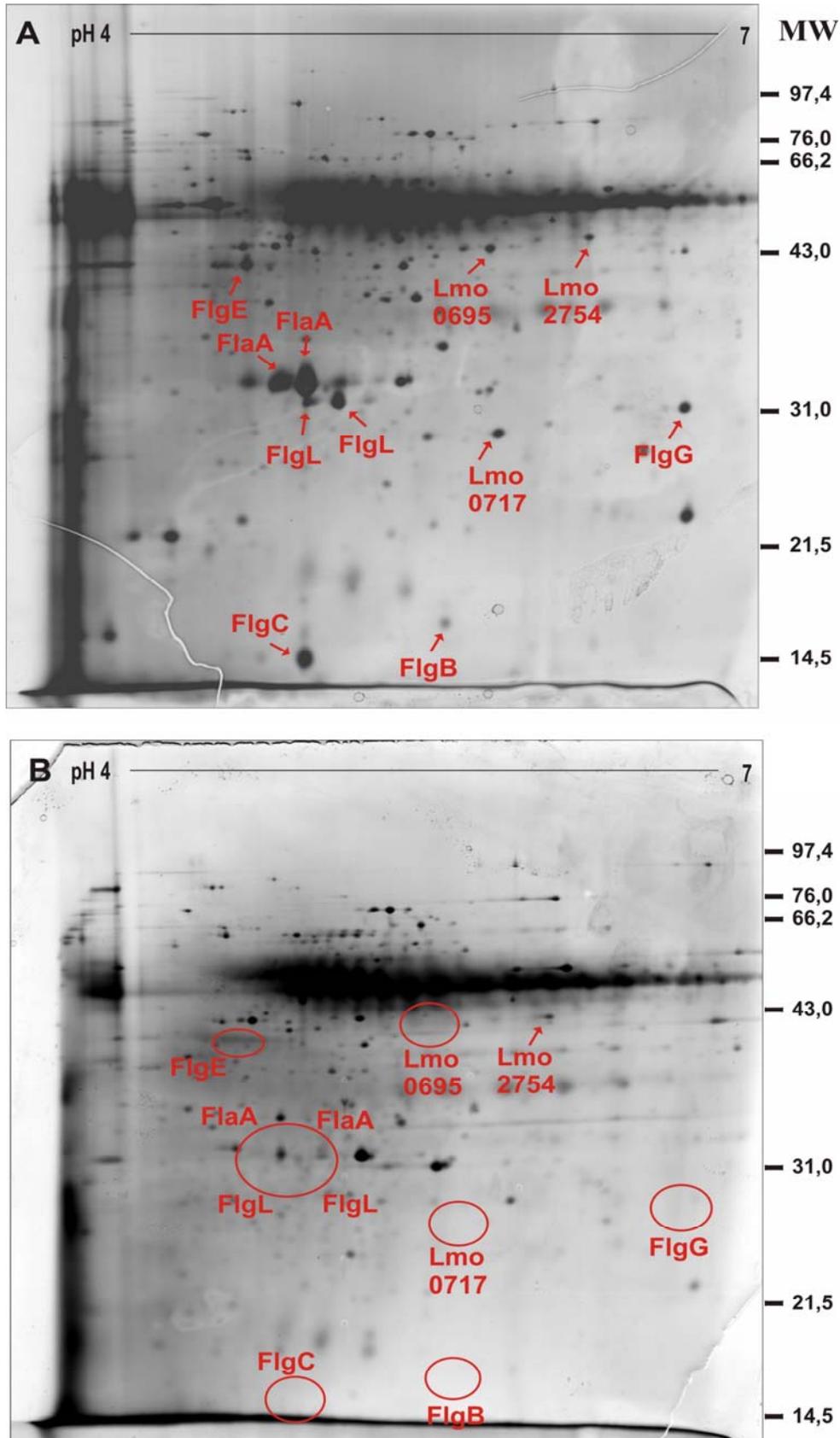


Abb. 57: 2D-Gele von Überstandsproteinen aus *L. monocytogenes* EGD, die bei 24° C (**A**) und 37° C (**B**) kultiviert wurden.

Es wurden pro Gel 150 µg Protein aufgetrennt. In A sind die Proteine benannt, die in der vorausgegangenen MALDI-TOF-Analyse identifiziert wurden. In B sind genau die Positionen auf dem Gel rot markiert, die denen dieser Proteine entsprechen. MW: Molekulargewicht (kDa).

Listerien (Abb. 57 B) nicht oder kaum mehr zu detektieren. Lediglich das Penicillin-Bindungsprotein Lmo2754 wird temperaturunabhängig exprimiert. Die Beobachtung, dass der hier verwendete *L. monocytogenes* EGD bei 37° C auf semi-Weichagar beweglich ist, die Flagellengene, wie in den Proteom- und Transkriptomanalysen gezeigt, jedoch nicht mehr exprimiert werden könnte darauf zurückzuführen sein, dass die Flagellensynthese in Abhängigkeit der Kultivierungsmethode eingestellt wird.

5.2.11 Identifizierung von Zielgenen des Response Regulators DegU mittels Transkriptomanalyse

Um die Ergebnisse der Proteomanalysen zu bestätigen und weitere DegU-regulierte Gene zu identifizieren, wurden mittels Microarray-Analysen die Transkriptome von *L. monocytogenes* $\Delta degU$ und *L. monocytogenes* EGD miteinander verglichen. Für diese Analysen wurde RNA aus den beiden Stämmen isoliert und davon cDNA synthetisiert. Durch die Zugabe von zwei unterschiedlichen Fluorochromen wurde die cDNA während der reversen Transkription markiert. Der Mikroarray, auf dem Fragmente des listeriellen Genoms in Form synthetischer Oligonukleotide hybridisiert waren, wurde dann mit beiden cDNAs hybridisiert und anschließend für jeden Punkt des Arrays die Signalstärke mit einem Scanner bestimmt. Die Differenz zwischen den Signalen wurde mittels einer Software bestimmt und so eine Aussage über die Unterschiede im Expressionsmuster erhalten.

In Tabelle 9 ist ein Ausschnitt aus der Liste von Genen von *L. monocytogenes* EGD dargestellt, deren Transkription bei 24° C durch DegU reguliert wird. Eine vollständige Auflistung DegU-regulierter Gene befindet sich im Anhang. Es handelt sich bei den angegebenen normalisierten Genexpressionswerten jeweils um Durchschnittswerte aus vier unabhängigen Experimenten. Die Ausschluß-Grenzen wurden bei 2 bzw. 0,5 gesetzt, d.h. Gene mit Expressionswerten > 2 wurden als in *L. monocytogenes* EGD stärker, Gene mit Expressionswerten < 0,5 als schwächer exprimiert betrachtet.

Die Expressionswerte von *degU* und einiger Virulenzgene sind am unteren Ende der Tabelle mit aufgelistet. Wie erwartet zeigte sich die Expression der einzelnen Gene von LIPI-1 als nicht beeinflusst, ihre Expressionswerte lagen alle zwischen 0,5 und 2. Das bedeutet, dass die berechnete Transkriptmenge dieser Gene im Wesentlichen in beiden Stämmen vergleichbar war.

Name	Gen ID	Funktion	Klassifizierung	\emptyset WT/ $\Delta degU$
Lmo0685	<i>lmo0685</i>	Unbekannt, homolog zum Flagellenmotorprotein MotA	Motilität und Chemotaxis	22,07
MotB	<i>lmo0686</i>	Unbekannt, homolog zu Flagellenmotorprotein MotB	Motilität und Chemotaxis	4,46
CheY	<i>lmo0691</i>	Chemotaxis Response Regulator	Regulation	4,53
CheA	<i>lmo0692</i>	Zweikomponentensystem Histidin Kinase CheA	Sensor	26,47
Lmo0696	<i>lmo0696</i>	Unbekannt, homolog zu Flagellenhakenprotein	Motilität und Chemotaxis	19,43
Lmo0697	<i>lmo0697</i>	Unbekannt, homolog zu Flagellenhakenprotein FlgE	Motilität und Chemotaxis	15,29
Lmo0698	<i>lmo0698</i>	Unbekannt, schwach homolog zu Flagellenschalterprotein	Motilität und Chemotaxis	21,83
Lmo0699	<i>lmo0699</i>	Unbekannt, homolog zum Flagel-	Motilität und	19,78

Ergebnisse

Lmo0700	<i>lmo0700</i>	lenschalterprotein FliM	Chemotaxis		
		Unbekannt, homolog zum Flagellen	Motilität	und	19,82
Lmo0705	<i>lmo0705</i>	Motorschalterprotein FliY	Chemotaxis		
		Unbekannt, homolog zum	Motilität	und	10,73
		Flagellen-assoziiertem Protein	Chemotaxis		
Lmo0706	<i>lmo0706</i>	FlgK	Motilität	und	16,30
		Unbekannt, homolog zum Flagel-	Chemotaxis		
		len-assoziiertem Protein 3 FlgL	Motilität	und	16,19
Lmo0707	<i>lmo0707</i>	Unbekannt, homolog zum Flagel-	Chemotaxis		
		len-assoziiertem Protein 2 FliD	Motilität	und	17,46
Lmo0708	<i>lmo0708</i>	Unbekannt, homolog zu hypothe-	Chemotaxis		
		tischem Protein	Motilität	und	15,86
Lmo0710	<i>lmo0710</i>	Unbekannt, homolog zum Flagellen	Chemotaxis		
		Basalkörperprotein FlgB	Motilität	und	9,22
Lmo0711	<i>lmo0711</i>	Unbekannt, homolog zum Flagellen	Chemotaxis		
		Basalkörperprotein FlgC	Motilität	und	9,93
Lmo0712	<i>lmo0712</i>	Unbekannt, homolog zum	Chemotaxis		
		Flagellenhaken-Körperkomplex-	Motilität	und	15,57
		protein FliE	Chemotaxis		
Lmo0713	<i>lmo0713</i>	Unbekannt, homolog zum	Motilität	und	8,84
		Flagellen- Basalkörper M-Ring-	Chemotaxis		
		Protein FliF	Motilität	und	8,81
Lmo0714	<i>lmo0714</i>	Unbekannt, homolog zum	Chemotaxis		
		Flagellenmotor Schalterprotein FliG	Motilität	und	8,62
Lmo0716	<i>lmo0716</i>	Unbekannt, homolog zur H ⁺ -	Chemotaxis		
		transportierenden ATP-Synthase-	Motilität	und	7,16
		Alphakette FliL, Flagellenspezifisch	Chemotaxis		
Lmo1699	<i>lmo1699</i>	Unbekannt, einige Homologien zu	Motilität	und	14,60
		Methyl-akzeptierendem	Chemotaxis		
		Chemotaxisprotein	Motilität	und	16,63
Lmo0676	<i>lmo0676</i>	Unbekannt, homolog zum Flagel-	Chemotaxis		
		lenbiosyntheseprotein FliP	Motilität	und	26,47
Lmo0677	<i>lmo0677</i>	Unbekannt, homolog zum Flagel-	Chemotaxis		
		lenbiosyntheseprotein FliQ	Motilität	und	19,24
Lmo0678	<i>lmo0678</i>	Unbekannt, homolog zum Flagel-	Chemotaxis		
		lenbiosyntheseprotein FliR	Motilität	und	13,35
Lmo0679	<i>lmo0679</i>	Unbekannt, homolog zum Flagel-	Chemotaxis		
		lenbiosyntheseprotein FlhA	Motilität	und	12,87
Lmo0680	<i>lmo0680</i>	Unbekannt, homolog zum Flagel-	Chemotaxis		
		lenassoziierten Protein FlhA	Motilität	und	10,43
Lmo0681	<i>lmo0681</i>	Unbekannt, homolog zum Flagel-	Chemotaxis		
		lenbiosyntheseprotein FlhF	Motilität	und	13,93
Lmo0682	<i>lmo0682</i>	Unbekannt, homolog zum Flagel-	Chemotaxis		
		lenhaken-Basalkörperprotein FlgG	Motilität	und	16,55
Lmo0683	<i>lmo0683</i>	Unbekannt, homolog zur chemo-	Chemotaxis		
		taktischen Methyltransferase CheR	Motilität	und	14,15
Lmo0689	<i>lmo0689</i>	Unbekannt, homolog zum CheA-	Chemotaxis		
		aktivitätsregulierenden Protein	Motilität	und	5,61
		CheV	Chemotaxis		
FlaA	<i>lmo0690</i>	Flagellin	Regulation		1,05
Lmo0693	<i>lmo0693</i>	Unbekannt, homolog zum Flagel-	Verschiedene		1,12
		lenschalterprotein FliY, C-termi-			
		naler Teil			
Lmo0723	<i>lmo0723</i>	Unbekannt, homolog zu Methyl-			
		akzeptierendem Protein			
DegU	<i>lmo2515</i>	Stark homolog zum <i>B. subtilis</i>			
		Response Regulator DegU			
PrfA	<i>lmo0200</i>	Listeriolysin-positives			
		regulatorisches Protein			
Hly	<i>lmo0202</i>	Listeriolysin O-Vorläufer			

Mpl	<i>Imo0203</i>	Zink-Metalloprotease Vorläufer	Stoffwechsel von AS und ähnlichen Moleküle	1,30
ActA	<i>Imo0204</i>	Aktinpolymerisation-induzierender Vorläufer	Oberflächenprotein	1,07
PlcB	<i>Imo0205</i>	Phospholipase C	Fettstoffwechsel	0,98
InlA	<i>Imo0433</i>	Internalin A	Oberflächenprotein	1,5
InlB	<i>Imo0434</i>	Internalin B	Oberflächenprotein	1,57

Tabelle 9: Tabellarische Auflistung der Motilitäts- und Chemotaxisgene, die bei 24° C in *L. monocytogenes* EGD DegU-abhängig exprimiert werden. DegU-unabhängig exprimierte Virulenzgene, sowie der Expressionswert für *degU* sind ebenfalls gelistet.

Eine vollständige Liste aller DegU-regulierten Gene befindet sich im Anhang. Name: Proteinbezeichnung laut ListiList (<http://genolist.pasteur.fr/ListiList/>). Gen ID: Genidentifikationsnummer laut ListiList. Proteine bzw. Gene, die auf Proteinebene als DegU-reguliert identifiziert wurden, sind fett dargestellt. Für die Auswertung wurden die Ausschluß-Grenzen auf 0,5 bzw. 2 festgelegt. d.h. bei Expressionswerten > 2 gelten die Gene als stärker, bei Expressionswerten < 0,5 als schwächer exprimiert. Gene mit dazwischenliegenden Expressionswerten gelten als gleich stark exprimiert.

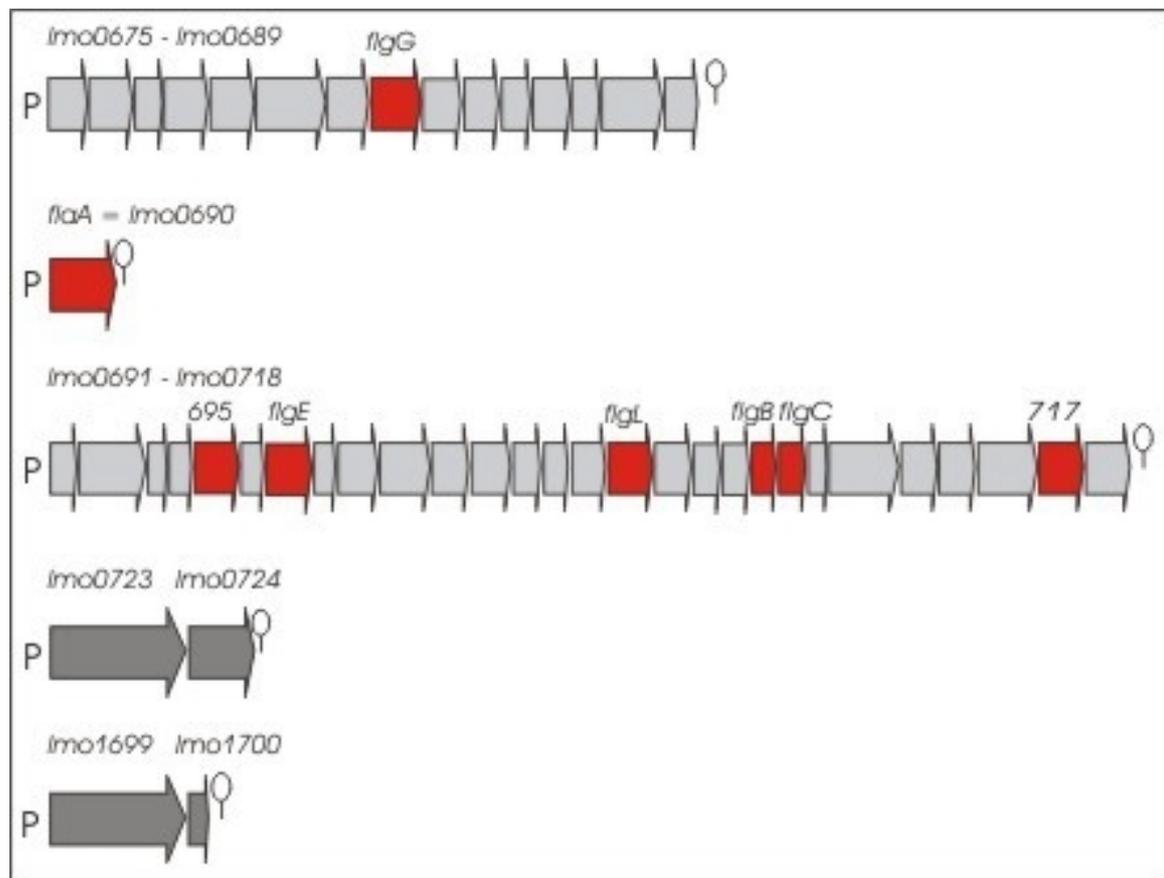


Abb. 58: Anordnung der Flagellen-Gene auf dem Chromosom.

Bei den roten Pfeilen handelt es sich um die Gene der Proteine, die bei 24° C im Proteom von *L. m.* EGD stärker exprimiert wurden als in der Deletionsmutante $\Delta degU$. P = Promotor. † = Terminator.

Diese Ergebnisse decken sich mit denen der Westernblot-Analysen, wonach eine Deletion des RR-Gens *degU* keinen Einfluss auf die Expression verschiedener Virulenzfaktoren hat (s. 5.2.6, Abb. 45). Der Expressionswert von 5,61 für

lmo2515 erklärt sich dadurch, dass dieses Gen in der *degU*-Mutante deletiert ist, im Wildtyp jedoch exprimiert wird. Die ermittelte Menge an *degU*-spezifischer mRNA ist damit automatisch in *L. monocytogenes* EGD gegenüber der Mutante erhöht. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Proteomanalyse ist die Transkription flagellenspezifischer Gene bei 24° C in *L. monocytogenes* EGD im Vergleich zur Mutante stark erhöht.

Neben den bereits auf Proteinebene identifizierten, DegU-regulierten Genen, die in Tabelle 9 in fetter Schrift hervorgehoben sind, konnte über die Transkriptom-analyse eine Reihe weiterer Gene identifiziert werden, die ebenfalls unter der Kontrolle dieses RR stehen (Tab. 9). Bei den meisten dieser DegU-regulierten Gene handelt es sich um solche, die für Flagellenproteine codieren oder an der Chemotaxis beteiligt sind. Betrachtet man die Anordnung dieser Gene auf dem Chromosom (Abb. 58), so ist ersichtlich, dass sie bis auf *lmo1699* und *lmo0723* in zwei großen Flagellenbiosynthese- und Chemotaxis-Operons angeordnet sind. Das ebenfalls in *L. monocytogenes* EGD massiv verstärkt transkribierte Gen *flaA* liegt zwischen diesen beiden Operons.

Name	Gen ID	Funktion	Klassifizierung	Ø WT/ Δ <i>degU</i>
Lmo0256	<i>lmo0256</i>	Unbekannt, konserviertes hypothetisches Protein	homolog zu unbekanntem Protein anderer Organismen	2,54
Lmo0280	<i>lmo0280</i>	Unbekannt, stark homolog zum anaerobischen Aktivator der Ribonukleotidreduktase	Nukleotid- und Nukleinsäure Stoffwechsel	4,61
Lmo0415	<i>lmo0415</i>	Unbekannt, homolog zur Endo-1,4,β-Xylanase	Kohlenhydratstoffwechsel	7,47
Lmo0540	<i>lmo0540</i>	Unbekannt, homolog zu Penicillin Bindungsprotein	Zellmembran und zelluläre Prozesse	11,19
Lmo0644	<i>lmo0644</i>	Unbekannt, homolog zu konserviertem hypothetischem Protein	homolog zu unbekanntem Protein anderer Organismen	2,09
Lmo0811	<i>lmo0811</i>	Unbekannt, homolog zur Carboanhydrase	Kohlenhydratstoffwechsel	0,29
Lmo0814	<i>lmo0814</i>	Unbekannt, homolog zur Oxidoreduktase	Kohlenhydratstoffwechsel	0,50
Lmo1257	<i>lmo1257</i>	Unbekannt	Keine Ähnlichkeit	2,65
Lmo1291	<i>lmo1291</i>	Unbekannt, homolog zur Acyltransferase	Zellmembran und zelluläre Prozesse	1,8
Lmo1634	<i>lmo1634</i>	Unbekannt, homolog zur Alkohol-Acetaldehyd Dehydrogenase	Kohlenhydratstoffwechsel	3,9
Lmo1799	<i>lmo1799</i>	Unbekannt, putatives Peptidoglykan gebundenes Protein (LPXTG-Motiv)	Oberflächenprotein	0,26
Lmo2515 (DegU)	<i>lmo2515 (degU)</i>	Unbekannt, homolog zum <i>B. subtilis</i> Response Regulator DegU	Regulation	9,03
Lmo2675	<i>lmo2675</i>	Unbekannt	Keine Ähnlichkeit	2,59
Lmo2676	<i>lmo2676</i>	Unbekannt, homolog zu UV-Schaden Reparaturprotein	DNA Restriktion/Modifikation und Reparatur	1,81
CydA	<i>lmo2718</i>	Unbekannt, stark homolog zur Cytochrom D Ubiquinol Oxidase-Untereinheit I	Membran Bioenergetik (Elektronentransportkette und ATP-Synthase)	1,85

Lmo2719	<i>lmo2719</i>	Unbekannt, konserviertes hypothetisches Protein	homolog zu unbekanntem Protein anderer Organismen	2,07
Lmo2806	<i>lmo2806</i>	Unbekannt, hypothetisches sekretiertes Protein.	homolog zu unbekanntem Protein von <i>Listeria</i>	0,44

Tabelle 10: Tabellarische Auflistung DegU-regulierter Gene bei 37° C.

Proteine, die über die Proteomanalyse als unterschiedlich exprimiert erschienen, sind in fett hervorgehoben.

Die Ergebnisse weiterer Transkriptomanalysen (Tab. 10) sprechen dafür, dass bei 37° C in *L. monocytogenes* EGD deutlich weniger Gene durch DegU reguliert werden, als bei 24° C. Der Expressionswert für *degU* war auch hier wie erwartet > 2. Die Ergebnisse der Proteomanalyse bei 37° C konnten nicht alle bestätigt werden. Es wäre zu erwarten gewesen, dass sich die Gene der Proteine, die im Proteinmuster von *L. monocytogenes* EGD schwächer (*tufA*, *gap*, *tsf* und *sod*) exprimiert wurden, im Microarray ebenfalls als schwächer exprimiert zeigen. Die Expressionswerte dieser Gene lagen jedoch zwischen 0,5 und 2, waren also nicht-reguliert. Lediglich für *lmo0644* decken sich die Aussagen der Proteom- und Transkriptomanalyse.

6 Diskussion

6.1 Untersuchungen zur Rolle von Stathmin bei einer Infektion mit *L. monocytogenes*

Interaktionen zwischen Bakterium und Wirtszelle bzw. bakteriellen und wirtszell-eigenen Proteinen spielen eine wichtige Rolle im Lebenszyklus pathogener Bakterien. Über das Yeast Two-Hybrid System wurden das Kernprotein LaXp180 und das Phosphoprotein Stathmin als Interaktionspartner identifiziert (Maucuer *et al.*, 1995). Pfeuffer *et al.* konnten ebenfalls mit Hilfe dieses genetischen Systems das listerielle Oberflächenprotein ActA und LaXp180 als Interaktionspartner identifizieren und anhand von Immunfluoreszenzanalysen zeigen, dass LaXp180 mit intrazellulären ActA-exprimierenden *L. monocytogenes* kolokalisiert. Darüber hinaus konnte auch eine ActA-abhängige Kolokalisation von Stathmin und intrazellulären Listerien gezeigt werden (Pfeuffer *et al.*, 2000).

Stathmin, ein 19 kDa Phosphoprotein, reguliert im Verlauf des Zellzyklus die Dynamik von Mikrotubuli (MT), indem es entweder die Polymerisierung von $\alpha\beta$ -Tubulinheterodimeren hemmt oder die Depolymerisierung der MT fördert (Mitchison *et al.*, 1996; Howell *et al.*, 1999; Rubin und Atweh, 2004). Der Aktivitätszustand von Stathmin wird während des Zellzyklus durch spezifische Kinasen in Abhängigkeit von externen und internen Signalen über Phosphorylierung vier spezifischer Serinreste reguliert. Im hyperphosphorylierten Zustand ist Stathmin inaktiv und wird erst durch Dephosphorylierung mittels einer Phosphatase in seine aktive, MT-destabilisierende Form überführt (Lovric *et al.*, 1998; Marklund *et al.*, 1994; Rubin und Atweh, 2004).

Das listerielle Oberflächenprotein ActA besitzt eine Schlüsselfunktion bei der Polymerisierung wirtszelleigenen Aktins zur intra- und interzellulären Fortbewegung der Listerien. In einer früheren Arbeit (Williams, 2001) wurde unter anderem überprüft, ob durch die über ActA- und LaXp180-vermittelte Rekrutierung von Stathmin an die bakterielle Oberfläche dessen Phosphorylierungszustand in sofern beeinflusst wird, dass es in seiner dephosphorylierten, aktiven Form vorliegt. Es wurde diskutiert, ob die über ActA und LaXp180 rekrutierten Stathminmoleküle aufgrund ihrer MT-destabilisierenden Aktivität das MT-Gerüst im Zytoplasma der Wirtszelle lokal depolymerisieren und dadurch den Listerien eine ungehinderte Fortbewegung und bessere Ausbreitung in Nachbarzellen ermöglichen (Pfeuffer, 2000). Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde zunächst versucht den Phosphorylierungsgrad von Stathmin in infizierten und nicht-infizierten Zellen zu erfassen (Williams, 2001). Es konnten nach 2D-gelelektrophoretischer Auftrennung in Lysaten infizierter und nicht-infizierter Fibroblasten vier Isoformen von Stathmin detektiert werden, wobei jedoch keine Unterschiede in deren Muster zwischen infizierten und nicht-infizierten Zellen beobachtet werden konnte.

In der vorliegenden Arbeit wurde nun zunächst versucht eine Methode zu etablieren, die es ermöglichen sollte, eventuelle Veränderungen im Phosphorylierungsmuster von Stathmin im Zuge einer listeriellen Infektion genauer zu erfassen. Da Stathmin im Verlauf des Zellzyklus entweder phosphoryliert oder dephosphoryliert vorliegt, wurden Cos-1 Fibroblasten mittels eines Doppel-Thymidin-Blocks synchronisiert und anschließend infiziert. Es

wurde angenommen, dass durch eine Synchronisierung der Zellen Stathmin in allen Zellen der Zellpopulation in einem einheitlichen Phosphorylierungsmuster vorliegt. Durch 2D-Gelelektrophorese und anschließender Stathmin-Detektion mittels Westernblot-Analysen sollte geklärt werden, ob während einer Infektion der synchronisierten Zellen die Interaktion zwischen Stathmin und *L. monocytogenes* eine nachweisbare Veränderung des Phosphorylierungsgrades von Stathmin bewirkt. Diese Frage konnte jedoch nicht beantwortet werden, da die synchronisierten Zellen bei der Infektion mit *L. monocytogenes* innerhalb kurzer Zeit abstarben. Bisher wurden in der Literatur noch keine Infektionsversuche an synchronisierten Zellen beschrieben wodurch diese Beobachtung hätte erklärt werden können. Es gibt jedoch mehrere Hinweise darauf, dass Infektionen mit *L. monocytogenes* aufgrund der porenbildenden Funktion des LLO in vielen Zelltypen, darunter Dendritische Zellen (Guzman *et al.*, 1996), Lymphozyten (Merrick *et al.*, 1997) und Hepatozyten (Rogers *et al.*, 1996), zur Apoptose der Wirtszellen führen. Möglicherweise führt also eine Infektion mit *L. monocytogenes* bei den im Vorfeld bereits durch den Doppel-Thymidin-Block gestressten Cos-1 Fibroblasten dazu, dass auch in diesen Zellen die Apoptose induziert wird.

Shigellen und Salmonellen werden - im Gegensatz zum "zipper-like" Aufnahme-mechanismus von Listerien und Yersinien - über einen so genannten "trigger" Mechanismus von normalerweise nicht-phagozytischen Zellen aufgenommen (Finlay *et al.*, 1991; Mengaud *et al.*, 1996). Durch die Sekretion verschiedener Effektorproteine über ein Typ III Proteinsekretionssystem in das Zytoplasma der Wirtszelle wird bei Shigellen und Salmonellen ein "membrane ruffling" ausgelöst was zur Makropinozytose der Bakterien führt (Yoshida und Sasakawa, 2003). VirA wurde bei Shigellen als eines dieser injizierten Effektorproteine identifiziert (Yoshida *et al.*, 2002). Eine seiner Funktionen ist, durch die Interaktion mit der α -Untereinheit von $\alpha\beta$ -Tubulinheterodimeren eine lokale Depolymerisierung des submembranen MT-Gerüsts zu induzieren. Dies führt unter anderem zur Modulation des Aktin-Gerüsts im Bereich der Zellmembran, wodurch diese Ausstülpungen bildet, die über dem Bakterium fusionieren (Yoshida *et al.*, 2002). *virA*-Mutanten weisen daher eine 20-30 % niedrigere Invasivität auf als wildtypische Shigellen, was die Wichtigkeit dieses Proteins für die induzierte Aufnahme der Bakterien durch nicht-phagozytische Wirtszellen verdeutlicht. Bei enteropathogenen *E. coli* (EPEC) wurde kürzlich ein Protein identifiziert, das Homologie zu VirA aufweist und ebenfalls MT-destabilisierende Aktivität besitzt (Tomson *et al.*, 2005). Für dieses EspG-geannte Protein wird eine ähnliche Funktion diskutiert wie für VirA der Shigellen, da ein *S. flexneri* $\Delta virA$ -Stamm nach der Komplementation mit EPEC-*espG* eine Invasionsrate aufweist, die sich von denen wildtypischer Shigellen nicht unterscheidet (Tomson *et al.*, 2005). Doppelimmunfluoreszenzanalysen an *S. flexneri*-infizierter Zellen mit anti-VirA- und anti-Tubulin-Antikörpern zeigten, dass das an der Invasionsstelle in das Zytoplasma der WZ injizierte VirA hauptsächlich um zerstörte MT herum lokalisiert ist. Bei beweglichen intrazellulären Shigellen sind VirA sowie abgebaute MT in der unmittelbaren Umgebung der Bakterien nachweisbar (Yoshida *et al.*, 2003). Man kann daher spekulieren, dass VirA nicht nur die Aufnahme der Shigellen begünstigt, sondern eventuell auch deren intra- und interzelluläre Beweglichkeit verbessert. Durch den lokalen Abbau von Tubulinfilamenten in der Nähe der Bakterien könnte eine sterische Hemmung der

Bewegung durch MT reduziert und eine Ausbreitung der Shigellen von Zelle zu Zelle begünstigt werden (Yoshida *et al.*, 2002; Yoshida und Sasakawa, 2003). Im Genom von *L. monocytogenes* konnte kein Gen identifiziert werden, welches für ein Protein mit Homologie zu VirA oder EspG codiert. Es konnte jedoch eine Kolokalisation zwischen intrazellulären ActA-exprimierenden Listerien und Stathmin nachgewiesen werden (Pfeuffer *et al.*, 2000). Da Stathmin ähnlich wie VirA eine Destabilisierung der MT durch Interaktion mit der α -Untereinheit der $\alpha\beta$ -Tubulinheterodimere auslösen kann (Tomson *et al.*, 2005), wurde spekuliert, dass durch die Rekrutierung dieses zelluläre Phosphoprotein an die bakterielle Oberfläche die MT in der Nähe der Listerien depolymerisiert werden, um die intra- und interzelluläre Ausbreitung der Bakterien zu erleichtern (Pfeuffer, 2000). In der hier vorliegenden Arbeit wurden mittels Doppelimmunfluoreszenzmikroskopie das zelluläre Aktin- und MT-Gerüst infizierter und nicht-infizierter Zellen dargestellt, um eine eventuell auftretende lokale Depolymerisierung der MT zu untersuchen. Der anti-Tubulin-Antikörper färbte in den meisten Zellen einen definierten Bereich stark an, bei dem es sich aufgrund seiner unmittelbaren Lage neben dem Zellkern in der Nähe des Zellzentrums jeweils um das Centrosom, das MT-organisierende Organell (MTOC) der Zelle handeln müsste. Zudem wurde durch den anti-Tubulin-Antikörper das MT-Gerüst dargestellt, welches sich in Interphasezellen vom MTOC aus fast bis zur Peripherie der Zellen erstreckt. FITC-Phalloidin färbte wie erwartet sowohl die Aktinfasern der Wirtszelle, als auch von den Bakterien polymerisierte Aktinschweife an. Die höchste Dichte an F-Aktin war in der Nähe der Zellmembran zu beobachten. Die F-Aktin spezifische Färbung und die anti-Tubulin-Färbung schlossen sich an vielen Stellen im Präparat gegenseitig aus, was wohl auf die unterschiedlichen Funktionen dieser beiden Zytoskelettelemente zurückzuführen ist (Alberts *et al.*, 1993). Bedauerlicherweise konnte zu keinem Zeitpunkt während der Infektion um intrazelluläre bewegliche Listerien herum eine Änderung im MT-Gerüst beobachtet werden, die auf dessen Depolymerisierung hinweisen könnte. Deshalb konnte mittels dieser Methode nicht geklärt werden, ob Stathmin auf der bakteriellen Oberfläche wirklich MT depolymerisiert und damit die gleiche Funktion erfüllt, wie VirA bei *S. flexneri*. Im Idealfall hätten an den Stellen im Präparat, an denen sich die beweglichen Bakterien befanden, im MT-Gerüst deutliche Lücken zu sehen sein sollen.

Schubart *et al.* haben in C57/BL6-Mäusen eine knock-out Linie etabliert, bei der Stathmin durch Insertion einer Genkassette inaktiviert ist (Schubart *et al.*, 1996). Obgleich dem Protein Stathmin eine Reihe verschiedener Funktionen zugeschrieben wird (Schubart *et al.*, 1996; Rubin und Atweh, 2004), zeigten homozygote Stathmin knock-out Mäuse eine normale Entwicklung und waren auch sonst nicht von wildtypischen C57/BL6-Mäusen zu unterscheiden. Diese stathmindefizienten Mäuse sollten sich sehr gut eignen, um eine mögliche Rolle von Stathmin bei einer *L. monocytogenes* Infektion *in vitro* und *in vivo* zu untersuchen. Freundlicherweise von Herrn Schubart zur Verfügung gestellte homozygote Stathmin knock-out Mäuse (Stathmin^(-/-)-Mäuse) wurden zunächst mit wildtypischen C57/BL6-Mäusen rückgekreuzt und die aus dieser Verpaarung resultierende heterozygote F1-Generation erneut miteinander verpaart. Nach erfolgter Genotypisierung der F2-Generation mittels PCR wurden, um auf weitere Genotypisierungen verzichten zu können, homozygote knock-out Tiere miteinander gekreuzt. Dabei zeigte sich, dass entgegen der Angaben in der Literatur, die weiblichen Stathmin^(-/-)-Tiere im Vergleich zu den heterozygoten^(+/-)- bzw. wildtypischen^(+/+)-Tieren ein aggressives und atypisches Brutpflegeverhalten

äußerten. Die Mäuseweibchen reagierten innerhalb der ersten 4-5 Tage nach der Geburt aggressiv auf äußere Einwirkungen wie Futtergabe, Wasserwechsel oder Umsetzen was nicht selten dazu führte, dass der gesamte Wurf getötet und gefressen wurde. Die Wurfstärken aus solchen homozygoten knock-out Verpaarungen war mit 5-6 Jungen zudem meist deutlich kleiner als die aus einer Verpaarung wildtypischer Tiere (8-12 Jungtiere) und die Trächtigkeitsdauer um 2-3 Tage verlängert. Oftmals waren auch Tiere innerhalb solcher knock-out-Würfe zu finden, die deutlich kleiner waren als ihre wildtypischen Artgenossen. Um diese Zuchtprobleme zu umgehen, wurden schließlich nur noch knock-out Männchen mit heterozygoten Stathmin^(+/-)-Weibchen verpaart und die Jungen spätestens im Alter von 18 Tagen einzeln genotypisiert.

Um die Rolle von Stathmin während einer Infektion von Säugerzellen mit Listerien zu untersuchen, wurden zunächst Infektionsversuche mit aus wildtypischen und Stathmin knock-out Mäusen isolierten primären Knochenmarksmakrophagen (BMMΦ) durchgeführt. In Invasionsstudien konnte bezüglich der Phagozytoserate der Listerien durch wildtypische und stathmindefiziente BMMΦ kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Demnach hat Stathmin offensichtlich keinen Einfluss auf die phagozytische Aktivität von Makrophagen. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass nach dem gegenwärtigen Stand der Erkenntnis für die Phagozytose das Aktinzytoskelett wesentlich ist (Alberts *et al.*, 1993). Allerdings gibt es in der Literatur Hinweise darauf, dass bei verschiedenen Zelltypen auch Mikrotubuli für die Aufnahme von verschiedenen pathogenen Bakterien notwendig sein können (Ölschläger und Kopecko, 2000; Yoshida und Sasakawa, 2003).

Mit Hilfe weiterer Zellkulturexperimente wurde gezeigt, dass die Inaktivierung des Stathmin-Gens den Lebenszyklus der Listerien im Zytoplasma der BMMΦ nicht beeinflusst. Zu keinem Zeitpunkt nach der Infektion konnte ein Unterschied bezüglich der Vermehrung von *L. monocytogenes*, sowie der Aktinschweifbildung und Ausbreitung von Zelle zu Zelle zwischen wildtypischen und stathmindefizienten BMMΦ beobachtet werden. Aufgrund dieser Ergebnisse kann gefolgert werden, dass das Phosphoprotein Stathmin *in vitro* generell keinen Einfluss auf den intrazellulären Lebenszyklus von *L. monocytogenes* hat. Könnte Stathmin durch seine MT-destabilisierende Aktivität auf die intra- und interzelluläre Bewegung der Bakterien einwirken und diese begünstigen wäre zu erwarten, dass sich die Listerien in stathmindefizienten Makrophagen langsamer zwischen den Zellen ausbreiten.

Ein überraschendes Ergebnis lieferte die mikroskopische Analyse *L. monocytogenes* infizierter, mit einem anti-Stathmin-Antikörper angefärbter Stathmin^(-/-)-BMMΦ. Diese Zellen sollten aufgrund der Deletion des Stathmin-Gens Stathmin nicht mehr synthetisieren können. Im Westernblot wurden auch wie erwartet im Proteinlysate aus Mäusen, die über PCR als Stathmin knock-out Tiere identifiziert waren, mit dem anti-Stathmin-Antikörper keine stathminspezifischen Banden detektiert. Dennoch wurden in infizierten Stathmin^(-/-)-BMMΦ intrazelluläre Bakterien sowie das Zytoplasma der Zellen von dem anti-Stathmin-Antikörper angefärbt. Durch Negativ-Kontrollen zur Spezifität der verwendeten Antikörper konnten unspezifische Bindungen mit listeriellen bzw. zellulären Proteinen ausgeschlossen werden. Worauf die Tatsache zurückzuführen ist, dass im Proteinlysate der knock-out Maus mit dem anti-Stathmin-Antikörper kein kreuzreagierendes Protein detektiert werden konnte, unter nativen Bedingungen im Infektionsversuch jedoch sowohl die Oberfläche der Bakterien, als auch zelluläre Strukturen angefärbt wurden, ist nicht bekannt.

Bei dem in dieser Arbeit verwendeten anti-Stathmin-Antikörper handelte es sich um ein polyklonales Kaninchen-anti-Peptid-C-Serum, welches laut Produktbeschreibung spezifisch die 16 carboxyterminalen Aminosäuren von Stathmin erkennt (Koppel *et al.*, 1990). In den von Koppel *et al.* durchgeführten Westernblot-Analysen zur Untersuchung der Expression von Stathmin in verschiedenen Organen von Mäusen konnten mit einem solchen anti-Serum keine unspezifischen Bindungen beobachtet werden. Das Serum erkannte spezifisch nur verschiedene Formen von Stathmin, die sich hinsichtlich ihres Phosphorylierungsgrades voneinander unterschieden. Dass die in Stathmin^(-/-)-BMM Φ beobachtete Färbung mit dem anti-Stathmin-Antikörper auf einer Kreuzreaktion des Antikörpers mit dem nahe verwandten neuronalen Protein SCG10 beruht, kann ausgeschlossen werden, da SCG10 auch in Abwesenheit von Stathmin ausschließlich im zentralen Nervensystem exprimiert wird (Schubart *et al.*, 1996). Da sich Stathmin knock-out Mäuse trotz der verschiedenen Funktionen, die Stathmin zugeschrieben werden, nicht markant von wildtypischen Mäusen unterscheiden kann spekuliert werden, dass bislang nicht identifizierte Gene in Abwesenheit von Stathmin exprimiert werden, um dessen Funktionen zu übernehmen. Die daraufhin synthetisierten Proteine könnten unter nativen Bedingungen Epitope aufweisen, die vom verwendeten anti-Stathmin-Antikörper erkannt werden.

In vivo scheint Stathmin neben der Regulation des Zellzyklus und der Zellproliferation auch an der Immunmodulation beteiligt zu sein. Nach einer Infektion von C57/BL6 Mäusen mit *L. monocytogenes* konnten diese in Leber und Milz von Stathmin knock-out Mäusen besser proliferieren als in Leber und Milz wildtypischer Mäuse. Diese Beobachtung könnte darauf zurückzuführen sein, dass in Stathmin^(-/-)-Mäusen im Vergleich zu wildtypischen Tieren die relative Anzahl an T-Zellen gleich hoch, die absolute Anzahl an CD4+- und CD8+-T-Zellen in Thymus und Milz jedoch verringert ist (Schubart *et al.*, 1996). Da Listerien während einer Infektion sowohl im Phagosom als auch im Zytoplasma Antigen-präsentierender Zellen anzutreffen sind, werden listerielle Epitope über MHC-Moleküle der Klassen I (Pamer *et al.*, 1991) und II (Sanderson *et al.*, 1995) präsentiert. Dadurch werden in einem intakten Immunsystem CD4+- und CD8+-T-Zellen aktiviert, was normalerweise 5-7 Tage p. I. zu einer Eliminierung der Bakterien aus dem Wirt führt (Vázquez-Boland *et al.*, 2001). Die im Vergleich zum Wildtyp beobachtete erhöhte listerielle Belastung der infizierten Organe stathmindefizienter Tiere könnte somit auf der reduzierten Anzahl an T-Lymphozyten beruhen und nicht unbedingt auf einen intrazellulären Effekt des fehlenden Stathmins.

Der prolinreiche Bereich von ActA wurde als die Region identifiziert, die für eine effiziente Interaktion von ActA und LaXp180 notwendig ist (Pfeuffer *et al.*, 2000). Über ein Yeast Two-Hybrid System wurde mit verschiedenen ActA- und LaXp180-Fragmenten die Bindungsstelle beider Proteine eingegrenzt (Bauer *et al.*, 2003). In ActA erwies sich der prolinreiche Bereich (PRR) für eine spezifische Interaktion dieser beiden Proteine als notwendig, wobei vor allem die PRR 2 und 3 unabdingbar sind. Bei LaXp180 reichten die letzten 14 Aminosäuren des C-terminalen Fragmentes für eine effiziente Bindung an ActA aus. Über einen anderen Teilbereich in seinem C-Terminus (AS 1085-1226) interagiert LaXp180 mit dem Phosphoprotein Stathmin (Maucuer *et al.*, 1995). In Experimenten mit *L. monocytogenes*-infizierten Zellen wurde gezeigt, dass Stathmin nur mit ActA-exprimierenden intrazellulären *L. monocytogenes* kolokalisiert und seine

Verteilung auf der Oberfläche der Bakterien mit der Verteilung von LaXp180 auf der Bakterienoberfläche korreliert (Pfeuffer *et al.*, 2000). Ob und welchen Vorteil diese indirekte Rekrutierung des MT-destabilisierenden Proteins Stathmin für die Bakterien hat, war noch völlig unbekannt. Es wurde weiterhin angenommen, dass durch eine Deletion der LaXp180-Interaktionsstelle innerhalb von ActA auch Stathmin nicht mehr an die Listerien rekrutiert wird. In Immunfluoreszenzanalysen *L. monocytogenes* $\Delta 2$ (Hauf *et al.*, 1997) infizierter Zellen wurde gezeigt, dass Stathmin nicht mehr mit der Oberfläche dieser ActA-Mutante kolokalisiert (Pfeuffer *et al.*, 2000). *L. monocytogenes* $\Delta 2$ besitzt aufgrund einer Deletion weder *actA*, noch *mpl* und *plcB*. Bakterien dieses Stammes sind jedoch unbeweglich und können sich weder im Zytoplasma der Wirtszellen, noch von Zelle zu Zelle ausbreiten. Sie eignen sich daher nicht um festzustellen, ob Stathmin eine Rolle für den Infektionsverlauf spielt. Bei der daraufhin konstruierten Mutante *L. monocytogenes* $\Delta actAPRR2/3$ waren die prolinreichen Bereiche 2 und 3 und damit nur die putativen Interaktionssequenzen von ActA und LaXp180 deletiert. Daher sollte *L. monocytogenes* $\Delta actAPRR2/3$ noch zur intra- und interzellulären Bewegung fähig sein, jedoch kein LaXp180 und Stathmin mehr rekrutieren. Um herauszufinden, ob sich diese Mutante in ihrem intrazellulären Verhalten von wildtypischen *L. monocytogenes* unterscheidet, wurden verschiedene Zellkultur-experimente durchgeführt. *L. monocytogenes* $\Delta actAPRR2/3$ weist bezüglich Invasivität und intrazellulärem Überleben keinen Unterschied zum Wildtyp auf, zeigt sich jedoch in der inter- und intrazellulären Fortbewegung eingeschränkt. Diese Beobachtung deckt sich mit früheren Versuchen, wonach bei *L. monocytogenes* $\Delta actA$ -Mutanten, bei denen einzelne prolinreiche Repeats (PRR) deletiert waren, eine Abnahme der Fortbewegungsgeschwindigkeit festgestellt wurde (Smith *et al.*, 1996). Es konnte gezeigt werden, dass diese linear von der Anzahl der PRR in ActA abhängt. Dies erklärt sich dadurch, dass durch die Deletion der PRR wird weniger VASP an die bakterielle Oberfläche rekrutiert (Smith *et al.*, 1996). VASP ist nicht direkt an der Aktinpolymerisation beteiligt, sondern an der Umorganisation des Aktinengeflechts (Laurent *et al.*, 1999; Auerbuch *et al.*, 2003) Es bindet außerdem an Profilin und bringt dadurch dieses Regulatorprotein in die Nähe der bakteriellen Oberfläche. Profilin beschleunigt unter anderem die Elongation der Aktinfilamente und steigert dadurch die Fortbewegungsgeschwindigkeit der Listerien (Smith und Portnoy, 1997; Laurent *et al.*, 1999).

Anti-Stathmin-Färbungen *L. monocytogenes* $\Delta actAPRR2/3$ infizierter Cos-1 Fibroblasten lieferten ein überraschendes Ergebnis. Trotz Deletion der putativen Interaktionsstelle von LaXp180 und ActA konnte mit dem anti-Stathmin-Antikörper eine Kolokalisation zwischen intrazellulären Bakterien und Stathmin beobachtet werden. Auch in mit *L. monocytogenes* A49 infizierten Fibroblasten wurde eine Kolokalisation zwischen Listerien und Stathmin beobachtet. Um die Spezifität der Färbung mit dem polyklonalen anti-Stathmin-Antikörper zu überprüfen, wurden Zellen mit *L. monocytogenes* $\Delta 2$ infiziert. *L. monocytogenes* $\Delta 2$ ist der Stamm, mit dem Pfeuffer *et al.* zeigen konnten, dass Stathmin ausschließlich ActA-abhängig an intrazelluläre Listerien rekrutiert wird, da diese intrazellulären Bakterien vom anti-Stathmin-Antikörper nicht gefärbt wurden (Pfeuffer *et al.*, 2000). Entgegen aller Erwartungen wurden jedoch auch bei meinen Infektionsversuchen mit diesem Stamm die intrazellulären Bakterien vom anti-Stathmin-Antikörper angefärbt. Aus den Ergebnissen ist zu schließen, dass Stathmin entgegen der Angaben in der Literatur wohl ActA-unabhängig an intrazelluläre Listerien rekrutiert wird. Worauf diese zu Pfeuffer *et al.* (2000)

widersprüchliche Beobachtung zurückzuführen ist, ist unklar. Zum Zeitpunkt der Erstellung dieser Arbeit war es nicht möglich, mit den zur Verfügung stehenden Antikörpern und Fluoreszenzfarbstoffen LaXp180 und Stathmin bzw. Stathmin und Aktin gleichzeitig darzustellen, da sich die Fixiermethoden für die einzelnen Färbungen nicht kombinieren ließen. Mit solchen Doppelimmunfluoreszenzanalysen könnte jedoch überprüft werden, ob die Verteilung von Stathmin auf der Bakterienoberfläche tatsächlich wie von Pfeuffer postuliert mit der von LaXp180 korreliert und Stathmin bei *actA*-exprimierenden Bakterien wirklich nur an den dem Aktinschweif gegenüber liegenden Bakterienpol rekrutiert wird (Pfeuffer, 2000). Es ist aufgrund der hier erhaltenen Ergebnisse nicht auszuschließen, dass Stathmin nicht wie angenommen über LaXp180 und ActA an die Listerien rekrutiert wird, sondern mit einem anderen listeriellen Oberflächenprotein interagiert. Um diese These zu überprüfen könnte im Yeast Two-Hybrid Assay mit Stathmin als Köder eine listerielle cDNA-Genbank nach möglichen Interaktionspartnern durchsucht werden. Sollten solche gefunden werden, könnten mit Hilfe der Allelaustausch-Mutagenese die entsprechenden Gene deletiert werden. Infektionsversuche mit diesen Mutanten könnten schließlich einen Hinweis darauf geben, ob und wie Stathmin eine Infektion mit *L. monocytogenes* beeinflusst.

6.2 Konstruktion und Charakterisierung von *L. monocytogenes* Mutanten mit in frame Deletionen in individuellen Response Regulatorgenen

Alle freilebenden Bakterien besitzen die Fähigkeit, auf sich verändernde Umweltbedingungen zu reagieren und sich diesen anzupassen, indem sie die Expression verschiedener Gene modulieren. Zweikomponentensysteme (TCS) spielen dabei eine entscheidende Rolle, da sie die Umwandlung externer und interner Stimuli in zelluläre Signale vermitteln (Hoch, 2000). TCS bestehen meist aus einer Sensor Histidinkinase (HK) und dem dazugehörigen Response Regulator (RR). Nimmt die HK über ihre Sensordomäne eine Veränderung in ihrem Umfeld wahr, kommt es zur Autophosphorylierung des konservierten Histidins in der Autokinasedomäne. Die Phosphatgruppe wird sodann auf den konservierten Aspartatrest der Receiverdomäne des RR übertragen. Dadurch erfährt dessen Outputdomäne eine Konformationsänderung und überführt den RR in seine aktive Form. In den meisten Fällen stellen RR Transkriptionsfaktoren dar und weisen DNA-Bindungscharakter auf (Fabret *et al.*, 1999; Hoch, 2000).

Im Genom von *L. monocytogenes* EGDe liegen 15 und 16 offene Leseraster (ORFs), die für HK und RR codieren (Glaser *et al.*, 2001). Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit sollten die TCS von *L. monocytogenes* charakterisiert werden um eine Aussage darüber treffen zu können, ob sie einen Einfluss auf die Virulenz dieser Bakterien ausüben. Die *in silico* Analyse der genomischen Sequenz der individuellen HK und RR hat ergeben, dass bis auf *Imo2515* (*degU*) alle RR genetisch mit einem ORF verknüpft sind, der für eine HK codiert (Williams *et al.*, 2005). Betrachtet man die Lage der einzelnen TCS auf dem Chromosom, so ist auffällig, dass bis auf das TCS Lmo1745/Lmo1741 alle Gene für HK und ihre RR in unmittelbarer Nähe zueinander angeordnet sind. Bei *Imo1745/Imo1741* dagegen liegen drei Gene zwischen HK und RR. Sequenzvergleiche haben ergeben, dass viele der listeriellen TCS signifikante Homologien zu bereits beschriebenen TCS von *B. subtilis* und anderen Bakterien aufweisen. Sie werden deshalb oft mit dem gleichen Namen bezeichnet.

Über Sequenzmotive der den konservierten Histidin-Rest umgebenden Regionen wurden die listeriellen HK in Anlehnung an die Klassifizierung nach Fabret *et al.* (1999) in verschiedene Klassen eingeteilt. Zehn der HK, nämlich YycG (Lmo0288), Lmo1061, LisK (Lmo1378), Lmo1508, Lmo1741, ResE (Lmo1947), CesK (Lmo2421), PhoR (Lmo2500), Lmo2582 und KdpD (Lmo2679) konnten dadurch der Gruppe IIIA, Lmo1021 der Klasse II und Lmo2011 der Klasse I zugeordnet werden. AgrC (Lmo0050), CheA (Lmo0692) und Lmo1173 passten nicht in das Klassifizierungsschema und konnten daher keiner Klasse zugewiesen werden. Die Klasse der IIIA Kinasen scheint bisher bei Gram-positiven Bakterien die umfangreichste Klasse zu sein, 14 von 36 HK von *B. subtilis* (Fabret *et al.*, 1999) und 10 der 17 HK von *E. faecalis* (Hancock und Perego, 2002) werden ebenfalls dieser Klasse zugeordnet. Mit Ausnahme von CheA und Lmo1173 sind alle HK in *L. monocytogenes* EGDe membrangebunden. Dies steht in Übereinstimmung mit der Beobachtung, dass die Lokalisierung der HK an der Membran der bakteriellen Zelle eine Eigenschaft der meisten regulatorischen Zweikomponentensysteme ist (Kim und Forst, 2001). Die RR wurden aufgrund der Struktur ihrer Outputdomänen klassifiziert. Der Sequenzabgleich der C-terminalen RR-Domänen mit der AS-Sequenz bekannter DNA-Bindungsdomänen ergab, dass YycF (Lmo0287), Lmo1060, LisR (Lmo1377), Lmo1507, Lmo1745, ResD (Lmo1948), CesR (Lmo2422), PhoP (Lmo2501), Lmo2583 und KdpE (Lmo2678) Homologie zum *E. coli*-RR OmpR aufweisen. In *E. coli* ist OmpR zusammen mit seiner HK EnvZ an der Osmoregulation beteiligt (Fabret *et al.*, 1999). Mit der Methode des Sequenzvergleichs konnte außerdem gezeigt werden, dass der RR AgrA (Lmo0051) eine Outputdomäne vom *S. aureus* LytTr-Typ, die RR DegU (Lmo2515) und Lmo1022 Outputdomänen vom NarL-Typ aufweisen (Williams *et al.*, 2005). Das LytT/S-System wurde von Brunskill und Bayles als regulatorischer Locus identifiziert, der die Autolyse und Penicillin-Toleranz beeinflusst (Brunskill und Bayles, 1996), während das NarL/X-TCS in *E. coli* als Antwort auf Nitrat die Expression von Genen reguliert, deren Produkte für die anaerobe Atmung eine Rolle spielen (Lee *et al.*, 1999). Für Lmo2010 wurde eine Output-Domäne vom AraC-Typ identifiziert. Lmo1172 weist anstelle eines DNA-Bindungsmotives das RNA-Bindungsmotiv AN TAR auf, das sonst nur bei antiterminations-regulatorischen Proteinen wie AmiR von *Pseudomonas aeruginosa* vorkommt (O'Hara *et al.*, 1999; Shu *et al.*, 2002). CheY ist der einzige RR in *L. monocytogenes*, der nur aus der phosphorylierbaren Receiverdomäne besteht. Bei *B. subtilis* hingegen konnten drei solcher RR identifiziert werden: ein Homolog zu CheY, Spo07 des Sporulations-Phosphorelais und Ynel, ein Protein noch unbekannter Funktion (Fabret *et al.*, 1999). Fabret *et al.* konnten zeigen, dass bei *B. subtilis* interessanterweise alle RR vom OmpR-Typ mit HK der Gruppe IIIA und RR vom NarL-Typ mit HK der Gruppe II gepaart sind (Fabret *et al.*, 1999). Hancock und Perego zeigten das Gleiche für TCS-Komponenten von *E. faecalis* (Hancock und Perego, 2002). Bei den TCS von *L. monocytogenes* EGDe kann die gleiche Beobachtung gemacht werden, HK der Gruppe IIIA sind ausschließlich mit RR vom OmpR-Typ gepaart, HK der Gruppe II mit RR vom NarL-Typ. Der RR DegU ist als Einziger genetisch nicht mit einer HK verbunden. Im Genom von *L. monocytogenes* konnte kein Homolog zur *B. subtilis* HK von DegU, DegS, identifiziert werden. Es ist daher unklar, wie das listerielle DegU aktiviert wird. Da für die Systeme NarX/L und NarQ/P in *E. coli* gezeigt werden konnte, dass eine einzelne HK mehrere RR phosphorylieren kann (Stewart und Rabin, 1995) ist es denkbar, dass DegU mit einer der 15

Histidinkinase von *L. monocytogenes* interagiert. Lmo1021 könnte eine geeignete HK für DegU darstellen, da DegU zur Untergruppe der NarL-ähnlichen RR gehört und Lmo1021 das einzige listerielle Sensorprotein mit einer Kinasedomäne der Klasse II ist und Kinasen dieser Klasse ausschließlich mit RR vom NarL-Typ interagieren (Fabret *et al.*, 1999).

Durch die Konstruktion individueller Mutanten mit großen in frame Deletionen in den RR-Genen sollte die Rolle der listeriellen TCS für den intrazellulären Lebenszyklus und die Virulenz von *L. monocytogenes* untersucht werden. Mittels Allelaustausch-Mutagenese konnten 15 der 16 RR-Gene deletiert werden. Wie erwartet konnte das zu dem essentiellen Response Regulatorgen *yycF* aus *B. subtilis* homologe listerielle Gen *yycF* (*lmo0287*) nicht deletiert werden. Der von *yycF* codierte RR YycF ist zusammen mit seiner HK YycG in Gram-positiven Bakterien hoch konserviert und zeigte sich auch in *Staphylococcus aureus* und *Staphylococcus pneumoniae* als essenziell (Martin *et al.*, 1999; Throup *et al.*, 2000). Das YycFG-System reguliert in *B. subtilis* das *ftsAZ*-Operon. Die von diesem Operon codierten Proteine sind an der Regulation der Zellteilung beteiligt und eine Deletion wahrscheinlich aufgrund dieser Funktion für die Bakterien lethal (Fukuchi *et al.*, 2000). Wie genau bzw. auf welche Signale hin die HK YycG autophosphoryliert wird ist noch unklar. Es könnte aber über seine PAS-Domäne durch kleine Moleküle wie NAD, Häm, Flavine, ADP, und ATP aktiviert werden (Bibikov *et al.*, 2000; Delgado-Nixon *et al.*, 2000; Pellequer *et al.*, 1995; Stephenson *et al.*, 2001; Taylor *et al.*, 1999). Bisher konnten erst wenige essentielle TCS bei Bakterien identifiziert werden, darunter das CtrA/CckA-System von *Caulobacter crescentus* (Hecht *et al.*, 1995). Die RR MtrA von *Mycobacterium tuberculosis* (Zahrt und Deretic, 2000) sowie HP166 und HP1043 von *Helicobacter pylori* wurden ebenfalls als essentiell identifiziert (Beier und Frank, 2000).

In BHI-Medium zeigten die 15 *L. monocytogenes* Δ TCS RR-Mutanten bei 37° C, 20 ° C und 42° C unter aeroben Bedingungen ein Wachstum, das sich von dem wildtypischer Bakterien nicht unterschied. Die Zugabe von 0,025% H₂O₂ oder ein Absenken des pH-Wertes auf 5,5 hatte ebenfalls keinen signifikanten Einfluss auf das Wachstum der Mutanten. Dies lässt annehmen, dass keines der listeriellen Zweikomponentensysteme eine entscheidende Rolle bei der Anpassung an Temperatur- und oxidativen Stress spielt. Entgegen der Angaben in der Literatur konnte die Zugabe von 9 % NaCl das Wachstum der Mutanten nicht beeinflussen. Kallipolitis *et al.* haben jedoch gezeigt, dass Mutanten mit Insertionen in den Genen *kdpE* und *cesR*, von dieser Arbeitsgruppe als BK37 und BK96 bezeichnet, bei Salzkonzentrationen $\geq 7,5$ % in ihrer Proliferation beeinträchtigt sind (Kallipolitis *et al.*, 2001). Mit den hier verwendeten Deletionsmutanten konnten diese Ergebnisse nicht reproduziert werden. Keine der *L. monocytogenes* Δ TCS RR-Mutanten zeigte bei den Wachstumsversuchen in Flüssigkultur in Gegenwart von 9 % NaCl einen Unterschied zum Wildtyp EGD. Das listerielle KdpE (*lmo2678*) ist homolog zu den gleichnamigen Proteinen in *E. coli* und *Clostridium acetobutylicum*. In *E. coli* ist dieser RR zusammen mit seiner HK KdpD an der Aufrechterhaltung des Turgor-Druckes beteiligt, indem es die Expression eines hoch-affinen K⁺-Transporters reguliert, der von den *kdpABC*-Genen codiert wird. K⁺ spielt eine wichtige Rolle in der Osmoadaption von Mikroorganismen (Holtmann *et al.*, 2003). Normalerweise reagieren Bakterien in zwei Schritten auf plötzliche hypertone Bedingungen im

extrazellulärem Medium. Im ersten Schritt werden über spezifische Transportsysteme große Mengen an K^+ aufgenommen, um dem Wasseraustritt, der mit einem Anstieg der externen Salzkonzentration einhergeht, entgegen zu wirken (Dinnbier *et al.*, 1988). Hohe intrazelluläre Kaliumkonzentrationen wirken sich jedoch negativ auf die Synthese und Funktion von Proteinen, sowie auf Protein-DNA-Interaktionen aus (Holtmann *et al.*, 2003). Deshalb werden in einem zweiten Anpassungsschritt lösliche Substanzen importiert oder *de novo* synthetisiert und parallel dazu das überschüssige K^+ über einen aktiven Transporter wieder aus der Zelle ausgeschleust (Dinnbier *et al.*, 1988; Bremer Holtmann *et al.*, 2003). Die unterschiedlichen Phänotypen, die für die hier verwendete *L. monocytogenes kdpE*-Deletionsmutante und die *L. monocytogenes kdpE*-Insertionsmutante von Kallipolitis und Ingmer (2001) beobachtet und beschrieben werden, könnten möglicherweise durch den polaren Effekt einer Insertions-Mutation erklärt werden. Durch eine Insertion werden meist nicht nur das Zielgen selbst, sondern auch direkt downstream liegende Gene inaktiviert. Unmittelbar downstream von *kdpE* liegt das Gen für Lmo2677, einem Protein mit einer konservierten Domäne der α/β -Hydrolasen- und Acetyltransferasen-Superfamilie (Brøndsted *et al.*, 2003). *lmo2677* wird polycistronisch mit *kdpD* (*lmo2679*) und *kdpE* transkribiert was die Vermutung entstehen lässt, dass die Funktion von Lmo2677 mit der des *kdp*-Lokus gekoppelt ist. Eine Insertion in *kdpE* stört somit zugleich auch die Expression von *lmo2677*. Wie anhand des Wachstums von $\Delta kdpE$ ersichtlich, hat eine Deletion von *kdpE* keinen Einfluss auf die Anpassung der Bakterien an hohe Osmolaritäten, wohl aber die aufgrund der Insertion wahrscheinlich erfolgte Inaktivierung der Gene *kdpE* und *lmo2677*. Die Beobachtung, dass *L. monocytogenes* $\Delta kdpE$ bei 9 % NaCl wachsen kann, könnte jedoch auch darauf zurückzuführen sein, dass *L. monocytogenes* neben dem *kdpABC*-Lokus noch weitere K^+ -Aufnahme Systeme besitzt. Im listeriellen Genom sind zu *B. subtilis ktrAB* und *ktrCD* homologe Gene vorhanden. Diese Gene codieren in *B. subtilis* für ein K^+ -Aufnahme System, das offensichtlich gänzlich *kdp*-unabhängig reguliert wird, da das Genom dieser Bakterien kein Homolog zu *kdp* aufweist (Kunst *et al.*, 1997). Es könnte sein, dass diese KtrAB- und KtrCD-Homologen in *L. monocytogenes* $\Delta kdpE$ die Funktion des *kdpE*-regulierten K^+ -Transporters kompensieren.

Durch die Zugabe von 5 % Ethanol zum BHI-Medium konnten die Deletionsmutanten *L. monocytogenes* $\Delta resD$, $\Delta phoP$ und *L. monocytogenes* $\Delta lmo1745$ im Vergleich zum WT deutlich schlechter wachsen. Wie auch schon von anderen Arbeitsgruppen gezeigt wurde konnten die Stämme *L. monocytogenes* $\Delta cesR$ (Kallipolitis *et al.*, 2003) und *L. monocytogenes* $\Delta lisR$ (Cotter *et al.*, 1999) unter diesen Bedingungen signifikant besser wachsen als der wildtypische Stamm. Die *L. monocytogenes* $\Delta degU$ -Mutante dagegen konnte in Gegenwart des Alkohols überhaupt nicht wachsen. Aus der Literatur ist bekannt, dass beim Wachstum in Gegenwart von Ethanol der Anteil ungesättigter Fettsäuren in der Zellmembran von *E. coli* zunimmt (Ingram *et al.*, 1980). Ethanol übt außerdem bei wachsenden Zellen einen Effekt auf die Quervernetzung des Peptidoglykans aus, der dem von Penicillin G gleichkommt (Ingram *et al.*, 1980). Für die TCS CesR/K (Kallipolitis *et al.*, 2003) und LisR/K (Cotter *et al.*, 1999) konnte gezeigt werden, dass sie neben der Vermittlung von Toleranz für Ethanol auch die Sensitivität von *L. monocytogenes* für einige Antibiotika beeinflussen. CesR/K ist wahrscheinlich auch daran beteiligt, Veränderungen in der Zellwandzusammensetzung wahrzunehmen und auf diese zu reagieren (Cotter *et al.*, 1999; Kallipolitis *et al.*, 2003). Ähnlich könnten auch *lmo1745*, *resD*, *phoP* und *degU* direkt oder indirekt auf die

Zusammensetzung der Zellmembran einwirken, was in deren Abwesenheit in einer veränderten Toleranz gegenüber Ethanol resultiert.

B. subtilis ist unter anaeroben Bedingungen zur Nitratatmung fähig (Hoffmann *et al.*, 1995). Sun *et al.* haben gezeigt, dass die dafür notwendigen Proteine durch das TCS ResD/E reguliert werden (Sun *et al.*, 1996). Um zu überprüfen, ob *L. monocytogenes* unter anaeroben Bedingungen in Gegenwart von Nitrat ebenfalls Nitratatmung betreibt, wurden der Wildtyp EGD und die einzelnen *L. monocytogenes* Δ TCS RR-Mutanten unter Sauerstoffausschluss in BHI mit 0,02 % KNO₃ als terminalem Elektronenakzeptor kultiviert. Es konnte zwischen dem EGD-Stamm und den RR-Mutanten jedoch keine Differenz im Wachstum in der Flüssigkultur festgestellt werden. Selbst für die *L. monocytogenes* Δ resD-Mutante konnte im Gegensatz zur *B. subtilis* resD-Deletionsmutante kein Wachstumsdefizit im Vergleich zum Wildtyp beobachtet werden. Wahrscheinlich ist dieses Ergebnis darauf zurückzuführen, dass in *L. monocytogenes* eine für Nitratatmung notwendige dissimilative Nitratreduktase fehlt (Glaser *et al.*, 2001). Im Genom von *B. subtilis* hingegen wurden zwei Operons identifiziert, die für zwei Nitratreduktasen codieren: *narGHIJ* und *nasBC*. Ersteres codiert für eine respiratorische Nitratreduktase, die für Nitratatmung unter anaeroben Bedingungen notwendig ist, während das *nas*-Operon an der Assimilation von Stickstoff aus Nitrat unter aeroben Bedingungen beteiligt ist (Hoffmann *et al.*, 1995; Nakano *et al.*, 1995; Ogawa *et al.*, 1995). Bisher konnte jedoch noch nicht geklärt werden, ob in *B. subtilis* resD/E die Expression dieser beiden Nitratreduktasen direkt oder indirekt reguliert. Die hier erhaltenen Ergebnisse implizieren, dass in *L. monocytogenes* weder ResD/E noch eines der anderen TCS an der Regulation fermentativer Stoffwechselwege beteiligt ist.

Wie bereits erwähnt wird den beiden listeriellen TCS LisR/K und CesR/K neben der Vermittlung einer erhöhten Toleranz für EtOH auch eine Rolle bei der Vermittlung von Resistenzen gegenüber verschiedenen Antibiotika zugesprochen. Das LisR/K-System beeinflusst die Toleranz der Listerien für Nisin und Cephalosporine (Cotter *et al.*, 2003), während CesR/K Resistenz gegen alle Antibiotika der β -Lactam-Familie vermittelt (Kallipolitis *et al.*, 2003). Nisin ist ein von *Streptococcus lactis* synthetisiertes Protein, das antibiotische Aktivität aufweist und vermehrt in der Nahrungsmittelindustrie eingesetzt wird (Penna *et al.*, 2005). Bei Cephalosporinen handelt es sich um halbsynthetische Antibiotika, die den Penicillinen sehr ähnlich sind und zusammen mit diesen die zwei Hauptgruppen der β -Lactam-Antibiotika darstellen (Pschyrembel, 1994). Ihre Wirkungsweise liegt darin, die Mureinsynthese zu hemmen, was in instabilen Zellmembranen der behandelten Bakterien resultiert.

Mit Hilfe eines Antibiotika-Sensitivitätstests sollten weitere listerielle TCS identifiziert werden, die möglicherweise Gene regulieren deren Produkte Resistenz gegen verschiedene bakteriostatisch und bakteriozid wirkende Antibiotika vermitteln können. Es zeigte sich, dass die meisten der *L. monocytogenes* Δ TCS RR-Mutanten in Bezug auf die eingesetzten Antibiotika gleich sensitiv wie der Wildtyp sind. *L. monocytogenes* Δ cesR reagierte wie erwartet sensitiver auf die β -Lactam-Antibiotika Ampicillin und Penicillin G als *L. monocytogenes* EGD (Kallipolitis *et al.*, 2003). Im Bezug auf die Aminoglykoside Kanamycin, Gentamycin und Streptomycin sowie die restlichen getesteten Antibiotika verhielt sich dieser Stamm jedoch wie die übrigen Deletionsstämme. Von diesen Ergebnissen ausgehend scheint neben LisR/K und CesR/K kein weiteres listerielle TCS an der Vermittlung von Resistenz gegenüber Antibiotika der β -Lactam, Aminoglykosid- oder Makrolid-Gruppe beteiligt zu sein.

In dieser Arbeit wurde die Beweglichkeit der einzelnen *L. monocytogenes* Δ TCS RR-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp mit Hilfe von Motilitätstests untersucht. Dabei zeigte sich, dass sowohl bei 24° C als auch bei 37° C bis auf *L. monocytogenes* Δ *cheY* und *L. monocytogenes* Δ *degU* alle untersuchten Δ TCS RR-Mutanten beweglich sind. Die Arbeitsgruppe von L. Dons konnte ebenfalls zeigen, dass die Deletion von *cheY* bzw. *degU* temperaturunabhängig in auf Weichagar unbeweglichen Listerien resultiert (Dons *et al.*, 2004; Knudsen *et al.*, 2004). Es ist bekannt, dass der RR CheY (Lmo0691) und seine HK CheA (Lmo0692) stark homolog zu den Proteinen CheY und CheA von *E. coli* und *B. subtilis*, und wie diese auch an der Chemotaxis beteiligt sind (Dons *et al.*, 1994). CheY wird normalerweise als Antwort auf ein externes Signal durch CheA phosphoryliert. Phosphoryliertes CheY interagiert daraufhin mit den Mot-Proteinen des Flagellenmotors und verändert dadurch die Rotationsrichtung der Flagelle. Flagellen können sich im (CW) oder gegen (CCW) den Uhrzeigersinn drehen. Eine CCW-Rotation der linkshändigen Flagellenfäden führt dazu, dass sich diese um die Bakterienzelle legen und ein koordiniertes Bündel bilden. Das bewirkt eine gerichtete Fortbewegung der Bakterien, die man als Schwimmen bezeichnet. Bei der Rotation im Uhrzeigersinn löst sich dieses Flagellenbündel auf und die Zelle beginnt zu taumeln, ohne sich dabei von der Stelle zu bewegen (Amsler und Matsumara, 1995). In welchen Zeitintervallen die Flagellen ihre Drehrichtung ändern, hängt dabei stark vom die Bakterien umgebenden Medium ab und wie dieses das CheA/Y System beeinflusst bzw. den Phosphorylierungsgrad von CheY (Macnab und Han, 1983; Amsler und Matsumara, 1995). Die Ergebnisse des Motilitätstests weisen darauf hin, dass unter den angewandten Versuchsbedingungen neben dem TCS CheA/Y und dem RR DegU offenbar kein weiteres listeriellles TCS an der Chemotaxis beteiligt ist.

In *L. monocytogenes* ist die Synthese von Flagellin, dem Hauptstrukturprotein der Flagelle, normalerweise wie auch die Virulenzgenexpression (Johansson *et al.*, 2002) ein temperaturregulierter Prozess (Dons *et al.*, 1992; Dons *et al.*, 1994). Bei Temperaturen < 30° C sind die Bakterien hoch beweglich und mit 4-6 Flagellen ausgestattet, während bei Temperaturen \geq 37° C kein Flagellin mehr synthetisiert wird und die Bakterien unbeweglich sind. Die hier durchgeführten Motilitätstests implizieren jedoch, dass die im Zuge dieser Arbeit verwendeten *L. monocytogenes* Stämme auch bei 37° C noch zu Bewegungen fähig sind (Williams *et al.*, 2005). Elektronenmikroskopische Analysen von *L. monocytogenes* EGD und *L. monocytogenes* Δ *cheY* haben ergeben, dass diese Stämme sowohl bei 24° C, als auch bei 37° C noch peritrich begeißelt sind. Es könnte sich demnach bei den hier verwendeten Stämmen um, wie von Way *et al.* beschriebene laboradaptierte Linien handeln, die ihre Temperatursensitivität bezüglich der Flagellensynthese verloren haben (Way *et al.*, 2004). Bei *L. monocytogenes* Δ *degU* dagegen konnten temperaturunabhängig keine Flagellen nachgewiesen werden. DegU scheint demnach an der Regulation der Flagellengen-Expression beteiligt zu sein.

Ein Einfluss der TCS auf die Virulenz von *L. monocytogenes* könnte sowohl in Zellkulturversuchen, als auch im Maus-Modell untersucht werden. Voraussetzung dafür ist jedoch, dass sich die zu untersuchenden Mutanten bezüglich der Expression wichtiger Virulenzproteine nicht vom Wildtyp unterscheiden. Mittels Westernblot-Analysen wurde die Expression der Virulenzfaktoren LLO, ActA, PlcB, InlA und InlB überprüft. Es zeigte sich, dass alle *L. monocytogenes* Δ TCS RR-Mutanten diese wichtigen Virulenzfaktoren unter den angewandten Kulturbedingungen ohne signifikante Unterschiede zum Wildtyp exprimierten. Die

einzelnen listeriellen TCS haben offensichtlich keinen Einfluss auf die Transkription der dafür codierenden Gene. Parallel zur Westernblot Analyse bezüglich der Expression von *hly* wurden die einzelnen Mutanten auf ihre Fähigkeit zur Hämolyse untersucht. Sie zeigten im Vergleich zu *L. monocytogenes* EGD hinsichtlich ihrer hämolytischen Aktivität keine Abweichungen. Die Arbeitsgruppe von L. Dons konnte für ihre *L. monocytogenes degU*-Deletionsmutante ebenfalls eine volle hämolytische Aktivität wie die wildtypischer Bakterien nachweisen (Knudsen *et al.*, 2004).

Untersuchungen zur Interaktion der *L. monocytogenes* Δ TCS RR-Mutanten mit Säugerzellen sollten Aufschluss darüber geben, ob die individuellen TCS auf den intrazellulären Lebenszyklus von *L. monocytogenes* einwirken. Zunächst wurde die Invasivität der einzelnen Stämme in Cos-1 Fibroblasten sowie in Caco-2 Epithelzellen miteinander verglichen. Dabei zeigte sich, dass sich das Invasionsverhalten für Cos-1 Zellen nur bei einigen wenigen *L. monocytogenes* Δ TCS RR-Mutanten von wildtypischen Listerien unterschied. Die Stämme *L. monocytogenes* Δ 1507 und *L. monocytogenes* Δ lisR waren deutlich weniger invasiv als der EGD Stamm. Dieser Unterschied war jedoch, verglichen mit der Invasionsrate des *L. monocytogenes* Δ inlAB-Stammes, der Internalin und InlB nicht exprimiert, nicht bedeutend. Worauf die Abweichungen im Invasionsverhalten von *L. monocytogenes* Δ 1507 und *L. monocytogenes* Δ lisR zurückzuführen sind, ist zur Zeit noch nicht bekannt. Interessanterweise zeigten die beiden unbeweglichen Stämme *L. monocytogenes* Δ cheY und *L. monocytogenes* Δ degU, sowie *L. monocytogenes* Δ 1022 höhere Invasionsraten als der wildtypische Stamm. Für die Epithelzelllinie Caco-2 wurde nur für die Stämme *L. monocytogenes* Δ agrA und *L. monocytogenes* Δ lisR ein gegenüber dem Wildtyp signifikant verändertes Invasionsverhalten beobachtet. Der RR LisR scheint demnach die Transkription von Genen zu regulieren, deren Proteinprodukte an der Aufnahme der Listerien sowohl in Fibroblasten, als auch in Epithelzellen beteiligt sind. Im Gegensatz zu den hier gemachten Beobachtungen zeigten Dons *et al.*, dass die Stämme *L. monocytogenes* Δ cheY, Δ cheA und *L. monocytogenes* Δ fIA für Caco-2 Zellen deutlich schlechtere Adhäsions- und Invasionsraten aufwiesen, wenn die Bakterien bei 24° C kultiviert wurden (Dons *et al.*, 2004). Wurden die Bakterien auf den Zellrasen zentrifugiert, waren die Unterschiede in den Adhäsionsraten zwischen den Mutanten und wildtypischen Listerien weniger stark ausgeprägt. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die Beweglichkeit der Listerien dazu beiträgt, den ersten Kontakt zwischen Bakterium und Wirtszelle herzustellen. Infolgedessen konnte kein Unterschied in der Adhärenz zwischen wildtypischen Listerien und der Δ fIA-Mutante beobachtet werden, wenn die Bakterien bei der für die Flagellensynthese nicht-permissiven Temperatur von 37°C kultiviert wurden (Dons *et al.*, 2004). Da die Flagellensynthese bei dem in dieser Arbeit verwendeten *L. monocytogenes* EGD Stamm nicht temperaturreguliert war, wurden die für die Infektionsversuche verwendeten Stämme bei 37° C kultiviert. Während im Falle der unflagellierten DegU-Mutante neben der Unbeweglichkeit weitere, noch nicht identifizierte Faktoren an der erhöhten Invasivität dieses Stammes für Cos-1 Zellen beteiligt sein dürften, können die unterschiedlichen Invasionsraten der in dieser Arbeit und von L. Dons verwendeten *L. monocytogenes* *cheY* in frame Deletionsmutanten für Cos-1 Fibroblasten und Caco-2 Epithelzellen nicht erklärt werden.

Die Fähigkeit, den intrazellulären Lebenszyklus zu Durchlaufen, ist in keiner der untersuchten *L. monocytogenes* Δ TCS RR-Mutanten beeinträchtigt. Bezüglich

der intrazellulären Vermehrung der einzelnen Deletionsmutanten sowie der Aktinschweifbildung und Aktin-abhängigen Ausbreitung von Zelle zu Zelle konnten keine Unterschiede im Vergleich zum Wildtyp EGD festgestellt werden. Diesen Ergebnissen verschiedener Zellkulturversuche zufolge werden durch die Deletion der Response Regulatorgene unter den angewandten Versuchs- und Kulturbedingungen weder die Replikation im Zytoplasma von Makrophagen, noch die für intra- und interzelluläre Bewegung notwendige Aktinpolymerisation in irgendeiner Weise beeinträchtigt. Diese Ergebnisse decken sich mit den Westernblot-Analysen, wonach die TCS von für die Expression der Virulenzfaktoren, die für ein Durchlaufen des Lebenszyklus notwendig sind, nicht von Bedeutung sind.

Im Mausmodell zeigten die meisten der *L. monocytogenes* Δ TCS RR-Mutanten drei Tage nach intravenöser Verabreichung bezüglich der Anzahl Listerien in Milz und Leber keinen signifikanten Unterschied im Vergleich zum Wildtyp EGD. Interessanterweise zeigte die *L. monocytogenes* Δ *degU*-Mutante eine deutliche Virulenzattenuation. Die mit *L. monocytogenes* Δ *degU* infizierten Tiere waren nach außen hin völlig gesund und zeigten kein auffälliges Verhalten, wohingegen einige der Mäuse, die mit *L. monocytogenes* EGD oder *L. monocytogenes* Δ 1745 infiziert worden waren, deutliche Krankheitssymptome aufwiesen. Die Arbeitsgruppe von L. Dons konnte in Infektionsversuchen mit einer bei 37° C kultivierten *L. monocytogenes* Δ *degU*-Mutante ebenfalls zeigen, dass die Deletion des Response Regulatorgens *degU* im Sepsis-Modell der Maus zu einer deutlichen Virulenzattenuation führt (Knudsen *et al.*, 2004). Diese Beobachtung ist wahrscheinlich nicht nur auf die Abwesenheit von Flagellen zurückzuführen, da Mäuse, die mit einer ebenfalls unflagellierten, bei 24° C kultivierten Δ *flaA*-Mutante des Stammes *L. monocytogenes* 12067 infiziert wurden, drei Tage p. i. deutlich mehr CFU's in Leber und Milz aufwiesen als Tiere, die mit dem Wildtyp *L. monocytogenes* 12076 infiziert worden waren (Dons *et al.*, 2004). Des Weiteren wurde gezeigt, dass das Repressor Protein MogR für die Herunterregulation der Motilitätsgenexpression notwendig ist und eine Deletion von *mogR* in einer sehr starken Virulenzattenuation resultiert (Gründling *et al.*, 2004). Dennoch konnte für eine isogene Δ *flaA*-Mutante von *L. monocytogenes* 1040S sowohl nach orogastrischer, als auch nach intravenöser Applikation keine signifikante Virulenzattenuation beobachtet werden (Way *et al.*, 2004). In Übereinstimmung mit Ergebnissen, die mit einer oral verabreichten *L. monocytogenes* Δ *cheAY*-Mutante erhalten wurden (Dons *et al.*, 2004), konnte für die in dieser Arbeit intravenös applizierte *L. monocytogenes* Δ *cheY*-Mutante keine Virulenzattenuation festgestellt werden. Im Gegensatz zu Angaben in der Literatur, wonach intraperitoneal und intravenös applizierte *L. monocytogenes* Δ *agrA*-Mutanten (Autret *et al.*, 2003) virulenzattenuiert sind, verhielt sich dieser Stamm in der Maus in den in dieser Arbeit durchgeführten *in vivo*-Infektionsversuchen nicht signifikant anders als der Wildtyp. Gleichermäßen zeigten sich *L. monocytogenes* Δ *kdpE* und *L. monocytogenes* Δ *cesR*, anders als oral verabreichte *kdpE* und *cesR*-Insertionsmutanten des Stammes *L. monocytogenes* LO28 (Kallipolitis und Ingmer, 2001), im Maus-Modell wie *L. monocytogenes* EGD.

Da sich die *L. monocytogenes* Δ *degU*-Mutante durch Abwesenheit von Flagellen und der beobachteten Virulenzattenuation deutlich von den restlichen Δ TCS RR-Mutanten unterscheidet, wurde dieser Stamm genaueren Analysen unterzogen. Mit der 2D-gelelektrophoretischen Auftrennung der Proteine von *L. monocyto-*

genes $\Delta degU$ und *L. monocytogenes* EGD sollten Zielgene des RR DegU identifiziert werden. Beim Vergleich des extrazellulären Proteoms von bei 37° C kultivierten *L. monocytogenes* EGD und *L. monocytogenes* $\Delta degU$ konnte nach einer massenspektrometrischen Analyse differentiell exprimierter Proteine Lmo0644 als ein in *L. monocytogenes* $\Delta degU$ weniger stark exprimiertes Protein identifiziert werden. Die in der $\Delta degU$ -Mutante stärker exprimierten Proteine wurden als GAP (Lmo2459), TufA (Lmo2653), Tsf (Lmo1657) und SOD (Lmo1439) identifiziert. Bei den meisten dieser Proteine handelt es sich um typische zytoplasmatische Proteine, lediglich Lmo0644 besitzt eine für extrazelluläre Proteine typische Signalsequenz. Über die Funktion dieses Proteins ist jedoch noch nichts bekannt. Aufgrund seiner Aminosäuresequenz könnte es sich bei Lmo0644 um ein Membranprotein handeln, das zur Familie der Zellwand-Biogenese Proteine gehört (Galperin und Jedrzejak, 2001). Es ist unbekannt, warum es in *L. monocytogenes* $\Delta degU$ schwächer exprimiert wird. TufA, von *Imo2653* codiert, ist homolog zum Elongationsfaktor TU (EF-TU) von *E. coli*, einem Schlüsselenzym der Translationsmaschinerie. EF-TU wird für die Anfügung von Aminosäuren an die wachsende Polypeptidkette an den Ribosomen benötigt (Berg *et al.*, 2002). EF-TU fungiert bei *E. coli* außerdem auch als Chaperon und fördert durch die Interaktion mit ungefalteten oder denaturierten Proteinen deren Faltung bzw. Renaturierung (Caldas *et al.*, 1998). Tsf, das von *Imo1657* codiert wird, ist wie TufA ebenfalls ein Teil der bakteriellen Translationsmaschinerie (Nyborg und Kjeldgaard, 1996; Berg *et al.*, 2002). Es gibt noch keine Hinweise darauf, warum diese beiden Proteine im Überstand auftauchen und in der *L. monocytogenes* $\Delta degU$ -Mutante stärker exprimiert werden als im Wildtyp. Die ebenfalls in *L. monocytogenes* $\Delta degU$ stärker exprimierte Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (GAP) ist ein Enzym der Glykolyse, wo es unter ATP-Verbrauch die Oxidation von Glycerinaldehyd-3-Phosphat zu 1,3-Bisphosphoglycerat katalysiert. GAP spielt auch im Calvinzyklus eine Rolle, es reduziert dort zwei Moleküle 1,3-Bisphosphoglycerat (1,3-BPG) zu Glycerinaldehyd-3-Phosphat. GAP besitzt ebenfalls keine Signalsequenz, wurde jedoch bereits von Schaumburg *et al.* auf der Oberfläche von *L. monocytogenes* nachgewiesen (Schaumburg *et al.*, 2004). Es könnte daher sein, dass dieses Enzym bei der Interaktion von *L. monocytogenes* mit seinen Wirtszellen eine Funktion ausübt. GAP wurde außerdem als eines der Hauptoberflächenproteine von Gruppe A Streptokokken identifiziert, wo es ADP-ribosylierende Eigenschaften sowie Bindungsaffinität zu anderen zellulären Oberflächenproteinen aufweist (Pancholi und Fischetti, 1992; Pancholi und Fischetti, 1993). Die Superoxid-Dismutase SOD wurde ebenfalls in der $\Delta DegU$ -Mutante stärker exprimiert als im Wildtyp EGD. SOD ist an der Neutralisierung toxischer Sauerstoffradikale beteiligt und könnte daher die Listerien vor antilisteriellen Wirtszellmechanismen schützen, die kurz nach dem Eindringen der Bakterien in den Wirt erfolgen. Obwohl SOD, TufA und Tsf keine typische N-terminale Signalsequenz besitzen, wurden diese Proteine ebenfalls auf der Oberfläche von *L. monocytogenes* detektiert (Schaumburg *et al.*, 2004). Welche Funktion sie hier ausüben, wurde bisher noch nicht genauer untersucht.

Im Überstandsprotein-Muster von bei 24° C kultivierten *L. monocytogenes* EGD und *L. monocytogenes* $\Delta degU$ konnten im Vergleich zu den bei 37° C erhaltenen Daten deutlich mehr Spots identifiziert werden, die in der Mutante gar nicht bzw. deutlich schwächer exprimiert werden als im Wildtyp. Durch MS-Analyse wurden einige dieser differentiell exprimierten Proteine identifiziert. Bei den Meisten handelte es sich um Proteine des Flagellenapparates. Neben Proteinen, die den

Basalkörper (FlgG (Lmo0682), FlgC (Lmo0711) und FlgB (Lmo0710)), den Haken (FlgE (Lmo0697) und FlgL (Lmo0706)) und die Flagelle (FlaA (Lmo0690) ausbilden, wurden noch ein Protein unbekannter Funktion (Lmo0695), ein Penicillin Bindungsprotein (Lmo2754) und eine Transglykosylase (Lmo0717) identifiziert. Die Tatsache, dass alle diese Proteine in *L. monocytogenes* $\Delta degU$ nicht bzw. nur sehr schwach exprimiert werden, erklären die Ergebnisse des Motilitätstests und der Elektronenmikroskopischen-Analysen, bei denen fehlende Motilität bzw. fehlende Flagellen in *L. monocytogenes* $\Delta degU$ gezeigt wurden. Dass eine Transglykosylase im Zusammenhang mit Flagellenproteinen in der $\Delta degU$ -Mutante schwächer exprimiert wird könnte darauf zurückzuführen sein, dass Flagellin von *L. monocytogenes*, wie schon früher von anderen Arbeitsgruppen vermutet (Peel *et al.*, 1988; Dons *et al.*, 1992), posttranslational glykosyliert wird (Schirm *et al.*, 2004). Für einige andere Bakterien, darunter *Aeromonas caviae* (Gryllos *et al.*, 2001), *Spirochaeta aurantia* (Brahamsha und Greenberg, 1989), *Azospirillum brasinense* (Moens *et al.*, 1995) und *Caulobacter crescentus* (Leclerc *et al.*, 1998) wurde die Glykosylierung von Flagellin bereits beschrieben. Im Gegensatz zur Glykosylierung der Flagellen dieser Gram-negativen Organismen ist die Glykosylierung bei listeriellen Flagellen auf bis zu sechs β -N-Acetylglukosamine pro Molekül FlaA beschränkt (Schirm *et al.*, 2004). Die O-Glykosylierung von Proteinen ist eine wohl bekannte Modifizierung eukaryotischer Kern- und Zytoplasmaproteine (Torres *et al.*, 1984) und konnte bis vor kurzem nicht für prokaryotische Proteine beschrieben werden (Wells *et al.*, 2003). Die Hemmung der Flagellen-Glykosylierung führt bei *Campylobacter* spp. und *H. pylori* zum Verlust der Motilität. Bei *Pseudomonas* spp. hingegen hat diese ausbleibende Modifizierung keinen Einfluss auf die Flagellensynthese und Motilität der Bakterien (Schirm *et al.*, 2004). Welchen Einfluss die Glykosylierung des listeriellen Flagellins nach sich zieht und ob es für die Flagellensynthese und Motilität eine Rolle spielt, konnte bisher noch nicht geklärt werden.

Die vergleichende Proteomanalyse der Überstandsproteine von bei 24° C und 37° C gewachsenen *L. monocytogenes* EGD ergab überraschenderweise dass, obwohl dieser Stamm temperaturunabhängig Flagellen besaß und beweglich war, die als Flagellenproteine identifizierten Spots bei 37° C nicht zu erkennen waren. Worauf diese widersprüchlichen Ergebnisse zurückzuführen sind konnte nicht weiter geklärt werden. Die Übernachtskulturen, die zur Isolierung der Überstandsproteine verdünnt wurden, waren mit Listerien angeimpft, die bei 4° C auf Platte aufbewahrt und regelmäßig überstrichen wurden. Eventuell führten diese Kultivierungsbedingungen dazu, dass die Flagellenexpression eingestellt wurde.

Für die vergleichenden Proteomanalysen wurden nur Proteine aufgetrennt, deren isoelektrischer Punkt innerhalb des pH-Bereiches 4-7 lag. Es ist daher sehr gut möglich, dass DegU auch die Expression von Genen reguliert, deren Proteinprodukte nicht innerhalb dieses pH-Bereiches liegen. Um einen umfassenderen Überblick über die durch DegU-regulierten Gene zu bekommen, wurden Transkriptomanalysen durchgeführt. Im Vergleich der Genexpressionsmuster von bei 24° C kultivierten *L. monocytogenes* EGD mit der $\Delta degU$ RR-Mutante wurden mehrere Gene erfasst, deren Transkription eindeutig von DegU reguliert wird. Dass die einzelnen Virulenzgene, wie schon aufgrund der Ergebnisse der Westernblot-Analysen und Zellkulturversuche ersichtlich, nicht durch DegU reguliert werden, wurde erneut verifiziert. Das Ergebnis der Proteomanalyse konnte mit diesen Analysen zum Teil ebenfalls bestätigt werden. Von den

Flagellengenenen *flgG*, *flgC*, *flgB*, *flgE*, *flgL* und *flaA*, deren Produkte schon in der 2D-PAGE im EGD-Stamm stärker exprimiert wurden als in der Mutante, konnte im Wildtyp deutlich mehr mRNA nachgewiesen werden als in der Deletionsmutante *L. monocytogenes* $\Delta degU$. Auch von den Genen für Lmo0695, das Penicillin Bindungsprotein Lmo2754 und die Transglykosylase Lmo0717 konnte im Wildtyp mehr Transkript nachgewiesen werden. Des Weiteren konnte von allen Genen, die für Flagellensynthese- und Chemotaxisproteine codieren, im Wildtyp mehr mRNA nachgewiesen werden als in *L. monocytogenes* $\Delta degU$. Die meisten dieser über 40 Gene sind in zwei großen Operons organisiert (*lmo0675-lmo0689*; *lmo0691-lmo0718*). Das Gen *flaA* liegt zwischen diesen beiden Operons und wird monocistronisch transkribiert. Einige wenige DegU-regulierte Gene, darunter *lmo1699*, liegen im Genom an anderer Stelle. Bei manchen Bakterien, wie z.B. *Salmonella typhimurium* oder *E. coli*, läuft die Flagellensynthese nach einer strengen hierarchischen Choreographie ab (Macnab, 1990). Produkte des Klasse I Master Operons agieren als Transkriptionsfaktoren für Gene der Klasse II, deren Produkte wiederum die Transkription der Klasse III-Gene initiieren. Zur Klasse II zählen Gene, die für Proteine des Basalkörpers, den Flagellen-spezifischen Typ III-Sekretionsapparat und den Flagellenhaken codieren. Der alternative Sigmafaktor *fliA*, der die Expression der Klasse III-Gene induziert, gehört ebenfalls der Klasse II an. Gene der Klasse III, so genannte späte Flagellengene, codieren für den Adapter, Filamentuntereinheiten und für Proteine, die an der Chemotaxis und der Flagellenrotation beteiligt sind (Amsler und Matsumura, 1985). In *B. subtilis* sind die Gene für Flagellensynthese und Chemotaxis wie bei *L. monocytogenes* in nur zwei regulatorischen Einheiten angeordnet, ein Master Operon fehlt (Amati *et al.*, 2004). Im *fla-che*-Operon von *B. subtilis* sind die Gene für die Exportmaschinerie der Flagellenproteine sowie Flagellenhaken- und Basalkörperproteine zusammengefasst. Die Transkription dieser Gene erfolgt von einem σ^A abhängigen Promotor aus. Das Gen *sigD*, das für den alternativen Sigmafaktor D codiert, befindet sich ebenfalls innerhalb dieses Operons und ist ganz an dessen Ende angeordnet. Der Transkriptionsfaktor σ^D induziert die Transkription der Gene des σ^D -Regulons, darunter der σ^D -spezifische anti- σ -Faktor *flgM*, das Flagellin, die Gene für den Motorkomplex sowie weitere Flagellenbiosynthese- und Chemotaxisgene. Das Gen *flgM* ist an der Regulation der Expression des σ^D -Regulons beteiligt. Die Transkription dieses Regulons wird erst induziert, wenn FlgM durch den fertig gestellten Basalkörper sekretiert wird (Barillà *et al.*, 1994). Phosphoryliertes DegU wirkt in *B. subtilis* als negativer Regulator von Motilität und Chemotaxis, indem es über einen noch unbekanntem Mechanismus die Expression von σ^D reprimiert und dadurch die Transkription der Motilitätsgene hemmt (Amati *et al.*, 2004). Zwar weist die genomische Sequenz von *L. monocytogenes* upstream von *degU*, *flaA*, dem *cheY-cheA*-Operon und dem Virulenzgen *inlA* Motive auf, die Ähnlichkeiten zur Konsensus-Sequenz für σ^D -Promotoren aufweisen (Knudsen *et al.*, 2004), ein zu σ^D homologes Protein wurde jedoch bisher noch nicht identifiziert. Das könnte bedeuten, dass die Flagellenregulation einem anderen Mechanismus unterliegt. Als ein die Expression der Flagellen- und Chemotaxisgene regulierendes Protein wurde MogR (Lmo0674) identifiziert (Gründling *et al.*, 2004). Es bindet an die DNA des *flaA*-Promotors und verhindert dadurch die Expression von *flaA*. Die Expression der Motilitäts- bzw. Chemotaxisgene *cheY* und *lmo0675* wird ebenfalls durch MogR reguliert. In den Sequenzdatenbanken sind noch keine charakterisierten, zu MogR homologe Proteine zu finden. Man findet jedoch in *L. innocua*, *Bacillus*

cereus und *B. anthracis* uncharakterisierte Proteine, die Homologie zu MogR aufweisen (Gründling et al., 2004). Die Gene, die für diese MogR-homologen Proteine codieren, sind dabei wie *mogR* in der Nähe von Genen lokalisiert, deren Produkte zur Flagellen-basierten Motilität der Bakterien beitragen. *L. monocytogenes mogR*-Deletionsmutanten zeigten sich im Mausmodell als virulenzattenuiert und in Zellkulturversuchen in der Ausbreitung von Zelle zu Zelle beeinträchtigt (Gründling et al., 2004). Ob ein direkter Zusammenhang zwischen DegU und MogR besteht, wurde bisher noch nicht untersucht. *L. monocytogenes ΔdegU* ist wie *L. monocytogenes ΔmogR* im Mausmodell virulenzattenuiert. Jedoch hat die Deletion von *degU* wie weiter oben beschrieben keinen Einfluss auf die Expression von Virulenzfaktoren und den Infektionszyklus *in vitro*. Das Gen *mogR* konnte in den Transkriptomanalysen nicht als ein DegU-reguliertes Gen identifiziert werden. Die Menge an MogR-spezifischer mRNA war bei *L. monocytogenes* EGD und *L. monocytogenes ΔdegU* gleich. Im Falle einer Regulation von *mogR* durch DegU hätte man eine stärkere Expression von *mogR* und damit einhergehend eine eingeschränkte intra- und interzelluläre Bewegung erwartet.

Die Daten der Transkriptomanalysen bei 37° C decken sich nicht so gut mit den Proteomanalysen der Überstandsproteine. Für *gap*, *sod*, *tufA* und *tsf*, deren Proteinprodukte laut 2D-Gel in *L. monocytogenes ΔdegU* stärker exprimiert werden, wurden im Transkriptom von *L. monocytogenes* EGD und *L. monocytogenes ΔdegU* gleiche Transkriptmengen ermittelt. Diese Ergebnisse implizieren, dass die Transkription dieser vier Gene nicht durch DegU reguliert wird. Lediglich von *Imo0644*, dem Gen unbekannter Funktion, konnte im Wildtyp im Vergleich zur *ΔdegU*-Deletionsmutante mehr mRNA nachgewiesen werden. Die Beobachtung, dass sich die Ergebnisse der Proteom- und Transkriptomanalysen bei 37° C widersprechen könnte darauf zurückzuführen sein, dass Proteine stabiler sind als kurzlebige mRNAs und sich in den Bakterien ansammeln können. Ob alle Proteine der Gene, die bei 24° C auf Transkriptebene als stärker exprimiert identifiziert wurden, auch auf Proteinebene im Gel ein stärkeres Signal geben, müsste nach der vollständigen MS-Analyse aller Proteine in weiteren Experimenten bestätigt werden.

Um zu bestätigen, dass die aufgezeigte Unbeweglichkeit und Virulenzattenuation von *L. monocytogenes ΔdegU* nicht auf sekundäre Mutationen zurückzuführen sind, sollte diese Mutante mit dem kompletten *degU*-Gen komplementiert werden. Dazu wurde das *degU*-Gen mitsamt Promotor mittels PCR amplifiziert und in einen Expressionsvektor ligiert. Dieses Plasmid ließ sich allerdings nicht in *E. coli* DH5α oder *L. monocytogenes* transformieren. Dennoch kann mit großer Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden, dass der Phänotyp von *L. monocytogenes ΔdegU* auf Sekundärmutationen beruht da Knudsen et al. kürzlich eine *ΔdegU*-Mutante mit sehr ähnlichen Eigenschaften (fehlende Beweglichkeit und Flagellensynthese) beschrieben haben (Knudsen et al., 2004).

7 Literaturverzeichnis

Alberts, B., D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and J. D. Watson. 1993. Molekularbiologie der Zelle. 3. Auflage, Weinheim: VCH.

Amati, G., P. Bisicchia, and A. Galizzi. 2004. DegU-P represses expression of the motility *fla-che* operon in *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. **186**:6003-6014.

Amsler, C. D., and P. Matsumura. 1995. Chemotactic signal transduction in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. pp 89-103. In J. A. Hoch and T. J. Silhavy (ed.), Two-component signal transduction. American Society for Microbiology, Washington, D. C.

Arthur, M., and R. Quintiliani Jr. 2001. Regulation of VanA- and VanB-type glycopeptide resistance in enterococci. Antimicrob. Agents Chemother. **45**:375-381.

Auerbuch, V. J. J. Loureiro, F. B. Gertler, J. A. Theriot, and D. A. Portnoy. 2003. Ena/VASP proteins contribute to *Listeria monocytogenes* pathogenesis by controlling temporal and spatial persistence of bacterial actin-based motility. Mol. Microbiol. **49**:1361-1375.

Autret, N., C. Raynaud, I. Dubail, P. Berche, and A. Charbit. 2003. Identification of the *agr* locus of *Listeria monocytogenes*: role in bacterial virulence. Infect. Immun. **71**:4463-4471.

Bachmann C., L. Fischer, U. Walter, and M. Reinhard. 1999. The EVH2 domain of the vasodilator-stimulated phosphoprotein mediates tetramerization, F-actin binding, and actin bundle formation. J. Biol. Chem. **274**:23549-23557.

Ball, L. J., R. Kuhne, B. Hoffmann, A. Hafner, P. Schmieder, R. Volkmer-Engert, M. Hof, M. Wahl, J. Schneider-Mergener, U. Walter, H. Oschkinat, und T. Jarchau. 2000. Dual epitope recognition by the VASP EVH1 domain modulates polyproline ligand specificity and binding affinity. EMBO J. **19**:4903-4914.

Barillá, D., T. Caramori, and A. Galizzi. 1994. Coupling of flagellin gene transcription to flagellar assembly in *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. **176**:4558-4564.

Bauer, S., T. Pfeuffer, and M. Kuhn. 2003. Identification and characterization of regions in the cellular protein LaXp180 and the *Listeria monocytogenes* surface protein ActA necessary for the interaction of the two proteins. **268**:607-617.

Bear, J. E., T. M. Svitkina, M. Krause, D. A. Schafer, J. J. Loureiro, G. A. Strasser, I. V. Maly, O. Y. Chaga, J. A. Cooper, G. G. Borisy, and F. B. Gertler. 2002. Antagonism between Ena/VASP proteins and actin filament capping regulates fibroblast motility. Cell **109**:509-521.

- Bedouet, L., F. Arnold, G. Robreau, P. Batina, F. Talbot, and A. Binet.** 1998. Evidence for an heterogeneous glycosylation of the *Clostridium tyrobutyricum* ATCC 25755 flagellin. *Microbios.* **94**:183-192.
- Beier, D., and R. Frank.** 2000. Molecular characterization of two-component systems of *Helicobacter pylori*. *J. Bacteriol.* **182**:2068-2076.
- Beretta, L., T. Dobransky, and A. Sobel.** 1993. Multiple phosphorylation of stathmin. Identification of four sites phosphorylated in intact cells and in vitro by cyclic AMP-dependent protein kinase and p34cdc2. *J. Biol. Chem.* **268**:20076-20084.
- Berg, J. M., J. L. Tymoczko, and L. Stryer.** 2002. *Biochemistry*, 5th edition. W. H. Freeman and Company, New York.
- Bernardini, M. L., J. Mounier, H. d'Hauteville, M. Coquis-Rondon, and P. J. Sansonetti.** 1989. Identification of *icsA*, a plasmid locus of *Shigella flexneri* that governs bacterial intra- and intercellular spread through interaction with F-actin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**:3867-3871.
- Bibikov, S. I., L. A. Barnes, Y. Gitin, and J. S. Parkinson.** 2000. Domain organization and flavin adenine dinucleotide-binding determinants in the aerotaxis signal transducer Aer of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**:5830-5835.
- Bilwes, A. M., L. A. Alex, B. R. Crane, and M. I. Simon.** 1999. Structure of CheA, a signal-transducing histidine kinase. *Cell* **96**:131-141.
- Blattner F. R, G. Plunkett 3rd, C. A. Bloch, N. T. Perna, V. Burland, M. Riley, J. Collado-Vides, J. D. Glasner, C. K. Rode, G. F. Mayhew, J. Gregor, N. W. Davis, H. A. Kirkpatrick, M. A. Goeden, D. J. Rose, B. Mau, and Y. Shao.** 1997. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* **277**:1453-74.
- Boujemaa-Paterski, R., E. Guin, G. Hansen, S. Samarin, C. Le Clainche, D. Didry, P. Dehoux, P. Cossart, C. Kocks, M. F. Carlier, and D. Pantaloni.** 2001. *Listeria* protein ActA mimics WASp family proteins: it activates filament barbed end branching by Arp2/3 complex. *Biochem.* **40**:11390–11404
- Bower, C.K., and M. A. Daeschel.** 1999. Resistance responses of microorganisms in food environments. *Int. J. Food Microbiol.* **50**:33-44.
- Brahamsha, B., and E. P. Greenberg.** 1989. Cloning and sequence analysis of *flaA*, a gene encoding a *Spirochaeta aurantia* flagellar filament surface antigen. *J. Bacteriol.* **171**:1692-1697.
- Braun, L., S. Dramsi, P. Dehoux, H. Bierne, G. Lindahl, and P. Cossart.** 1997. InlB: an invasion protein of *Listeria monocytogenes* with a novel type of surface association. *Mol. Microbiol.* **25**:285-294.

- Braun, L., B. Ghebrehiwet, and P. Cossart.** 2000. gC1q-R/p32, a C1q-binding protein, is a receptor for the InlB invasion protein of *Listeria monocytogenes*. *EMBO J.* **19**:1458-1466.
- Brehm, K., A. Haas, W. Goebel, and J. Kreft.** 1992. A gene encoding a superoxide dismutase of the facultative intracellular bacterium *Listeria monocytogenes*. *Gene.* **118**:121-125.
- Breitbach, K., K. Rottner, S. Klocke, M. Rohde, A. Jenzora, J. Wehland, and I. Steinmetz.** 2003. Actin-based motility of *Burkholderia pseudomallei* involves the Arp2/3 complex, but not N-WASP and Ena/VASP proteins. *Cell. Microbiol.* **5**:385-393.
- Brøndsted L., B. H. Kallipolitis, H. Ingmer, and S. Knöchel.** 2003. *kdpE* and a putative RsbQ homologue contribute to growth of *Listeria monocytogenes* at high osmolarity and low temperature. *FEMS Microbiology Lett.* **219**:233-239.
- Brundage, R. A., G. A. Smith, A. Camilli, J. A. Theriot, and D. A. Protnoy.** 1993. Expression and phosphorylation of the *Listeria monocytogenes* ActA protein in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**:11890-11894.
- Brunskill, E. W., and K. W. Bayles.** 1996. Identification and molecular characterization of a putative regulatory locus that affects autolysis in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **178**:611-618.
- Cabanes, D., P. Dehoux, O. Dussurget, L. Frangeul, and P. Cossart.** 2002. Surface proteins and the pathogenic potential of *Listeria monocytogenes*. *Trends Microbiol.* **10**:238-245.
- Caldas, T. D., A. E. Yaagoubi, and G. Richarme.** 1998. Chaperone properties of bacterial elongation factor EF-TU. *J. Biol. Chem.* **273**:11478-11482.
- Carrero, J. A., B. Calderon, and E. R. Unante.** 2004. Listeriolysin O from *Listeria monocytogenes* is a lymphocyte apoptogenic molecule. *J. Immunol.* **172**:4866-4874.
- Chakraborty, T., F. Ebel, E. Domann, K. Niebuhr, B. Gerstel, S. Pistor, C. J. Temm-Grove, B. M. Jockusch, M. Reinhard, and U. Walter.** 1995. A focal adhesion factor directly linking intracellularly motile *Listeria monocytogenes* and *Lister ivanovii* to the actin-based cytoskeleton of mammalian cells. *EMBO J.* **14**:1314-1321.
- Chano, T., S. Ikegawa, F. Saito-Ohara, J. Inazawa, A. Mabuchi, Y. Saeki, and H. Okabe.** 2002. Isolation, characterization and mapping of the mouse and human *RB1CC1* genes. *Gene* **291**:29-34.
- Chico-Calero, I., M. Suarez, B. Gonzalez-Zorn, M. Scotti, J. Slaghuis, W. Goebel, J. A. Vazquez-Boland J. A., and European Listeria Genome Consortium.** 2002. Hpt, a bacterial homolog of the microsomal glucose-6-phosphate translocase, mediates rapid intracellular proliferation in *Listeria*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**:431-436.

- Cicchetti, G., P. Maurer, P. Wagener, and C. Kocks.** 1999. Actin and phosphoinositide binding by the ActA-protein of the bacterial pathogen *Listeria monocytogenes*. *J. Biol. Chem.* **274**:33616-33626.
- Cole, S. T., R. Brosch, J. Parkhill, T. Granier, C. Churcher, D. Harris, S. V. Gordon, K. Eiglmeier, S. Gas, C. E. Barry III, F. Tekaia, K. Baddock, D. Basham, D. Brown, T. Chillingworth, R. Connoer, R. Davies, K. Devlin, T. Feltwell, S. Genties, N. Harnlin, S. Holroyd, T. Hornsby, K. Jagels, A. Krough, J. McLean, S. Moule, L. Murphy, K. Oliver, J. Osborne, M. A. Quail, M.-A. Rajandoam, J. Rogers, S. Rutter, K. Seeger, J. Skelton, R. Squares, S. Squares, L. E. Sulston, K. Taylor, S. Whitehead, and B. G. Barrell.** 1998. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genomic sequence. *Nature* **393**: 537-544
- Cossart, P., and J. Mengaud.** 1989. *Listeria monocytogenes*, a model system for the molecular study of intracellular parasitism. *Mol. Biol. Med.* **6**:463-474.
- Cossart, P., and M. Lecuit.** 1998. Interaction of *Listeria monocytogenes* with mammalian cells during entry and actin-based movement: bacterial factors, cellular ligands and signaling. *EMBO J.* **17**:3797-3806.
- Cossart, P.** 2000. Actin based motility of pathogens: the Arp2/3 complex is a central player. *Cell. Microbiol.* **2**:195-205.
- Cotter, P. D., N. Emerson, C. G. Gahan, and C. Hill.** 1999. Identification and disruption of *lisRK*, a genetic locus encoding a two-component signal transduction system involved in stress tolerance and virulence in *Listeria monocytogenes*. *J. Bacteriol.* **181**:6840-6843.
- Cotter, P. D., C. M. Guinane, and C. Hill.** 2003. The LisRK signal transduction system determines the sensitivity of *Listeria monocytogenes* to nisin and cephalosporins. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**:2784-2790.
- Cudmore S., P. Cossart, G. Griffiths, and M. Way.** 1995. Actin-based motility of *vaccinia* virus. *Nature* **378**:636-638.
- Dabiri, G. A., J. M. Sanger, D. A. Portnoy, and F. S. Southwick.** 1990. *Listeria monocytogenes* moves rapidly through the host-cell cytoplasm by inducing directional tail assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**:6068-6072.
- Decatur, A. L., and D. A. Portnoy.** 2000. A PEST-like sequence in listeriolysin O essential for *Listeria monocytogenes* pathogenicity. *Science* **290**:992-995.
- Delgado-Nixon, V. M., G. Gonzalez, and M. A. Gilles-Gonzalez.** 2000. Dos, a heme-binding PAS protein from *Escherichia coli*, is a direct oxygen sensor. *Biochem.* **39**:2685-2691.
- Dietrich, G., A. Bubert, I. Gentschev, Z. Sokolovic, A. Simm, A. Catic, S. H. Kaufmann, J. Hess, A. A. Szalay, and Goebel W.** 1998. Delivery of antigen-encoding plasmid DNA into the cytosol of macrophages by attenuated suicide *Listeria monocytogenes*. *Nat. Biotechnol.* **16**:181-185.

Dinnbier, U., E. Limpinsel, R. Schmid, and E. P. Bakker. 1988. Transient accumulation of potassium glutamate and its replacement by trehalose during adaptation of growing cells of *Escherichia coli* K-12 to elevated sodium chloride concentrations. *Arch. Microbiol.* **150**:348-357.

Di Paolo, P., R. Loutjens, A. Osen-Sand, A. Sobel, S. Catsicas, and G. Grenningloh. 1997. Differential distribution of stathmin and SCG10 in developing neurons in culture. *Neurosci. Res.* **50**:1000-1009.

Domann, E., M. Leimeister-Wächter, W. Goebel, and T. Chakraborty. 1991. Molecular cloning, sequencing, and identification of a metalloprotease gene from *Listeria monocytogenes* that is species specific and physically linked to the listeriolysin gene. *Infect. Immun.* **59**:65-72.

Domann, E., J. Wehland, M. Rohde, S. Pistor, M. Hartl, W. Goebel, M. Leimeister-Wächter, M. Wuenscher, and T. Chakraborty. 1992. A novel bacterial virulence gene in *Listeria monocytogenes* required for host cell microfilament interaction with homology to the proline-rich region of vinculin. *EMBO J.* **11**:1981-1990.

Donnelly, C. W. 1990. Concerns of microbial pathogens in association with dairy foods. *J. Dairy Sci.* **73**:1656-1661.

Dons, L., O. F. Rasmussen, and J. E. Olsen. 1992. Cloning and characterization of a gene encoding flagellin of *Listeria monocytogenes*. *Mol. Microbiol.* **6**:2919-2929.

Dons, L., J. E. Olsen, and O. F. Rasmussen. 1994. Characterization of two putative *Listeria monocytogenes* genes encoding polypeptides homologous to the sensor protein CheA and the response regulator CheY of chemotaxis. *DNA Seq.* **4**:301-311.

Dons, L., E. Eriksson, Y. Jin, M. E. Rottenberg, K. Kristensson, C. N. Larsen, J. Bresciani, and J. E. Olsen. 2004. Role of flagellin and the two-component CheA/CheY system of *Listeria monocytogenes* in host cell invasion and virulence. *Infect. Immun.* **72**:3237-3244.

Dramsi, S., P. Dehoux, M. Lebrun, P. L. Goosens, and P. Cossart. 1997. Identification of four new members of the internalin mutligene family of *Listeria monocytogenes* EGD. *Infect. Immun.* **65**:1615-1625.

Dramsi, S., and P. Cossart. 1998. Intracellular pathogens and the actin cytoskeleton. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* **14**:137-166.

Drevets, D. A., and R. T. Sawyer, T. A. Potter, and P. A. Campbell. 1995. *Listeria monocytogenes* infects human endothelial cells by two distinct mechanisms. *Infect. Immun.* **63**:4268-4276.

Dussurget, O., D. Cabanes, P. Dehoux, M. Lecuit, the European Listeria Genome Consortium, C. Buchrieser, P. Glaser, and P. Cossart. 2002. *Listeria*

monocytogenes bile salt hydrolase is a PrfA-regulated virulence factor involved in the interstitial and hepatic phases of listeriosis. *Mol. Microbiol.* **45**:1095-1106.

Dutta, R., L. Qin, and M. Inouye. 1999. Histidine kinases: diversity of domain organization. *Mol. Microbiol.* **34**:633-640.

Ely, B., T. W. Ely, W. B. Crymes Jr, and S. A. Minnich. 2000. A family of six flagellin genes contributes to the *Caulobacter crescentus* flagellar filament. *J. Bacteriol.* **182**:5001-5004.

Engelbrecht, F. S.-K. Chun, C. Ochs, J. Hess, F. Loospeich, W. Goebel, and Z. Sokolovich. 1996. A new PrfA-regulated gene of *Listeria monocytogenes* encoding a small, secreted protein which belongs to the family of internalins. *Mol. Microbiol.* **21**:823-837.

Fabret, C., and J. A. Hoch. 1998. A two-component signal transduction system essential for growth of *Bacillus subtilis*: implications for anti-infective therapy. *J. Bacteriol.* **180**:6375-6383.

Fabret C., V. A. Feher, and J. A. Hoch. 1999. Two-component signal transduction in *Bacillus subtilis*: how one organism sees its world. **181**:1975-1983.

Farber, J. M., and P. I. Peterkin. 1991. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiol. Rev.* **55**:476-511.

Finlay, B. B., S. Ruschkowski, and S. Dedhar. 1991. Cytoskeletal rearrangements accompanying *salmonella* entry into epithelial cells. *J. Cell Sci.* **99**:283-296.

Foussard, M., S. Cabantous, J.-D. Pédelacq, V. Guillet, S. Tranier, L. Mourey, C. Birck, and J.-P. Samama. 2001. The molecular puzzle of two-component signaling cascades. *Microb. Inf.* **3**:417-424.

Friederich E., E. Guin, R. Hellio, C. Kocks, P. Cossart, and D. Louvard. 1995. Targeting of *Listeria monocytogenes* ActA protein to the plasma membrane as a tool to dissect both actin-based cell morphogenesis and ActA function. *EMBO J.* **14**:2731-2744.

Fukuchi, K., Y. Kasahara, K. Asai, K. Kobayashi, S. Moriya, and N. Ogasawara. 2000. The essential two-component regulatory system encoded by *yycF* and *yycG* modulates expression of the *ftsAZ* operon in *Bacillus subtilis*. *Microbiology* **146**:1573-1583.

Gaillard, J. L., P. Berche, J. Mounier, S. Richard, and P. Sansonetti. 1987. In vitro model of penetration and intracellular growth of *Listeria monocytogenes* in the human enterocyte-like cell line Caco-2. *Infect. Immun.* **55**:2822-2829.

Galperin, M. Y., and M. J. Jedrzejas. 2001. Conserved core structure and active site residues in alkaline phosphatase superfamily enzymes. *Proteins* **45**:318-324.

- Gavet, O., S. Ozon, V. Manceau, S. Lawler, P. Curmi, and A. Sobel.** 1998. The stathmin phosphoprotein family: intracellular localization and effects on the microtubule network. *J. Cell. Sci.* **111**:3333-3346.
- Geoffroy, C., J.-L. Gaillard, E. Alouf, and P. Berche.** 1987. Purification, characterization and toxicity of the sulfhydryl-activated hemolysin listeriolysin O from *Listeria monocytogenes*. *Infect. Immun.* **55**:1641-1646.
- Goeffroy, C., J. Raveneau, J.-L. Beretti, A. Lecroisey, J.-A. Vázquez-Boland, J. E. Alouf, and P. Berche.** 1991. Purification and characterization of an extracellular 29-kilodalton phospholipase C from *Listeria monocytogenes*. *Infect. Immun.* **59**:2382-2388.
- Gertler, F. B., K. Niebuhr, M. Reinhard, J. Wehland, and P. Soriano.** 1996. Mena, a relative of VASP and *Drosophila* Enabled, is implicated in the control of micro-filament dynamics. *Cell* **87**:227-239,
- Glaser, P., L. Frangeul, C. Buchrieser, C. Rusniok, A. Amend, F. Baquero, P. Berche, H. Bloecker, P. Brandt, T. Chakraborty, A. Charbit, F. Chetouani, E. Couvé, A. de Daruvar, L. Durant, O. Dussurget, K.-D. Entian, H. Fishi, F. Garcia-del Portillo, P. Garrido, L. Gautier, W. Goebel, N. Gómez-López, T. Hain, J. Jauf, D. Jackson, L.-M. Jones, U. Kaerst, J. Kreft, M. Kuhn, F. Kunst, G. Kurapat, E. Madueño, A. Maitounam, J. Mata-Vicente, E. Ng, H. Nedjari, G. Nordsiek, S. Novella, B. de Pablos, J.-C. Pérez-Díaz, R. Purcell, B. Remmel, M. Rose, T. Schlueter, N. Simoes, A. Tierrez, J.-A. Vázquez-Boland, H. Voss, J. Wehland, and P. Cossart.** 2001. Comparative genomics of *Listeria* species. *Science* **294**:849-852.
- Goldsteyn, R. M., M. C. Beckerle, T. Koay, and E. Friederich.** 1997. Structural and functional similarities between the human cytoskeletal protein zyxin and the ActA protein of *Listeria monocytogenes*. *J. Cell. Sci.* **110**:4298-4306.
- Gradin, H.M., N. Larsson, U. Marklund, and M. Gullberg.** 1998. Regulation of microtubule dynamics by extracellular signals: cAMP-dependent protein kinase switches off the activity of oncoprotein 18 in intact cells. *J. Cell Biol.* **140**:131-141.
- Gray, M. L., and A. H. Killinger.** 1966. *Listeria monocytogenes* and listeric infections. *Bacteriol. Rev.* **30**:309-382.
- Greiffenberg, L., W. Goebel, K. S. Kim, I. Weiglein, A. Bubert, F. Engelbrecht, M. Stins, and M. Kuhn.** 1998. Interaction of *Listeria monocytogenes* with human brain microvascular endothelial cells: InIB-dependent invasion, long-term intracellular growth, and spread from macrophages to endothelial cells. *Infect. Immun.* **66**:5260-5267.
- Gründling, A., L. S. Burrack, H. G. A. Bouwer, and D. E. Higgins.** 2004. *Listeria monocytogenes* regulates flagellar motility gene expression through MogR, a transcriptional repressor required for virulence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**:12318-12323.

- Guzman, C. A., M. Rohde, T. Chakraborty, E. Domann, M. Hudel, J. Wehland, and K. N. Timmis.** 1995. Interaction of *Listeria monocytogenes* with mouse dendritic cells. *Infect. Immun.* **63**:3665-3673.
- Guzman, C. A., E. Domann, M. Rhode, D. Bruder, A. Darji, S. Weiss, J. Wehland, T. Chakraborty, and K. N. Timmis.** 1996. Apoptosis of mouse dendritic cells is triggered by listeriolysin O, the major virulence determinant of *Listeria monocytogenes*. *Mol. Microbiol.* **20**: 119-126.
- Gryllos, I., J. G. Shaw, R. Gavin, S. Merino, and J. M. Tomas.** 2001. Role of *flm* locus in mesophilic *Aeromonas* species adherence. *Infect. Immun.* **69**:65-74.
- Hanash, S. M., J. R. Strahler, R. Kuik, E. H. Y. Chu, and D. Nicholas.** 1988. Identification of a polypeptide associated with the malignant phenotype in acute leukemia. *J. Biol. Chem.* **263**:12813-12815.
- Hancock L., and M. Perego.** 2002. Two-component signal transduction in *Enterococcus faecalis*. *J Bacteriol.* **184**:5819-5825.
- Hauf, N., W. Goebel, F. Fiedler, Z. Sokolovic, and M. Kuhn.** 1997. *Listeria monocytogenes* infection of P388D₁ macrophages results in a biphasic NF- κ B (RelA/p50) activation induced by lipoteichoic acid and bacterial phospholipases and mediated by I κ B α and I κ B β degradation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**:9394-9399.
- Hecht, G. B., T. Lane, N. Ohta, J. M. Sommer, and A. Newton.** 1995. An essential single domain response regulator required for normal cell division and differentiation in *Caulobacter crescentus*. *EMBO J.* **14**:3915-3924.
- Heinzen R. A., S. S. Grieshaber, L. S. Van Kirk, and C. J. Devin.** 1999. Dynamics of actin-based movement by *Rickettsia rickettsii* in vero cells. *Infect. Immun.* **67**:4201-4207.
- Hicks, G. R., and N. V. Reikhel.** 1995. Protein import into the nucleus: an integrated view. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* **11**:155-188.
- Hoch, J. A.** 2000. Two-component and phosphorelay signal transduction. *Curr. Opin. Microbiol.* **3**:165-170.
- Hof, H., T. Nichterlein, and M. Kretschmar.** 1997. Management of listeriosis. *Clin. Microbiol. Rev.* **10**:345-357.
- Hoffmann, T., B. Troup, A. Szabo, C. Hungerer, and D. Jahn.** 1995. The anaerobic life of *Bacillus subtilis*: cloning of the genes encoding the respiratory nitrate reductase system. *FEMS Microbiol. Lett.* **131**:219-225.
- Holtmann, G., E. P. Bakker, N. Uozumi, and E. Bremer.** 2003. KtrAB and KtrCD: two K⁺ uptake systems in *Bacillus subtilis* and their role in adaptation to hypertonicity. *J. Bacteriol.* **185**:1289-1298.

Howell, B., N. Larsson, M. Gullberg, and L. Cassimeris. 1999. Dissociation of the tubulin-sequestering and microtubule catastrophe-promoting activities of oncoprotein 18/stathmin. *Mol. Biol. Cell.* **10**:105-118.

Howell, A., S. Dubrac, K. K. Andersen, D. Noone, J. Fert, T. Msadek, and K. Devine. 2003. Genes controlled by essential YycG/YycF two-component system of *Bacillus subtilis* revealed through a novel hybrid regulator approach. *Mol. Microbiol.* **49**:1639-1655.

Ingram, L. O., N. S. Vreeland, and L. C. Eaton. 1980. Alcohol tolerance in *Escherichia coli*. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **13**:191-195.

Ireton, K., and P. Cossart. 1998. Interaction of invasive bacteria with host signaling pathways. *Curr. Opin. Cell Biol.* **10**:276-283.

Johansson, J., P. Mandin, A. Rentoni, C. Chiaruttini, M. Springer, and P. Cossart. 2002. An RNA thermosensor controls expression of virulence genes in *Listeria monocytogenes*. *Cell* **110**:551-561.

Jones, C. J., and R. M. Macnab. 1990. Flagellar assembly in *Salmonella typhimurium*: analysis with temperature-sensitive mutants. *J. Bacteriol.* **172**:1327-1339.

Jones, S., and D. A. Portnoy. 1994. Characterization of *Listeria monocytogenes* pathogenesis in a strain expressing perfringolysin O in place of listeriolysin O. *Infect. Immun.* **62**:5608-5613.

Jonquière, R., H. Bierne, F. Fiedler, P. Gounon, and P. Cossart. 1999. Interaction between the protein InlB of *Listeria monocytogenes* and lipoteichoic acid: a novel mechanism of protein association at the surface of Gram-positive bacteria. *Mol. Microbiol.* **34**:902-914.

Joseph, B., S. K. Otta, I. Karunasagar, and I. Karunasagar. 2001. Biofilm formation by *salmonella* spp. on food contact surfaces and their sensitivity to sanitizers. *Int. J Food Microbiol.* **64**:367-372.

Kallipolitis, B. H., and H. Ingmer. 2001. *Listeria monocytogenes* response regulators important for stress tolerance and pathogenesis. *FEMS Microbiol. Lett.* **204**:111-115.

Kallipolitis, B. H., H. Ingmer, C. G. Gahan, C. Hill, and L. Sogaard-Andersen. 2003. CesRK, a two-component signal transduction system in *Listeria monocytogenes*, responds to the presence of cell wall-acting antibiotics and affects β -lactam resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**:3421-3429.

Karunasagar, I., R. Lampidis, W. Goebel, and J. Kreft. 1997. Complementation of *Listeria seeligeri* with the *plcA-prfA* genes from *L. monocytogenes* activates transcription of seeligerolysin and leads to bacterial escape from the phagosome of infected mammalian cells. *FEMS Microbiol. Lett.* **146**:303-310.

- Kim, D., and S. Forst.** 2001. Genomic analysis of the histidine kinase family in bacteria and archaea. *Microbiol.* **147**:1197-1212.
- Knudsen, G. M., J. E. Olsen, and L. Dons.** 2004. Characterization of DegU, a response regulator in *Listeria monocytogenes*, involved in regulation of motility and contributes to virulence. *FEMS Microbiol. Lett.* **240**:171-179.
- Knuth, K.** 2004. Identifizierung von essentiellen Genen in *Salmonella typhimurium* und *Listeria monocytogenes* durch Genom-weite Insertions-Duplikations-Mutagenese. Dissertation. Universität Würzburg.
- Kocks, C., E. Guoin, M. Tabouret, P. Berche, H. Ohayon, and P. Cossart.** 1992. *L. monocytogenes*-induced actin assembly requires the *actA* gene product, a surface protein. *Cell* **68**:521-531.
- Kocks, C., J. B. Marchand, E. Guoin, H. d'Hauteville, P. J. Sansonetti, M.-F. Carlier, and P. Cossart.** 1995. The unrelated surface protein ActA of *Listeria monocytogenes* and *IcsA* of *Shigella flexneri* are sufficient to confer actin-based motility on *Listeria innocua* and *Escherichia coli* respectively. *Mol. Microbiol.* **18**:413-423.
- Koppel, J., M. C. Bouterin, V. Doye, H. Peyro-Saint-Paul, and A. Sobel.** 1990. Developmental tissue expression and phylogenetic conservation of stathmin, a phosphoprotein associated with cell regulations. *J. Biol. Chem.* **265**:3703-3707.
- Kreft, J., and J.-A. Vázquez-Boland.** 2001. Regulation of virulence genes in *Listeria*. *Int. J. Med. Microbiol.* **291**:145-157.
- Kreft, J., J. Bohne, R. Gross, H. Kestler, Z. Sokolovic, and W. Goebel.** 1995a. Control of *Listeria monocytogenes* virulence by the transcription regulator PrfA. In: Signal transduction and bacterial virulence, R. Rappuoli (ed.), Springer Verlag, Heidelberg, p129-137.
- Kuhn, M., S. Kathariou, and W. Goebel.** 1988. Hemolysin supports survival but not entry of the intracellular bacterium *Listeria monocytogenes*. *Infect. Immun.* **56**:79-82.
- Kuhn, M.,** 1998. The microtubule depolymerising drug nocodazole and colchicine inhibit the uptake of *Listeria monocytogenes* by P338D₁ macrophages. *FEMS Microbiol. Lett.* **160**:87-90.
- Kunst, F., N. Ogasawara, I. Moszer, A. M. Albertini, G. Alloni, V. Azevedo, M. G. Bertero, P. Bessi eres, A. Bolotin, S. Borchert, R. Borriss, L. Boursier, A. Brans, M. Braun, S. C. Brignell, S. Bron, S. Brouillet, C. V. Bruschi, B. Caldwell, V. Capuano, N. M. Carter, S. K. Choi, J. J. Codani, I. F. Connerton, N. J. Cummings, R. A. Daniel, F. Denizot, K. M. Devine, A. D usterh oft, S. D. Ehrlich, P. T. Emmerson, K. D. Entian, J. Errington, C. Fabret, E. Ferrari, D. Foulger, C. Fritz, M. Fujita, Y. Fujita, S. Fuma, A. Galizzi, N. Galleron, S.-Y. Ghim, P. Glaser, A. Goofeau, E. J. Golightly, G. Grandi, G. Guiseppe, B. J. Guy, K. Haga, J. Haiech, C. R. Harwood, A. H enaut, H. Hilbert, S. Holsappel,**

S. Hosono, M.-F. Hullo, M. Itaya, L. Jones, B. Joris, D. Karamata, Y. Kasahara, M. Klaerr-Blanchard, C. Klein, Y. Kobayashi, P. Koetter, G. Koningstein, S. Krogh, M. Kumano, K. Kurita, A. Lapisud, S. Lardinois, J. Lauber, V. Lazaeriv, S.-M. Lee, A. Levine, H. Liu, S. Masuda, C. Mauel, C. Médigue, N. Medina, R. P. Mellado, M. Mizuno, D. Moestl, S. Nakai, M. Noback, D. Noone, M. O'Reilly, K. Ogawa, A. Ogiwara, B. Oudega, S.-H. Park, V. Parro, T. M. Pohl, D. Portetelle, S. Porwollik, A. M. Prescott, E. Presecan, P. Pujic, B. Purnelle, G. Rapoport, M. Rey, S. Reynolds, M. Rieger, C. Rivolta, E. Rocha, B. Roche, M. Rose, Y. Sadaie, T. Sato, E. Scanlan, S. Schleich, R. Schroeter, F. Scoffone, J. Sekiguchi, A. Sekowska, S. J. Seror, P. Serror, B.-S. Shin, B. Soldo, A. Sorokin, E. Tacconi, T. Takagi, H. Takahashi, K. Takemaru, M. Takeuchi, A. Tamakoshi, T. Tanaka, P. Terpstra, A. Tognoni, V. Tosato, S. Uchiyama, M. Vandenbol, F. Vannier, A. Vassarotti, A. Viari, B. Wambutt, E. Wedler, H. Wedler, T. Weitzenesser, P. Winters, A. Wipat, H. Yamamoto, K. Yamane, K. Yasumoto, K. Yata, K. Yoshida, H.-F. Yoshikawa, E. Zumstein, H. Yoshikawa, and A. Danchin. 1997. The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature* **390**:249-256.

Landschulz, W. H., P. F. Johnson, and S. L. McKnight. 1988. The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. *Scienc.* **240**:1759-1764.

Lammerding, A. M., and M. P. Doyle. 1990. Evaluation of enrichment procedures for recovering *Listeria monocytogenes* from dairy products. *Int. J. Food Microbiol.* **9**:249-268.

Lampidis, R., R. Gross, Z. Sokolovic, W. Goebel, and J. Kreft. 1994. The virulence regulator protein of *Listeria ivanovii* is highly homologous to PrfA from *Listeria monocytogenes* and both belong to the Crp-Fnr family of transcription regulators. *Mol. Microbiol.* **13**:141-151.

Larsson, N., U. Marklund, H. M. Gradin, G. Brattsand, and M. Gullberg. 1997. Control of mikrotubuli dynamics by oncoprotein 18: dissection of the regulatory role of multisite phosphorylation during mitosis. *Mol. Cell. Biol.* **17**:5530-5539.

Lasa, I., V. David, E. Gouin, J.-B. Marchand, and P. Cossart. 1995. The amino-terminal part of ActA is critical for actin-based motility of *Listeria monocytogenes*; the central prolin-rich region acts as a stimulator. *Mol. Microbiol.* **18**:425-436.

Lasa, I., V. David, E. Gouin, M. Goethals, K. Vancopernolle, V. David, J. Vandekeckhove, and P. Cossart. 1997. Identification of two regions in the N-terminal domain of ActA involved in the actin comet tail formation by *Listeria monocytogenes*. *EMBO. J.* **16**:1531-1540.

Laurent V., T. P. Loisel, B. Harbeck, A. Wehman, L. Grobe, B. M. Jockusch, J. Wehland, F. B. Gertler, and M. F. Carlier. 1999. Role of proteins of the Ena/VASP family in actin-based motility of *Listeria monocytogenes*. *J. Cell. Biol.* **144**:1245-1258.

- Leclerc, G., S. P. Wang, and B. Ely.** 1998. A new class of *Caulobacter crescentus* flagellin genes. *J. Bacteriol.* **180**:5010-5019.
- Lecuit, M., H. Ohayon, L. Braun, J. Mengaud, and P. Cossart.** 1997. Internalin of *Listeria monocytogenes* with an intact leucine-rich repeat region is sufficient to promote internalization. *Infect. Immun.* **65**:5309-5319.
- Lee, A. I., A. Delgado, and R. P. Gunsalus.** 1999. Signal-dependent phosphorylation of the membrane-bound NarX two-component sensor-transmitter protein of *Escherichia coli*: nitrate elicits a superior anion ligand response compared to nitrite. *J. Bacteriol.* **181**:5309-5316.
- Leimeister-Wächter, M., E. Domann, and T. Chakraborty.** 1992. The expression of virulence genes in *Listeria monocytogenes* is thermoregulated. *J. Bacteriol.* **174**:947-952.
- Loisel, T. P., R. Boujema, D. Pantolini, and M.-F. Carlier.** 1999. Reconstitution of actin-based motility of *Listeria* and *Shigella* using pure proteins. *Nature* **401**:603-616.
- Lovric, J., S. Dammeier, A. Kieser, H. Mischak, and W. Kolch.** 1998. Activated *raf* induces the hyperphosphorylation of stathmin and the reorganization of the microtubule network. *J. Biol. Chem.* **273**:22848-22855.
- Luo, X.-N., M. O. Arcasoy, H. E. Brickner, S. Mistry, A. D. Schechter, and G. F. Atweh.** 1991. Regulated expression of p18, a major phosphoprotein of leukemic cells. *J. Biol. Chem.* **266**:21004-21010.
- Luo, X.-N., B. Mookerjee, A. Ferrari, S. Mistry, and G. F. Atweh.** 1994. Regulation of phosphoprotein p18 in leukemic cells. Cell cycle regulated phosphorylation by p34cdc2 kinase. *J. Biol. Chem.* **269**:10312-10318.
- Luo, Q., M. Rauch, A. K. Marr, S. Müller-Altrock, and Goebel W.** 2004. In vitro transcription of the *Listeria monocytogenes* virulence genes *inlC* and *mpl* reveals overlapping PrfA-dependent and -independent promoters that are differentially activated by GTP. *Mol. Microbiol.* **52**:39-52.
- Lupas, A.** 1996. Coiled coils: new structures and new functions. *Trends Biochem. Sci.* **21**:375-382.
- MacFarlane S. A., and M. Merrick.** 1985. The nucleotide sequence of the nitrogen regulation gene *ntrB* and the *glnA-ntrBC* intergenic region of *Klebsiella pneumoniae*. *Nucleic Acids Res.* **13**:7591-7606.
- Machesky, L. M., R. D. Mullins, H. N. Higgs, D. A. Kaiser, L. Blanchoin, R. C. May, M. E. Hall, and T. D. Pollard.** 1999. Scar, a WASp-related protein, activates nucleation of actin filaments by the Arp2/3 complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**:3739-3744.
- Macnab, R. M., and D. P. Han.** 1983. Asynchronous switching of flagellar motors on a single bacterial cell. *Cell.* **32**:109-117.

- Macnab, R. M.** 1990. Genetics, structure, and assembly of the bacterial flagellum. Symp. Soc. Gen. Microbiol. **46**:77-106.
- Macnab, R. M.** 2003. How bacteria assemble flagella. Annu. Rev. Microbiol. **57**:77-100.
- Macnab, R. M.** 2004. Type III flagellar protein export and flagellar assembly. Biochim. Biophys. Acta. **1691**:207-217.
- Madigan, M. T., J. M. Martinko, and J. Parker.** 1997. "Brock", Biology of microorganisms. 8th edit. pp 241-245.
- Marklund, U., N. Larsson, G. Brattsand, O. Osterman, T. A. Chatila, and M. Gullberg.** 1994. Serine 16 of oncoprotein 18 is a major cytosolic target for the Ca²⁺/Calmodulin-dependent kinase-GR. Eur. J. Biochem. **225**:53-60.
- Marklund, U., N. Larsson, H. M. Gradin, G. Brattsand, and M. Gullberg.** 1996. Oncoprotein 18 is a phosphorylation-responsive regulator of microtubule dynamics. EMBO J. **15**:5290-5298.
- Martin, P. K., T. Li, D. Sun, D. P. Biek, and M. B. Schmid.** 1999. Role in cell permeability of an essential two-component system in *Staphylococcus aureus*. J. Bacteriol. **181**:3666-3673.
- Maucuer, A. J. H. Camonis, and A. Sobel.** 1995. Stathmin interaction with a putative kinase and coiled-coil-forming protein domains. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **92**:3100-3104.
- May, R. C., M. E. Hall, H. N. Higgs, T. D. Pollard, T. Chakraborty, J. Wehland, L. M. Machesky, and A. S. Sechi.** 1999. The Arp2/3 complex is essential for the actin-based motility of *Listeria monocytogenes*. Curr. Biol. **9**:759-762.
- Mengaud, J., J. Chenevert, C. Geoffroy, J. L. Gaillard, and P. Cossart.** 1987. Identification of the structural gene encoding the SH-activated hemolysin of *Listeria monocytogenes*: listeriolysin O is homologous to streptolysin O and pneumolysin. Infect. Immun. **55**:3225-3227.
- Mengaud, J., C. Braun-Breton, and P. Cossart.** 1991. Identification of phosphatidylinositol-specific phospholipase C activity in *Listeria monocytogenes*: a novel type of virulence factor? Mol. Microbiol. **5**:367-372.
- Mengaud, J., H. Ohayon, P. Gounon, R.-M. Mege, and P. Cossart.** 1996. E-cadherin is the receptor for internalin, a surface protein required for entry of *Listeria monocytogenes* into epithelial cells. Cell **84**:923-932.
- Merrick, J. C., B. T. Edelson, V. Bhardwaj, P. E. Swanson, and E. R. Unanue.** 1997. Lymphocyte apoptosis during early phase of *Listeria* infection in mice. Am. J. Pathol. **151**:785-792.

- Mikhailov, A., and G. G. Gundersen.** 1998. Relationship between microtubule dynamics and lamellipodium formation revealed by direct imaging of microtubule in cells treated with nocodazole or taxol. *Cell Motil. Cytoskel.* **41**:325-340.
- Milohanic, E., P. Glaser, J.-Y. Coppée, L. Frangeul, Y. Vega, J. A. Vázquez-Boland, F. Kunst, P. Cossart, and C. Buchrieser.** 2003. Transcriptome analysis of *Listeria monocytogenes* identifies three groups of genes differently regulated by PrfA. *Mol. Microbiol.* **47**:1613-1625.
- Mitchison, T. J., and L. P. Cramer.** 1996. Actin-based cell motility and cell locomotion. *Cell* **84**:371-379.
- Moens, S., K. Michiels, V. Keijers, F. Van Leuven, and J. Vanderleyden.** 1995. Cloning, sequencing, and phenotypic analysis of *laf1*, encoding the flagellin of the lateral flagella of *Azospirillum brasilense* Sp7. *J. Bacteriol.* **177**:5419-5426.
- Morel-Deville, F., F. Fauvel, and P. Morel.** 1998. Two-component signal-transducing systems involved in stress responses and vancomycin susceptibility in *Lactobacillus sakei*. *Microbiol.* **144**:2873-2883.
- Moulder, J. W.** 1985. Comparative biology of intracellular parasitism. *Microbiol. Rev.* **49**:298-337.
- Mourrain, P., I. Lasa, A. Gautreau, E. Guoin, A. Pugsley, and P. Cossart.** 1997. ActA is a dimer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**:10034-10039.
- Mullins, R. D., J. A. Heuser, and T. D. Pollard.** 1998. The interaction of Arp2/3 complex with actin: nucleation, high affinity pointed end capping, and formation of branching networks of filaments. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **95**:6181-6186.
- Mutoh N., and M. I. Simon.** 1986. Nucleotide sequence corresponding to five chemotaxis genes in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **165**:161-166.
- Müller, J. P., Z. An, T. Merod, I. C. Hancock, and C. R. Harwood.** 1997. Influence of *Bacillus subtilis* *phoR* on cell wall anionic polymers. *Microbiol.* **143**:947-956.
- Nakano, M. M., F. Yang, P. Hardin, and P. Zuber.** 1995. Nitrogen regulation of *nasA* and the *nasB* operon, which encode genes required for nitrate assimilation in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **177**:573-579.
- Niebuhr, K., T. Chakraborty, M. Rohde, T. Gazlig, B. Jansen, P. Köllner, and J. Wehland.** 1993. Localization of the ActA polypeptide of *Listeria monocytogenes* in infected tissue culture cell lines: ActA is not associated with actin "comets". *Infect. Immun.* **61**:2793-2802.
- Niebuhr, K., F. Ebel, R. Frank, M. Reinhard, E. Domann, U. D. Carl, U. Walter, F. B. Gertler, J. Wehland, and T. Chakraborty.** 1997. A novel proline-rich motif present in ActA of *Listeria monocytogenes* and cytoskeletal proteins is the ligand

fort the EVH1 domain, a protein module present in the Ena/VASP family. *EMBO J.* **16**:5433-5444.

Nyborg, J., and M. Kjeldgaard. 1996. Elongation in bacterial protein biosynthesis. *Curr. Opin. Biotechnol.* **7**:369-375.

Oelschlaeger, T. A., and D. J. Kopecko. 2000. Microtubule dependent invasion pathways of bacteria. *Subcell Biochem.* **33**:3-19.

O'Driscoll, B., C. G. Gahan, and C. Hill. 1996. Adaptive acid tolerance response in *Listeria monocytogenes*: isolation of an acid-tolerant mutant which demonstrates increased virulence. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:1693-1698.

Ogawa, K., E. Akagawa, K. Yamane, Z. W. Sun, M. LaCelle, P. Zuber, and M. M. Nakano. 1995. The *nasB* operon and *nasA* gene are required for nitrate/nitrite assimilation in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **177**:1409-1413.

O'Hara, B. P., R. A. Norman, P. T. C. Wan, S. M. Roe, T. E. Barrett, R. E. Drew, and L. H. Pearl. 1999. Crystal structure and induction mechanism of AmiC-AmiR: a ligand-regulated transcription antitermination complex. *EMBO J.* **18**:5175-5186.

Ozon, S., A. Maucuer, and A. Sobel. 1997. The stathmin family -- molecular and biological characterization of novel mammalian proteins expressed in the nervous system. *Eur. J. Biochem.* **248**:794-806.

Pamer, E. G., J. T. Harty, and M. J. Bevan. 1991. Precise prediction of a dominant class I MHC-restricted epitope of *Listeria monocytogenes*. *Nature.* **353**:852-855.

Pancholi, V., and V. A. Fischetti. 1992. A major surface protein on group A streptococci is a glyceraldehyd-3-phosphate-dehydrogenase with multiple binding activity. *J. Exp. Med.* **176**:415-426.

Pancholi, V., and V. A. Fischetti. 1993. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase on the surface of group A streptococci is also an ADP-ribosylating enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**:8154-8158.

Peel, M., W. Donachie, and A. Shaw. 1988. Physical and antigenic heterogeneity in the flagellins of *Listeria monocytogenes* and *L. ivanovii*. *J. Gen. Microbiol.* **134**:2593-2598.

Pellequer, J.-L., K. A. Wagner-Smith, S. A. Kay, and E. D. Getzoff. 1995. Photoactive yellow protein: a structural prototype for the three-dimensional fold of the PAS domain superfamily. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**:5884-5890.

Penna, T. C., A. F. Jozala, L. C. De Lencastre Novaes, A. Pessoa, and O. Cholewa. 2005. Production of nisin by *Lactococcus lactis* in media with skimmed milk. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **121**:619-637.

- Perego, M., C. Hanstein, K. M. Welsh, T. Djavakhishvili, P. Glaser, and J. A. Hoch.** 1994. Multiple protein-aspartate phosphatases provide a mechanism for the integration of diverse signals in the control of development in *B. subtilis*. *Cell* **79**:1047-1055.
- Pfeuffer, T., W. Goebel, J. Laubinger, M. Bachmann, and M. Kuhn.** 2000. LaXp180, a mammalian ActA-binding protein, identified with the yeast two-hybrid system, co-localizes with intracellular *Listeria monocytogenes*. *Cell. Microbiol.* **2**:101-114.
- Pfeuffer, T.** 2000. Interaktion des Proteins ActA von *Listeria monocytogenes* mit dem Wirtszellprotein LaXp180. Dissertation, Universität Würzburg.
- Pilgrim, S.** 2002. Entwicklung eines "DNA-Delivery" Systems auf der Basis von virulenzattenuierten Listerien. Dissertation. Universität Würzburg.
- Pilgrim, S., A. Kolb-Mäurer, I. Gentshev, W. Goebel, and M. Kuhn** 2003. Deletion of the gene encoding p60 in *Listeria monocytogenes* leads to abnormal cell division and loss of actin-based motility. *Infect. Immun.* **71**:3473–3484.
- Pistor S., T. Chakraborty, K. Niebuhr, E. Domann, and Wehland J.** 1994. The ActA protein of *Listeria monocytogenes* acts as a nucleator inducing reorganization of the actin cytoskeleton. *EMBO J.* **13**:758-763.
- Pistor, S., T. Chakraborty, U. Walter, and J. Wehland.** 1995. The bacterial actin nucleator protein ActA of *Listeria monocytogenes* contains multiple binding sites for host microfilament proteins. *Curr. Biol.* **5**:517-525.
- Pistor, S., L. Grobe, A. S. Sechi, E. Domann, B. Gerstel, L. M. Machesky, T. Chakraborty, and J. Wehland.** 2000. Mutations of arginine residues within the 146-KKRRK-150 motif of the ActA protein of *Listeria monocytogenes* abolish intracellular motility by interfering with the recruitment of the Arp2/3 complex. *J. Cell. Sci.* **113**:3277–3287.
- Polarek, J. W., G. Williams, and W. Epstein.** 1992. The products of the *kdpDE* operon are required for expression of the Kdp ATPase of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **174**:2145-2151.
- Pollard, T. D.** 1994. Structure of actin binding proteins: insights about function at atomic resolution. *Annu. Rev. Cell. Biol.* **10**:207-249.
- Portnoy, D. A., V. Auerbuch, and I. J. Glomski.** 2002. The cell biology of *Listeria monocytogenes* infection: the intersection of bacterial pathogenesis and cell-mediated immunity. *J. Cell Biol.* **158**:409-414.
- Pschyrembel.** 1994. Klinisches Wörterbuch. Walter de Gruyter, Berlin, New York, 257. Auflage.
- Racz, P., K. Tenner, and E. Mero.** 1972. Experimental *Listeria enteritis*. I. An electron microscopic study of the epithelial phase in experimental listeria infection. *Lab. Invest.* **26**:694-700.

- Raffelsbauer, D., A. Bubert, F. Engelbrecht, J. Scheinpflug, A. Simm, J. Hess, S. H. E. Kaufmann, and W. Goebel.** 1998. The gene cluster *inlC2DE* of *Listeria monocytogenes* contains additional new internalin genes and is important for virulence in mice. *Mol. Gen. Genet.* **260**:144-158.
- Raveneau, J., C. Geoffroy, J.-L. Beretti, J.-L. Gaillard, J. E. Alouf, and P. Berche.** 1992. Reduced virulence of a *Listeria monocytogenes* phospholipase-deficient mutant obtained by transposon insertion into the zinc metalloprotease gene. *Infect. Immun.* **60**:916-921.
- Reinhard, M., K. Giehl, K. Abel, C. Haffner, T. Jarchau, V. Hoppe, B. M. Jockusch, and U. Walter.** 1995. The proline-rich focal adhesion and microfilament protein VASP is a ligand for profilins. *EMBO J.* **14**:1583-1589.
- Riederer, B. M., V. Pellier, B. Antonsson, G. Di Paolo, S. A Stimpson, R. Lütjens, S. Catsicas, and G. Grenningloh.** 1997. Regulation of microtubule dynamics by the neuronal growth-associated protein SCG10. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **94**:741-745.
- Rogers, H. W., M. P. Callery, B. Deck, and E. R. Unanue.** 1996. *Listeria monocytogenes* induces apoptosis of infected hepatocytes. *J. Immunol.* **156**:679-684.
- Rohatgi, R., L. Ma, H. Miki, M. Lopez, T. Kirchhausen, T. Takenawa, and M. W. Kirschner.** 1999. The interaction between N-WASP and the Arp2/3 complex links Cdc42-dependent signals to actin assembly. *Cell* **97**:221-231.
- Ronson, C. W., B. T. Nixon, and F. M. Ausubel.** 1997. Conserved domains in bacterial regulatory proteins that respond to environmental stimuli. *Cell* **49**:579-581.
- Rubin, C. I., and G. F. Atweh.** 2004. The role of stathmin in the regulation of the cell cycle. *J. Cell. Biochem.* **93**:242-250.
- Sanderson, S., D. J. Campbell, and N. Shastri.** 1995. Identification of a CD4+ T cell-stimulating antigen of pathogenic bacteria by expression cloning. *J. Exp. Med.* **182**:1751-1757.
- Sanger, J. M., J. W. Sanger, and F. S. Southwick.** 1992. Host cell actin assembly is necessary and likely to provide the propulsive force for intracellular movement of *Listeria monocytogenes*. *Infect. Immun.* **60**:3609-3619.
- Schaumburg J., O. Diekmann, P. Hagendorff, S. Bergmann, M. Rohde, S. Hammerschmidt, L. Jansch, J. Wehland, and U. Karst.** 2004. The cell wall subproteome of *Listeria monocytogenes*. *Proteomics.* **4**:2991-3006.
- Schirm, M., M. Kalmokoff, A. Aubry, P. Thibault, M. Sandoz, and S. M. Logan.** 2004. Flagellin of *Listeria monocytogenes* is glycosylated with β -O-linked N-Acetyl-glucosamine. *J. Bacteriol.* **186**:6721-6727.

- Schmid, M. W., E. Y. W. Ng, R. Lampidis, M. Emmerth, M. Walcher, J. Kreft, W. Goebel, M. Wagner, and K.-H. Schleifer.** 2005. Evolutionary history of the genus *Listeria* and its virulence genes. *Syst. Appl. Microbiol.* **28**:1-18.
- Schubart, U. K., W. Alago Jr., and A. Danoff.** 1987. Properties of p19, a novel cAMP-dependent protein kinase substrate protein purified from bovine brain. *Biol. Chem.* **262**:11871-11877.
- Schubart, U. K., J. Yu, J. A. Amat, Z. Wang, M. K. Hoffmann, and W. Edelmann.** 1996. Normal development of mice lacking metablastin (p19), a phosphoprotein implicated in cell cycle regulation. *J. Biol. Chem.* **271**:14062-14066
- Schubert, W.-D., G. Göbel, M. Diepholz, A. Darji, D. Kloer, T. Hain, T. Chakraborty, J. Wehland, E. Domann, and D. W. Heinz.** 2001. Internalins from the human pathogen *Listeria monocytogenes* combine three distinct folds into a contiguous internalin domain. *J. Mol. Biol.* **312**:783-794.
- Schuchat, A., B. Swaminathan, and C. V. Broome.** 1991. Epidemiology of human listeriosis. *Clin. Microbiol Rev.* **4**:169-183.
- Sheehan, B., C. Kocks, S. Dramsi, E. Guin, A. D. Klarsfeld, J. Mengaud, and P. Cossart.** 1994. Molecular and genetic determinants of the *Listeria monocytogenes* infectious process. *Curr. Top Microbiol. Immunol.* **192**:187-216.
- Sheehan, B., A. Klarsfeld, R. Ebright, and P. Cossart.** 1996. A single substitution in the putative helix-turn-helix motif of the pleiotropic activator PrfA attenuates *Listeria monocytogenes* virulence. *Mol. Microbiol.* **20**:785-797.
- Shen, Y., M. Naujokas, M. Park, and K. Ireton.** 2002. InIB-dependent internalization of *Listeria* is mediated by the MET receptor tyrosine kinase. *Cell* **103**: 501-510.
- Shu, C. J., and I. B. Zhulin.** 2002. ANтар: an RNA-binding domain in transcription antitermination regulatory proteins. *Trends Biochem. Sci.* **27**:3-5.
- Skoble, J., D. A. Portnoy, and M. D. Welch.** 2000. Three regions within ActA promote Arp2/3 complex-mediated actin nucleation and *Listeria monocytogenes* motility. *J. Cell Biol.* **150**:527-538
- Smith, G. A., J. A. Theriot, and D. A. Portnoy.** 1996. The tandem repeat domain in the *Listeria monocytogenes* ActA protein controls the rate of actin-based motility, the percentage of moving bacteria, and the localization of vasidolator-stimulated phosphoprotein and profilin. *J. Cell Biol.* **3**:647-660.
- Smith, G. A., and D. A. Portnoy.** 1997. How the *Listeria monocytogenes* ActA protein converts actin polymerization into a motile force. *Trends Microbiol.* **5**:272-276.
- Stamm, L. M., J. H. Morisaki, L.-Y. Gao, R. L. Jeng, K. L. McDonald, R. Roth, S. Takeshita, J. Heuser, M. D. Welch, and E. J. Brown.** 2003. *Mycobacterium*

marinum escapes from phagosomes and is propelled by actin-based motility. J. Exp. Med. **198**:1361-1368.

Stewart, V., and R. S. Rabin. 1995. Dual sensors and dual response regulators interact to control nitrate- and nitrite responsive gene expression in *Escherichia coli*. p. 233-252. In J. A. Hoch and T. J. Silhavy (ed.), Two-component signal transduction. ASM Press, Washington, D. C.

Stephenson, K., and J. A. Hoch. 2001. PAS-A domain of phosphorelay sensor kinase A: a catalytic ATP-binding domain involved in the initiation of development in *Bacillus subtilis*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **98**:15251-15256.

Stover, C. K., X. Q. Pham, A. L. Erwin, S. D. Mizoguchi, P. Warrenner, M. J. Hickey, F. S. Brinkman, W. O. Hufnagle, D. J. Kowalik, M. Lagrou, R. L. Garber, L. Goltry, E. Tolentino, S. Westbrook-Wadman, Y. Yuan, L. L. Brody, S. N. Coulter, K. R. Folger, A. Kas, K. Larbig, R. Lim, K. Smith, D. Spencer, G. K. Wong, Z. Wu, I. T. Paulsen, J. Reizer, M. H. Saier, R. E. Hancock, S. Lory, and M. V. Olson. 2000. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PA01, an opportunistic pathogen. Nature **406**:959-964.

Suárez, M., B. Gonzalez-Zorn, Y. Vega, I. Chico-Calero, and J. A. Vázquez-Boland. 2001. A role for ActA in epithelial cell invasion by *Listeria monocytogenes*. Cell. Microbiol. **3**:853-864.

Sue, D., K. J. Boor, and M. Wiedmann. 2003. Sigma(B)-dependent expression patterns of compatible solute transporter genes *opuCA* and *Imo1421* and the conjugated bile salt hydrolase gene *bsh* in *Listeria monocytogenes*. Microbiol. **149**:3247-3256.

Sun, G., E. Sharkova, R. Chesnut, S. Birkey, M. F. Duggan, A. Sorokin, P. Pujic, S. D. Ehrlich, and F. M. Hulett. 1996. Regulators of aerobic and anaerobic respiration in *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. **178**:1374-1385.

Tanaka, T. S., K. Saha, C. Tomomori, R. Ishima, D. Liu, K. I. Tong, H. Park, R. Dutta, L. Qin, M. B. Swindells, T. Yamazaki, A. M. Ono, M. Kainosho, M. Inouye, and M. Ikura. 1998. NMR structure of the histidine kinase domain of the *E. coli* osmosensor EnvZ. Nature **396**:88-92.

Taylor, B. L., and I. B. Zhulin. 1999. PAS domains: internal sensors of oxygen, redox potential, and light. Microbiol. Mol. Biol. Rev. **63**:479-506.

Tettelin, H., N. J. Saunders, J. Heidelberg, A. C. Jeffries, K. E. Nelson, J. A. Eisen, K. A. Ketchum, D. W. Hood, J. F. Peden, R. J. Dodson, W. C. Nelson, M. L. Gwinn, R. DeBoy, J. D. Peterson, E. K. Hickey, D. H. Haft, S. L. Salzberg, O. White, R. D. Fleischmann, B. A. Dougherty, T. Mason, A. Ciecko, D. S. Parksey, E. Blair, H. Cittone, E. B. Clark, M. D. Cotton, T. R. Utterback, H. Khouri, H. Qin, J. Vamathevan, J. Gill, V. Scarlato, V. Maignani, M. Pizza, G. Grandi, L. Sun, H. O. Smith, C. M. Fraser, E. R. Moxon, R. Rappuoli, and J. C. Venter. 2000. Complete genome sequence of *Neisseria meningitidis* serogroup B strain MC58. Science **287**:1809-1815.

- Teyssere, N., C. Chiche-Portiche, and D. Raoult.** 1992. Intracellular movements of *Rickettsia conorii* and *R. typhi* based on actin polymerization. *Res. Microbiol.* **143**:821-829.
- Theriot, J. A., T. J. Mitchison, L. G. Tilney, and D. A. Portnoy.** 1992. The rate of actin-based motility of intracellular *Listeria monocytogenes* equals the rate of actin polymerization. *Nature* **357**:257-260.
- Throup, J. P., K. K. Koretke, A. P. Bryant, K. A. Ingraham, A. F. Chalker, Y. Ge, A. Marra, N. G. Wallis, J. R. Brown, D. J. Holmes, M. Rosenberg, and M. K. R. Burnham.** 2000. A genomic analysis of two-component signal transduction in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Microbiol.* **35**:566-576.
- Tilney, L. G., and D. A. Portnoy.** 1989. Actin filaments and the growth, movement, and spread of the intracellular bacterial parasite, *Listeria monocytogenes*. *J. Cell. Biol.* **109**:1597-1608.
- Tilney, L. G., P. S. Connelly, and D. A. Portnoy.** 1990. Actin filament nucleation by the bacterial pathogen, *Listeria monocytogenes*. *J. Cell Biol.* **111**:2979-2988.
- Titball, R. W.** 1993. Bacterial phospholipases C. *Microbiol. Rev.* **57**:347-366.
- Tomson F.L., V. K. Viswanathan, K. J. Kanack, R. P. Kanteti, K. V. Straub, M. Menet, J. B. Kaper, and G. Hecht.** 2005. Enteropathogenic *Escherichia coli* EspG disrupts microtubules and in conjunction with Orf3 enhances perturbation of the tight junction barrier. *Mol. Microbiol.* **56**:447-464.
- Torres, C. R., and G. W. Hart.** 1984. Topography and polypeptide distribution of terminal N-acetylglucosamine residues on the surfaces of intact lymphocytes. Evidence for O-linked GlcNAc. *J. Biol. Chem.* **259**:3308-3317.
- Vázquez-Boland, J.-A., C. Kocks, S. Dramsi, H. Ohayon, C. Geoffroy, J. Mengaud, and P. Cossart.** 1992. Nucleotide sequence of the lecithinase operon of *Listeria monocytogenes* and possible role of the lecithinase cell-to-cell spread. *Infect. Immun.* **60**:219-2230.
- Vázquez-Boland, J.-A., M. Kuhn, P. Berche, T. Chakraborty, G. Domínguez-Bernal, W. Goebel, B. González-Zorn, J. Wehland, and J. Kreft.** 2001. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clin. Microbiol. Rev.* **14**:584-640.
- Walker, S. J., P. Archer, and J. G. Banks.** 1990. Growth of *Listeria monocytogenes* at refrigeration temperatures. *J. Appl. Bacteriol.* **68**:157-162.
- Way, S. S., L. J. Thompson, J. E. Lopes, A. M. Hajjar, T. R. Kollmann, N. E. Freitag, and C. B. Wilson.** 2004. Characterization of flagellin expression and its role in *Listeria monocytogenes* infection and immunity. *Cell. Microbiol.* **6**:235-242.
- Weis, J., and H. P. Seeliger.** 1975. Incidence of *Listeria monocytogenes* in nature. *Appl. Microbiol.* **30**:29-32.

Welch, M. D., A. Iwamatsu, and T. J. Mitchison. 1997. Actin polymerization is induced by Arp2/3 protein complex at the surface of *Listeria monocytogenes*. *Nature* **385**:265-269.

Welch, M. D., A. H. DePace, S. Verma, A. Iwamatsu, and T. J. Mitchison. 1997. The human Arp2/3 complex is composed of evolutionary conserved subunits and is localized to cellular regions of dynamic actin filament assembly. *J. Cell. Biol.* **138**:375-384.

Welch, M. D., J. Rosenblatt, J. Skoble, D. A. Portnoy, and T. J. Mitchison. 1998. Interaction of the human Arp2/3 complex and the *Listeria monocytogenes* ActA protein in actin filament nucleation. *Science*. **281**:105-108.

Wells, L., and G. W. Hart. 2003. O-GlcNAc turns twenty: functional implications for post-translational modification of nuclear and cytosolic proteins with a sugar. *FEBS Lett.* **546**:154-158.

Williams, T. 2001. Untersuchungen zur Rolle von ActA-bindenden Proteinen bei einer Infektion mit *Listeria monocytogenes*. Diplomarbeit, Universität Würzburg.

Williams, T., S. Bauer, D. Beier, and M. Kuhn. 2005. Construction and characterization of *Listeria monocytogenes* mutants with in-frame deletions in the response regulator genes identified in the genome sequence. *Infect. Immun.* **73**:3152-3159.

Wood, S., N. Maroushek, and C. J. Czuprinski. 1993. Multiplication of *Listeria monocytogenes* in a murine hepatocyte cell line. *Infect. Immun.* **61**:3068-3072.

Yoshida, S., E. Katayama, A. Kuwae, H. Mimuro, T. Suzuki, and C. Sasakawa. 2002. *Shigella* deliver an effector protein to trigger host microtubuli destabilization, which promotes Rac1 activity and efficient bacterial internalization. *EMBO J.* **12**:2923-2935.

Yoshida, S., and C. Sasakawa. 2003. Exploiting host microtubule dynamics: a new aspect of bacterial invasion. *Trends Microbiol.* **11**:139-143.

Zahrt, T. C., and V. Deretic. 2000. An essential two-component signal transduction system in *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Bacteriol.* **182**:3832-3838.

Zalevsky, J., I. Grigorova, and R. D. Mullins. 2001. Activation of the Arp2/3 complex by the *Listeria* ActA protein. ActA binds two actin monomers and three subunits of the Arp2/3 complex. *J. Biol. Chem.* **276**:3468-3475.

8 Anhang

8.1 Nukleotidsequenzen der Response Regulatorgene von *L. monocytogenes* EGD-e

Im Folgenden sind die vollständigen Nukleotidsequenzen der individuellen Response Regulatorgene sowie jeweils 400 bp “upstream“ und “downstream“ liegende Bereiche von *L. monocytogenes* EGD-e dargestellt. Die Bindungsbereiche der Oligonukleotide, die zur Konstruktion der in frame Deletionsmutanten verwendet wurden, sind blau dargestellt. Der ORF der RR-Gene ist fett gedruckt. Die eingeführten Restriktionsschnittstellen der verwendeten Primer (blaue Pfeile; die Pfeilrichtung gibt die Orientierung der Primer an) sind jeweils hinter der Oligonukleotidbezeichnung angegeben.

Imo0051

51N3 (*Bam*HI) 

ACGAGCTCAAGAGTTGAAAATTGATGCAATTTTGGAAAGTA
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+
 TGCTCGAGTTCTCAACTTTTAACTACGTTAAAACCTTCAT

GTTGAACCGATTGACAAGATTTTCGATGGATAGTATAGATTTATGCAAAGTTGTCGGTATT
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+
 CAACTTGGCTAACTGTTCTAAAGCTACCTATCATATCTAAATACGTTTCAACAGCCATAA

TTGCTAGATAATGCGGTTGAAGCGGCGTTAACTTGTGAAAATCCAGTTATTCGAATCGCG
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+
 AACGATCTATTACGCCAACTTCGCCGCAATTGAACACTTTTAGGTCAATAAGCTTAGCGC

TTTGTGAAAAAAGGTGATAGCATAATTATTGTATTTGCGAATAGTTTACCAGTAAATATG
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+
 AACACTTTTTTCCACTATCGTATTAATAACATAAACGCTTATCAAATGGTCATTTATAC

CCACCGATTTATAAGATATTTGAAGAAGTTTCTCTACAAAAGGAGAAGGTCGTGGATTA
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+
 GGTGGCTAAATATTTCTATAAACTTCTTCCAAAGAGATGTTTTCTCTTCCAGCACCTAAT

GGCCTTGCTAGTTTGC GG GAAATTATGAAGAAATATTCGCACGTTGCCTTAGATACGAAA
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+
 CCGGAACGATCAAACGCCCTTTAATACTTCTTTATAAGCGTGCAACGGAATCTATGCTTT

GTGACCGATAGAGAAGTTATTCAAGAATTAGAAATTATGTAGAAGAATGGGGATGAATTT
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+
 CACTGGCTATCTCTTCAATAAGTTCTTAATCTTTAATACATCTTCTTACCCTACTTAAA

 51N4 (*Kpn*I)

ATGCTACCGGTTTTTTATTTGTGAAGATAACAGAATGCAGCGAGAAAGGTTAACGAAATAT 60
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+
TACGATGGCCAAAAATAAACACTTCTATTGTCTTACGTCGCTCTTTCCAATTGCTTTATA

ATTGAAGACTATATTATGGTTGAACATTTTGATATGAAGTTAGAACTTTCAACAGGAGAT 120
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+
TAACTTCTGATATAATACCAACTTGTAACATACTTCAATCTTGAAAGTTGTCCTCTA

1
61

```

121 CCGTTTGGAGTTAGTATCACGAATGCCTACACATCAAGGTATGGGGCTTTATTTTTTAGAC 180
-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GGCAAACCTCAATCATAGTGCTTACGGATGTGTAGTTCCATACCCCGAAATAAAAAATCTG

181 ATTGATTTGGGGCAGCCGGACATGAATGGTTTTGAATTAGCTCAGGAAATTCGGAAGTTT 240
-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TAACTAAACCCCGTCGGCCTGTACTTACCAAACCTTAATCGAGTCCTTTAAGCCTTCAA

241 GATCCGCGTGGTTTTATTATTTTTATTACAACACATGCGGAGTTAAGTTATATGACTTTC 300
-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CTAGGCGCACCAAAGTAATAAAAAATAATGTTGTGTACGCTCAATTCAATATACTGAAAG

301 ACGTATAAGGTGGAAGCGCTTGATTACATTATTAAGACGATATTGATTTGCTGCATGAC 360
-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TGCATATTCCACCTTCGCGAACTAATGTAATAATTTCTGCTATAACTAAACGACGTACTG

361 CGGGTACTTGCCTGTATGAAGCAAGCAGAAGAACGGATTTCCAATGATCAAGATATGCAG 420
-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GCCCATGAACGGACATACTTCGTTTCGTCTTCTTGCCTAAAGGTTACTAGTTCTATACGTC

421 AAGTATTTTACGTTTAAAGTGTTCGGATAAGAAGATTATTCATGAACTGTTAGACGATATC 480
-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TTCATAAAATGCAAATTTACAGCCTATTCTTCTAATAAGTACTTGACAATCTGCTATAG

481 TTGTTTTTTGAGACAGCGCCAACTATTCATAAAGTAATTTTACATGGCAAAAATCGCCAA 520
-----+-----+-----+-----+-----+-----+
AACAAAAAATCTGTTCGGGTTGATAAGTATTTTATTAAATGTACCGTTTTTAGCGGTT

521 GTGGAATTTTATGGTAAGTTGAAGAATATCGAGAAAATGTTGGACGAATCATTTTTATCGG 580
-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CACCTTAAATACCATTCAACTTCTTATAGCTCTTTTACAACCTGCTTAGTAAAATAGCC

581 TGCCACAGGTCGTATATTGTGAATAAGAAAAATATTCATGAGCTAGATACGACAAAAGGT 640
-----+-----+-----+-----+-----+-----+
ACGGTGTCCAGCATATAACACTTATTCTTTTTATAAGTACTCGATCTATGCTGTTTTCCA

641 GTGGTGAAGATGTCTAACGGTGAAAATTGTTATGCATCATCGAAATTAATTAAGCTTG 1000
-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CACCATTCTACAGATTGCCACTTTTAAACAATACGTAGTAGCTTTAATTAATTTTCGAA
    51C1 (KpnI)
    ────────────────────────────────────────────────────────────────────────────────────▶
1001 AGTTTATAAAGTGGCCTTAAAGGTCGCTTTTTTTGTACAATGGCAAGTTTGGATTTGAT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TCAAATATTTTACCAGGAATTTCCAGCGAAAAAACATGTTACCGTTCAAACCTAAACTA

GAAATGGGTAAATATAGGTAAAATAATAGTGATGAATTGTTAGTTAAGTTTATGTTATGA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CTTTACCCATTTATATCCATTTTATTATCACTACTTAACAATCAATTCAAATACAATACT

TATAGATACTCAAATTCAGGCAAAAGGTATGTAATAAATGGGGAGCTGGATGAAATGTC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+
ATATCTATGAGTTTAAAGTCCGTTTTCCATACATTTTTTTTACCCCTCGACCTACTTTACAG

AGGCTATTTTCAAAAACGAATGCTTAAATATCCATTATACGGTCTGATTGCAGCGACAAT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TCCGATAAAAGTTTTTGTCTACGAATTTATAGGTAATATGCCAGACTAACGTCGCTGTTA

TATTTTGAGCGTAATCACGTTCTTTTTTTTCGTGGTGGTTATCGGCGTTAGTTGTTGTTGG
-----+-----+-----+-----+-----+-----+
ATAAACTCGCATTAGTGCAAGAAAAAAGCACCACCAATAGCCGCAATCAACAACAACC

```

CGGAATTATTCTTACGGTTGCGATGTTTTATTTTGAATATCGCTTGAATGAAGATGTGCA
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 GCCTTAATAAGAATGCCAACGCTACAAAATAAACTTATAGCGAACTTACTTCTACACGT

ACTATATGTTTCTAATTTAA CGTATCGGATTAAGCGTAGTGAAGAAGAA
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+
 TGATATACAAAGATTAAATT GCATAGCCTAATTCGCATCACTTCTTCTT

←
 51C2 (*EcoRI*)

Imo0287

0287N1 (*BamHI*)

TTACAAGTAGCGAATTTGCTGATTAATCTGCTAGAAGAGGT
 -----+-----+-----+-----+-----+
 ATGTTTCATCGCTTAAACGACTAATAGACGATCTTCTCCAC

GAGTGTGCCGTTGCGGATGGTAGTGGTTTTGGGGAGTTTGGTGAAGGTTACGTCCGCGT
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+
 TCACAACGGCAACGCCCTACCATCACAAAACCCCTCAAACCACTTCCAATGCAGGCGCA

AGGTCTTTTAATGGATGAAGAGCGCTTGAAGAAGCAGTAACGCGAGTTTCCAAATTGCA
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+
 TCCAGAAAATTACCTACTTCTCGCGAACCTTCTTCGTCATTGCGCTCAAAGGTTTAAACGT

TTTGTTCGATAAAGTTACACAGCAGTAGCCAATTTATCCAATTTTAAAGAGAAAATCGCTT
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+
 AAACAAGCTATTTCAATGTGTCGTCATCGGTTAAATAGGTTAAAATTCTCTTTTAGCGAA

GTAATAATTCAGATAATTAATGGGATGTGTTATAATTGGTTAGTAAGTCTATTCTTAGCA
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+
 CATTATTAAGTCTATTAATTACCCACACAATATTAACCAATCATTTCAGATAAGAATCGT

TGTTGTTTTATGAAGGCAGGCCAGAATTTAAAGTATTTAGTGAGATTTTACGCATTAAA
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+
 ACAACAAAATACTTCCGTCCGGTCTTAAATTTATAAATCACTCTAAAAATGCGTAATTT

TAAAAAGTATCTGTCCCGTTAAAGCCGGCGAAATCCAGGAATGAGAGGACTGTAAAAAA
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+
 ATTTTTTCATAGACAGGGCCAATTTTCGGCCGCTTTAGGTCTTACTCTCCTGACATTTTTT

←
 0287 (*KpnI*)

1 ATGGCAGAAAAGAAAATCTTTGTAGTAGATGACGAAAACCGATTGCGGATATAGTTAAG 60
 -----+-----+-----+-----+-----+
 TACCGTCTTTTCTTTTAAGAACATCATCTACTGCTTTTTGGCTAACGCCTATATCAATTC

61 TTTAATCTAAATAAAGAAGGCTTTGATGTATATTGCGCCTATGATGGCGATGAAGCGTTA 120
 -----+-----+-----+-----+-----+
 AAATTAGATTTATTTCTTCCGAACTACATATAACGCGGATACTACCGCTACTTCGCAAT

121 GAACTTGTAGAAGAAGTTCAGCCAGATTTGATTTTACTGGATATTATGCTTCCAGGTCGT 180
 -----+-----+-----+-----+-----+
 CTTGAACATCTTCTTCAAGTCGGTCTAAACTAAAATGACCTATAATACGAAGGTCCAGCA

181 GATGGTATTGAGGTATGTCGTGAAGTTCGTAAAAAATATGATATGCCAATAATTATGGTA 240
 -----+-----+-----+-----+-----+
 CTACCATAACTCCATACAGCACTTCAAGCATTTTTTATACTATACGGTTATTAATACCAT

241 ACAGCGAAAGACTCCGAAATTGATAAAGTTATCGGACTGGAAC TTGGTGC GGATGACTAT 300
 -----+-----+-----+-----+-----+
 TGTCGCTTTCTGAGGCTTTAACTATTTCAATAGCCTGACCTTGAACCACGCCTACTGATA

```

GTAACGAAGCCATTTCAGTAACCGTGAATTAATCGCTCGTGTGAAAGCCAACCTTGCGCCGT
301 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 360
CATTGCTTCGGTAAGTCATTGGCACTTAATTAGCGAGCACACTTTTCGGTTGAACCGCGCA

CACAGCCAAGTAAGCTCAAGCACAGCCGAGGAAGAAGAAAAACAGCGAACTAGAAAATCGGT
361 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 420
GTGTCGGTTCATTTCGAGTTCGTGTCGGCTCCTTCTTCTTTTGTGCTTGATCTTTAGCCA

TCTCTTATTATTTCATCCAGACGCATATGTGGCCTCTAAACGTGGAGAAACAATCGAACTT
421 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 480
AGAGAATAATAAGTAGGTCTGCGTATACACCGGAGATTTGCACCTCTTTGTTAGCTTGAA

ACGCATCGTGAATTCGAATTACTACACTATTTAGCAAAACATATGGGACAAGTTATGACA
481 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 520
TGCGTAGCACTTAAGCTTAATGATGTGATAAATCGTTTTTGTATACCCTGTTCAATACTGT

CGGGAACATTTACTCCAAACTGTTTGGGGCTACGACTACTTCGGCGATGTTTCGTACGGTG
521 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 580
GCCCTTGTAATGAGGTTTGACAAACCCCGATGCTGATGAAGCCGCTACAAGCATGCCAC

GATGTTACCGTTCGTGCTTTACGTGAAAAAATTGAAGATAATCCAAGTCACCCAGCATGG
581 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 640
CTACAATGGCAAGCAGCAAATGCACTTTTTTAACTTCTATTAGGTTCAGTGGGTCGTACC

TTAGTAACTAGACGCGGAGTTGGTTATTATTTACGCAATCCTGAACAAGAATAAATAACA
641 -----+-----+-----+-----+-----+-----+
AATCAATGATCTGCGCCTCAACCAATAATAAATGCGTTAGGACTTGTCTTATTATTATGTT
0287 (KpnI)
AGAAGTGGTTTCCGAAGTGAAAAAAATTTCGGTGACCACTTTTTTTGGGTATTTTCGCTTA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TCTTCACCAAAGGCTTCACTTTTTTTAAAGCCACTGGTGAAAAAAACCCATAAAAGCGAAT

CTTAGTTACTATTTTTATAAATAAATCGACCCAATTAACAGGGAAAAACAATACGTCTACC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GAATCAATGATAAAAATATTTATTTAGCTGGGTTAATTGTCCCTTTTGTATGCAGATGG

CCATAACATATGGTATACTAATTTAAATATATTACCCCGAATAGGAGTAGAACGACTTAT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GGTATTGTATAACCATATGATTAAATTTATATAATGGGGCTTATCCTCATCTTGCTGAATA

GCATAAAATGAGATTTTTTTCAGTCCGTACAATTTAAGTTAGTTATTATGTATTTGCTACT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CGTATTTTACTCTAAAAAAGTCAGGCATGTTAAATTCAATCAATAATACATAAACGATGA

AATTATCGTTGCAATGCAAGTAATCGGCGCGTATTTTGTACGTGAACTGGGAAGGACAACT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TTAATAGCAACGTTACGTTTCATTAGCCGCGCATAAAAACATGCACTTGACCTTCCTGTTGA

GGAGAAAAATTTTCAAGATTCTATTACAAATAGTATTACCTTGCTGGATTATAATGCTAG
-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CCTCTTTTTTAAAAGTTCTAAGATAATGTTTATCATAATGGAACGACCTAATATTACGATC
AGAGAAATTATTAATAATA GCGATAACTCAGTG
-----+-----+-----+-----+-----+
TCTTCTTTAATAATTTTTTAT CGCTATTGAGTCAC
0287 (EcoRI)

```



```

TCAGTTAGTAAGTGAAATTTTCCGTTTCAGCACATACGTTTAAAGGGATGTCCGCAACGAT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
AGTCAATCATTCACTTTAAAAGGCAAGTCGTGTATGCAAATTTCCCTACAGGCGTTGCTA

GGGCTTCCAGCAGGTGGCTGATTTAACGCATGCAATGGAAAATGTA TAGATGAGGTACG
-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CCCGAAGGTCGTCCACCGACTAAATTGCGTACGTTACCTTTTACATGATCTACTCCATGC

CAATAATCGATTGGCTGTAACAGAACATTTGGTAGACATTATTTTACATGTACATCTCA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GTTATTAGCTAACCGACATTGTCTTGTAAACCATCTGTAATAAAAAATGTACATGTAGAGT

TTTAGAAACAATGGTTTCCGATATCCAGCACGGCGGACAAGGCGGGCGGACATTTCGAA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+
AAATCTTTGTTACCAAAGCCTATAGGTGCGTCCGCGCTGTTCCGCGCGCTGTAAAGCTT

AACCGTAGCTGACTTAGAAGCACTTTTACACCCAGAGCAA
-----+-----+-----+-----+-----+
TTGGCATCGACTGAATCTTCGTGAAAATGTGGGTCTCGTT

```

← cheYC2 (*EcoRI*)

Imo1022

```

AATCATTAAAACTGGTATTGAGCAATTATTTAAAAGAAT
-----+-----+-----+-----+-----+
TTAGTAATTTTTGACCATAACTCGTTAATAATTTTCTTA

TAACAACCAAATTGCCAATCGAAGTAGAATGGCAAATCGAGGATATTAGTTTGCAAAAAG
-----+-----+-----+-----+-----+-----+
ATTGTTGGTTTAAACGGTTAGCTTTCATCTTACCCTTTAGCTCCTATAATCAAACGTTTTC

GCATTGAGGATCATTGTTCCGTATTGTTCAAGAATTACTTTCCAATACATTACGACATT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CGTAACTCCTAGTAAACAAGGCATAACAAGTTCTTAATGAAAGGTTATGTAATGCTGTAA

CTAAAGCTAAATTATTAGAAGTACGCTTAGTCACGATGGATAATTTAGCGGTGATGAAAG
-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GATTTGATTTAATAATCTTCATGCGAATCAGTGCTACCTATTAAATCGCCACTACTTTC

TAGTAGATGACGGCGTTGGGTTTGATATGGATAATGTTTCGACAAGGCTCTTATGGATTAC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+
ATCATCTACTGCCGCAACCCAACTATACTATTACAAGCTGTTCCGAGAATACCTAATG

```

1022N1 (*BamHI*)

```

AAAATATGCGAGAACGAGTTGCCGAATTCGGCGGCACCATCAAATAATTAGTTTCCCAG
-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TTTTATACGCTCTTGCTCAACGGCTTAAGCCCGCGTGGTAGTTTTATTAATCAAAGGGTC

```

→ GAAGAGGA

```

ACTAGTGTAGAAATAAAAAATCCCACTTGTTGCGAAAAAGGACGTGGAAAGCG
-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CTTCTCCTTGATCACATCTTTATTTTTAGGGTGAACAACGCTTTTTTCTGCACCTTTCGC

ATGATAAAAGTATTACTTGTAGATGATCATGAAATGGTACGTATAGGTGTCTCAGCTTAT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TACTATTTTTCATAATGAACATCTACTAGTACTTTACCATGCATATCCACAGAGTCGAATA

CTTTCTGTGCAAGATGACATGGAAGTAGTTGGCGAGGCAGAGAACGGTCGTGAAGGGGCT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GCATATCCCGTTCTACTGTACCTTCATCAACCGCTCCGCTCTCTTGCCAGCACTTCCCCGA

```

← 1022N2 (*KpnI*)

1

60

61

120

GATATGGCTCTAGAACTACGCCCGGATATCATCTTAATGGATTTAGTTATGGATGAAATG
 121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 180
 CTATACCGAGATCTTGATGCGGGCCTATAGTAGAATTACCTAAATCAATACCTACTTTAC

 GACGGCATCGAAGCCACAAAAGAAATTATGCAAACTGGAAAGAAGCAAAAATCATTATC
 181 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 240
 CTGCCGTAGCTTCGGTGTTCCTTTAATACGTTTTGACCTTCTTCGTTTTTAGTAATAG

 GTTACAAGTTTTATTGATGATGAAAAAGTATACCCGGCACCTGAAGCTGGAGCGAGCAGT
 241 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 300
 CAATGTTCAAAATAACTACTACTTTTTTCATATGGGCCGTGAACCTCGACCTCGCTCGTCA

 ACTTGAAGCTGGAGCGAGCAGTTATATGCTTAAAACCTCGACAGCGAGCGAAATTGCAGA
 301 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 360
 TGAACCTCGACCTCGCTCGTCAATATACGAATTTTGAAGCTGTGCTCGCTTTAACGTCT

 TGGGATTCGAGCTACATACGGCGGAGACTCTGTCTTGAACCAGAAGTAACTGGCAAAAT
 361 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 420
 ACGCTAAGCTCGATGTATGCCGCCCTCTGAGACAGGAACCTGGTCTTCATTGACCGTTTTA

 GATGCAACGGCTAACCGCTAAACCAGAAAAAACCTTACATGATGATTTAACGAATCGTGA
 421 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 480
 CTACGTTGCCGATTGGCGATTTGGTCTTTTTTTGAATGTACTACTAAATTGCTTAGCACT

 AAATGAAATCTTACTTTTAATCGCAGAAGGTAAATCTAATCAAGAAATTGCGGATGAACT
 481 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 540
 TTTACTTTAGAATGAAAATTAGCGTCTTCCATTTAGATTAGTTCTTTAACGCCTACTTGA

 TTTTATCACTTTTAAAAACGGTGAAGACGCATGTAAGTAACATTTTATCGAAATTAGACGT
 541 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 600
 AAAATAGTGAAATTTTTGCCACTTCTGCGTACATTCATTGTAATAAGCTTTAATCTGCA

 GCAAGATCGTACGCAAGCAGCAATCTATGCATTTAAGTAGCAAGGAGGTAACGTACACAT
 601 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 660
 CGTCTAGCATGCGTTCGTGCTTAGATACGTAAATTCATCGTTCCTCCATTGCATGTGTA

 GAAAGAAGGATTTGCAGTCATCGGTCTTGGGCGATTTGGTGGGAGTATTTGTCGTTTAC
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 CTTTCTTCCTAAACGTGAGTAGCCAGAACCCGCTAAACCACCCTCATAAACAGCAAGTG

 TTGTTGAGCAAGGAATGGAAGTACTTGGCATTTGATTCGGATGAAGAGCGCGTCAATGAAT
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 AACAACTCGTTCCTTACCTTCATGAACGCTAACTAAGCCTACTTCTCGCGCAGTTACTTA

 ATATGTCCATTGCGACCCATGCAGTTATCGCTAATTCAACGGATGAAAATGCGCTACGCC
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 TATACAGGTAACGCTGGGTACGTCAATAGCGATTAAGTTGCCTACTTTTACGCGATGCGG

 AACTAGGTATTCGTAACCTTTGAGCATGTTATCGTTGCGATAGGTGAAGATATACAGTCA
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 TTGATCCATAAGCATGAAACTCGTACAATAGCAACGCTATCCACTTCTATATGTCAGCT

 GTATCTTAACAACACTTATTTTAAAAGAAATGGGCGTGAAATACGTTACCGCAAAAGCGA
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 CATAGAATTGTTGTGAATAAAATTTTCTTTACCCGCACCTTTATGCAATGGCGTTTTCGCT

 CAAATGATAAGCATGCCAAATTGCTTGATAAAATCGGAGCAGACCGTGTGTCCACCCTG
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 GTTTACTATTCGTACGGTTTAAACGAATTTTTAGCCTCGTCTGGCACAACAGGTGGGAC

1022C1 (*KpnI*)

AGCGAGACATGGGACGACGTA
-----+-----+
TCGCTCTGTACCCTGCTGCAT
← 1022C2 (BamHI)

Imo1061

1060N1 (BamHI)
ACGTGAAACAATCAACAAGATTTATAGCAAGCAAGACGA
-----+-----+
TGCACTTTGTAGTTGTTCTAAATATCGTTCGTTCCTGCT

GTGGGGTAGCCTTTCACTTGATGAAGTAGCTACTTATATGGAATCTGAATTAGGCCCTAAC
-----+-----+
CACCCCATCGGAAAGTGAAGTACTTTCATCGATGAATATACCTTAGACTTAAATCCGGATTG

AGAGCAAGACAATAAAGCTGCATCAGAAAAAATTGTTCGAGAAGCAAATGCAGCAAATGT
-----+-----+
TCTCGTTCTGTTATTTTCGACGTAGTCTTTTTTAACAGCGTCTTCGTTTACGTCGTTTACA

TGTTTTTGTACCGACTGTTATTGTGGGTGAACATATTTTTTGATGAGCATATTAGCCCTGA
-----+-----+
ACAAAAACATGGCTGACAATAACACCCACTTGTATAAAAACTACTCGTATAATCGGGACT

AGAGTTACGTTTCGCTACTTGATGATGAATTAGCTAAATAATTAATAGAAAGGAATCCAGT
-----+-----+
TCTCAATGCAAGCGATGAAGTACTACTTAAATCGATTTATTAATTTATCTTCCTTAGGTCA

TGATAGAAGCAAATGTCACAATTTGCGCTATCATCTGGATTCTTTTTTTGTGAGAAATTG
-----+-----+
ACTATCTTCGTTTACAGTGTTAAACGCGATAGTAGACCTAAGAAAAAAACACTCTTTAAC

AATAACTCCATGCAAACCTCCATCTTTATTTTATATAATAAAAAAGAACAGTAGGAGGCAAT
-----+-----+
TTATTGAGGTACGTTTGGAGGTAGAAATAAAATATATTATTTTTCTTGTCATCCTCCGTTA

← 1060N2 (KpnI)

1 ATGGAAAAATACTCATTGCAGAAGATGATTAGCTATTTTAGGAGTTATTACAGCATTC 60
-----+-----+
TACCTTTTTTATGAGTAACGTCTTCTACTAAGTCGATAAAATCCTCAATAATGTCGTAAG

61 TTAACCGAAGCAGGGTATCAAGTAATGACAGCTAAAAATGGAATAGAAGCATATCATCTA 120
-----+-----+
AATTGGCTTCGTCCCATAGTTCATTACTGTGCGATTTTTACCTTATCTTCGTATAGTAGAT

121 TTTCAAAAGGAAACATTTGATTTAATTATTATGGATATTATGATGCCGAGTATGGACGGG 180
-----+-----+
AAAGTTTTCTTTGTAAACTAAATTAATAATACCTATAATACTACGGCTCATACTGCC

181 TACACACTAACAGAACTGATTGTTCTACTTCAACCACACCGATACTTATGATGACGGCG 240
-----+-----+
ATGTGTGATTGTCTTGACTAAGCAAGATGAAGTTGGTGTGGCTATGAATACTACTGCCGC

241 CTCTCTGAAGAAGATGACGAGTTGAAAGCTTTGATCTAGGGGCGGACGACTATATACAA 300
-----+-----+
GAGAGACTTCTTCTACTGCTCAACTTTCCGAAACTAGATCCCCGCTGCTGATATATGTT

301 AAACCATTCTCTTATTTAGTATTATTAACAGAGTGCAAGTACTTTTGGAGACGAGTGAAC 360
-----+-----+
TTTGGAAGAGAATAAATCATAATAATTTGCTCACGTTTCATGAAAACCTGCTCACTTG

CAAAGTGAACAAAGAAGCAAATACTACGATGCGGAAATATTTCTGTAGATACCGAAACC
 361 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 420
 GTTTCACTTTGTTCCTTCGTTTATGATGCTACGCCTTTATAAAGACATCTATGGCTTTGG

 TTTGAAGTGATTTTCAGCTGGAGAAACAATCGAATTAACGAAAAAGAATTTGATATTTTA
 421 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 480
 AAAC TTCACTAAAGTCGACCTCTTTGTTAGCTTAATTGCTTTTTTCTTAAACTATAAAAT

 GTACTCCTGATTA AAAATCAAAGAAGGTGATTACTCGTGAAATGATATTGTCACAAGCA
 481 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 540
 CATGAGGACTAATTTTTAGTTTTCTTCCACTAATGAGCACTTTACTATAACAGTGTTTCGT

 TGGGATTTTCGCAGCTATTGTGGATACGTCCATTATCAATACGCATATGAAAAATCTACGC
 541 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 600
 ACCCTAAAGCGTCGATAACACCTATGCAGGTAATAGTTATGCGTATACTTTTTTAGATGCG

 AAAAACTGCACACTGAAAAATTCAAACGATTAGAGGTGCTGGCTATAAAATGGATGAA
 601 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 660
 TTTTTTGACGTGTGACTTTTTTAAGTTTGCTAATCTCCACGACCGATATTTTACCTACTT

 1060C1 (*KpnI*)
 ----->-----
 661 TAAAGTGAGAACCAGAATTAGTTGGAAAATTTTCTTAATATTTGTGAGTATCATTTTACT
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 ATTTCACTCTTGGTCTTAATCAACCTTTTAAAAGAATTATAAACACTCATAGTAAAATGA

 TTTTACGGCTCTAGTCTATGCCATGCTAATCTTTTTCTTACCACAATTTTATTATGATTA
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 AAAATGCCGAGATCAGATACGGTACGATTAGAAAAAGAATGGTGTAAAATAATACTAAT

 TAAAATAAAACAAATTAATGATTATGCAAATGAAGTCGTAAAAGCAGGCGAAGCGGATGA
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 ATTTTATTTTGTTTAATTACTAATACGTTTACTTCAGCATTTTTCGTCCGCTTCGCCTACT

 TATTGAAGGTGTGGAAAAAGCACTAAATGATTTTATGGAAAATACAAATATTTTACCAAT
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 ATAACCTCCACACCTTTTTTCGTGATTTACTAAAATACCTTTTATGTTTATAAAATGGTTA

 TTTAATAGATAGTAATGGAAATATTGTTTATATACCAAATGTGAATATGGCATCCATTAA
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 AAATTATCTATCATTACCTTTATAACAAATATATGGTTTACACTTATACCGTAGGTAATT

 ATCAGCAACATCGACTGTTGTAGACGGCAGCAAAGCAGAAGGTGGTACAACCTGCAACGGA
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 TAGTCGTTGTAGCTGACAACATCTGCCGTGCTTTCGTCTTCCACCATGTTGACGTTGCCT

 TTATTCAGGTGGAACAGAAACAAAAATAAACCTATTTCTATC
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 AATAAGTCCACCTTGTC TTTGTTTTTTATTTGGATAAAGATAG

 1060C2 (*EcoRI*)

Imo11721172N3 (*BamHI*)

ACTGATTTAAATGAAAATATTGCTCAAATCGCTGAAGGTG
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+
 TGAATAAATTTACTTTTATAACGAGTTTAGCGACTTCCAC

 CGCTAAATGACGGATGCACCTGCAACAAATCCAAGAACACCGACTGAAACAGATGTTAGCG
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 GCGATTTACTGCCTACGTGACGTTGTTTAGGTTCTTGTGGCTGACTTTGTCTACAATCGC

```

CGATTCTTGAGAAGATGTTGGCATAAAAAGTTATTTATTTTCACTGGAATCAAATAACC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GCTAAGAACTCTTCTACAACCGTATTTTTCAATAAAATAAAGTGTGGACCTTAGTTTATTGG

TATTGACATCGTTTTTCATGCTACTTTATAATAGAACCGAGCACAAAAGACGTGTGGAATTA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
ATAACTGTAGCAAAAAGTACGATGAAATATTATCTTGGCTCGTGTCTGACACACCTTAAT

TAAATATAGCAGAGCAACGGGGCTCCCTCAAAAATATTGCACAATATTTTAAAGGGGCTC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
ATTTATATCGTCTCGTTGCCCGAGGGAGTTTTTATAACGTGTTATAAAAAATTCCCCGAG

TTTCTATTTTCTTGGAGAAATTTTTCTCTAGCTCTTTTACTCTTTTCGCTCAAGTAAATGC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
AAAGATAAAAGAACCTCTTTAAAAGAGATCGAGAAAATGAGAAAGCGAGTTCATTTACG

TTCTATAGAATGATTTTGTCTTATATTGTGACGAGTCAATCAATAGCAGAAGAAGAGGAC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
AAGATATCTTACTAAAACAGGATATAACACTGCTCAGTTAGTTATCGTCTTCTTCTCCTG
                                                                                   ←
GTGACAGGAATGAATGGAAGAATTGTAATAGCCGATGATGAACCTATTACAAGAATGGAC
1 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
CACTGTCCTTACTTACCTTCTTAAACATTATCGGCTACTACTTGGATAATGTTCTTACCTG
    1172N4 (KpnI)

ATCCGAGACATCTTAGAAGAAGCGAACTACAATGTTGTAGGGGAAGCGACAGATGGTTTTT
61 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 120
TAGGCTCTGTAGAATCTTCTTCGCTTGATGTTACAACATCCCCTTCGCTGTCTACCAAAA

GAAGCAATCGAACTATGCAAAAGCCATCAGCCAGATCTTGTTATCATGGACATTCAAATG
121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 180
CTTCGTTAGCTTGATACGTTTTTCGGTAGTCGGTCTAGAACAATAGTACCTGTAAGTTTAC

CCACTCTTAGACGGCTTAAAAGCGGGGAAACGAATTATTTCAGAAGGGCTTGCTGGCGGA
181 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 240
GGTGAGAATCTGCCGAATTTTCGCCCTTTGCTTAATAAAGTCTTCCGAAACGACCGCCT

ATTATCTTACTTACCGCATTTAGTGACCCCAAAAACACGGAGAAAGCAAAGGATTTGGA
241 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 300
TAATAGAATGAATGGCGTAAATCACTGGGGTTTTTGTGCTCTTTTCGTTTTCTTAAACCT

GCATTAGGTTATTTAGTCAAGCCACTTGATGAAAAAAGTTTGATCCCAACAGTTGAAAATG
301 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 360
CGTAATCCAATAAATCAGTTCGGTGAACACTTTTTTTCAAACCTAGGGTTGTCAACTTTAC

AGTATTGCCAAAGGGCGAGAAACAAGAAAATTAGAGCAGCAACTAGAAAAGCTCACCAA
361 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 420
TCATAACGGTTTTCCCGCTCTTTGTTCTTTTAACTCTCGTCGTTGATCTTTTCGAGTGGTTT

AAGTTAGAAGAACGCAAAGTGATTGAAAAAGCAAAGGTGTGCTTATGATTGAGAAACAAC
421 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 480
TTCAATCTTCTTGCGTTTTCACTAACTTTTTCGTTTTCCACACGAATACTAACTCTTGTG

ATCACAGAAGAAGAAGCCTACAACATGATTGTAATCTGAGCATGGACAAAACGCTGTCCG
481 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 540
TAGTGTCTTCTTCTTCGGATGTTGTACTAAGCATTAGACTCGTACCTGTTTTCGACAGGC
                                     1172C3 (KpnI)
                                     →
ATGATGGAAATCGCAGAAACGATTGTGATGAGCGATGACTAAAACGATTTCGAGAAAATGTG
541 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TACTACCTTTAGCGTCTTTGCTAACACTACTCGCTACTGATTTTGCTAAGCTCTTTACAC

```

```

TTTACGCTACACAGATTTATCGGAGCACGATATTGATGAATTAATTCATACTGCCAGTC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
AAATGCGATGTGTCTAAATAGCCTCGTGCATAACTACTTAATTAAGTATGACGGGTCAG

ATTAAGCGTATCGGCTATGTATCAAGACGTGGATGTATTCATTGATGTGTACAACAACT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TAATTCGCATAGCCGATACATAGTTCTGCACCTACATAAGTAACACTACACATGTTGTTTGA

AACCAGTGAAGCACTTGTTCATTCATCATAACACCACCAAAAACAACCAAATCACTATACAA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TTGGTCACTTCGTGAACAGTAAGTAGTATGTGGTGGTTTTTGTGGTTTAGTGATATGTT

AAACAAAGTAGTCGGGGAAACAGCCCTAAGGTCTAATGAGCCAGGTGTACTTAGAACATT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TTTGTTCATCAGCCCCCTTGTTCGGGATTCCAGATTACTCGGTCCACATGAATCTTGTA

GGAACGGGTATGAACTCCAATGACTTACTTGCGAAAACACAAGAAAACGTATTAATTCG
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CCTTGCCCATACTTGAGGTTACTGAATGAACGCTTTTGTGTTCTTTTGCATAATTAAGC

CCAAAAAGTTTATCCAATTCGTAATAAACAGCGAGTTATTGCCGTCCTAATTCTAGAAAA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GGTTTTTCAAATAGGTTAAGCATTATTTGTCGCTCAATAACGGCAGGATTAAGATCTTTT
                                     ← 1172C4 (EcoRI)
CGATATTAGCGCCGAAATTA
-----+-----+-----+
GCTATAATCGCGCTTTAATTT

```

lisR

```

                                     GACCTTCGTACAGTTGTTGCAGAAGCAGTAAAAGCTGGAA
                                     -----+-----+-----+-----+
lisRN1 (BamHI) CTGGAAGCATGTCAACAACGTCTTCGTCATTTTCGACCTT
TTCCAGTACCAACATTCACT GCGGCAATTAGCTACTACGATAGCTATCGTTCAGAAGTAT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
AAGGTCATGGTTGTAAGTGACGCCGTTAATCGATGATGCTATCGATAGCAAGTCTTCATA

TATCTGCAAATCTAATCCAAGCACAACGCGACTACTTTGGCGCTCATACGTATGAAAGAG
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
ATAGACGTTTAGATTAGGTTCTGTGTTGCGCTGATGAAACCGCGAGTATGCATACTTTCTC

TCGACAAACCTGGTGTATTCCATACAGAATGGCCACAAGTAGAAGATTGATGGAAGATAA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
AGCTGTTTGGACCACATAAGGTATGTCTTACCGGTGTTTCTTCTAACTACCTTCTATT

GGCATCCACTTTAACGAGTGGGTGCCCTTTTTTATGAGATTTGAATTAGTAAATCATGGTA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CCGTAGGTGAAATGCTCACCCACGGAAAAAATACTCTAAACTTAATCATTTAGTACCAT

AAGTGCTAAAAAAAAGTGAAAATATCTATTTATGCGCTGTTATTAGTTGTTTTTGAGCTA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TTCACGATTTTTTTTCACTTTTATAGATAAATACGCGACAATAATCAACAAAAACTCGAT

AAGTTCGTTACAATAGTAATAGGAATATAGTGTAATGACCGAAAGAGAGGGTTAGGCCAA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
AAGTTCGTTACAATAGTAATTCCTTATATCACATTACTGGCTTTCTCTCCCAATCCGGTT
                                     ← lisRN2 (KpnI)
ATGAATAGAATACTAATCGTAGAAGATGAAAAAACTTAGCACGCTTTATTGAACTAGAA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TACTTATCTTATGATTAGCATCTTCTACTTTTTTTGAATCGTGCGAAATAACTTGATCTT

```

1

60

```

ACTCCAGCATGAAAATTATGAAACAGCGGTTGCTAATGATGGACGCGCTGGACTCGAACT
61 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 120
TGAGGTCGTACTTTTTAATACTTTGTGCGCAACGATTACTACCTGCGCGACCTGAGCTTGA

CGCACTTAATGAAGAATGGGATGCTATTTTACTCGATCTAATGTTGCCACATTTAAACGG
121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 180
GCGTGAATTACTTCTTACCCTACGATAAAATGAGCTAGATTACAACGGTGTAAATTTGCC

GGTAGAAGTTTGTGTCGTGTCGCGCAAGTGAACAAACACCCATTATTATGATAACCGC
181 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 240
CCATCTTCAAACAGCAGCACACGCGGTTCACTTTGTTTGTGGGTAATAATACTATTGGCG

ACGTGACTCTGTTATCGATCGTGTATCCGGACTGGATCACGGAGCAGATGATTACATCGT
241 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 300
TGCCTGAGACAATAGCTAGCACATAGGCCTGACCTAGTGCCTCGTCTACTAATGTAGCA

CAAACCTTTCGCTATTGAAGAATTACTTGC CGCCTTCGCTCGCTATTGCGTCGGGTGGA
301 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 360
GTTTGGAAAGCGATAACTTCTTAATGAACGCGCGGAAGCGAGCGATAACGCAGCCCACCT

AAATGCAGAACAATCTGCTAAACAAACAACGCTACAGTATCGTAATCTAATTGTTGAAAA
361 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 420
TTTACGTCTTGTTAGACGATTTGTTTGTGCGATGTCATAGCATTAGATTAACAACCTTTT

GGAAAATCGCATTGTCAAACGCGACGAAGAAATCATTGACTTAAACAAAACGAGAGTATGA
421 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 480
CCTTTTAGCGTAACAGTTTGCCTGCTTCTTTAGTAACTGAATTGTTTGTCTCTCATACT

ACTTTTACTTACGTTAATGGAAAATGTTAATATCGTTTCTTACGCGGAAAGTGTACTCAA
481 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 520
TGAAAATGAATGCAATTACCTTTTACAATTATAGCAAGAATGCGCCCTTCACAATGAGTT

TAAAGTATGGGGTTATGAAACAGAAGTAGAAACAAATGTAGTGGATGTGTACGTTTCGTTA
521 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 580
ATTTTCATACCCCAATACTTTGTCTTCATCTTTGTTTACATCACCTACACATGCAAGCAAT

C TTACGAAATAAAATTGATCATCCTGACGAAGAAAGTTATATTCAAACAGTTCGCGGGA
581 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 640
G AATGCTTTATTTTAACTAGTAGGACTGCTTCTTTCAATATAAGTTTGTCAAGCGCCCA
      lisR C1 (KpnI)
CAGGGTATGTGATGCGTACATGACGACTAGCCATTTTCTTAAAAAGTCGTTCTTTGAA
641 -----+-----+-----+-----+-----+-----+
GTCCCATACACTACGCATGTACTGCTGATCGGGTAAAAGGAATTTTTCAGCAAGAAACTT

AATTCAAATGGACTTTTGGCGCTAGTGCAGCTATTTTCTAACTTTTCTTATTTTCCT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TTAAGTTTACCTGAAAACCGGATCACGTCGATAAAAAGATTGAAAAAAGATAAAAAGGA

ATGCCATTTACCAAGGAATTGGGCAAATGTTGTTAAATGAAGAAGAACCAGAAGTAAAAG
-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TACGGTAAATGGTTCCTTAACCCGTTTACAACAATTTACTTCTTCTTGGTCTTCATTTTC

AACTGCTTCTAGCAACAACGAGTACGTTAACGAATCAAGATTTGACCGATAATGAGGAAA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TTGACGAAGATCGTTGTTGCTCATGCAATTGCTTAGTTCTAAACTGGCTATTACTCCTTT

TTAAATATTTATTTAATAATGATAAAACCGTTAATCGCAAACCTCAAGATCAAGTGATTA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+
AATTTATAAATAAATTATTACTATTTTGGCAATTAGCGTTTGGAGTTCTAGTTCACTAAT

```

ATTTATATGATAAAGATGGCCATTTTATTAATAAGTATTATTTTTCAAGAAGTCAAGATA
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 TAAATATACTATTTCTACCGTAAAATAATTATTCATAATAAAAAGTTCTTCAGTTCTAT

 TCACTAGCATTGACTTTTTCACAGTATTTTGTAGCGGTACAGATAAGTTTATTATGAATA
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 AGTGATCGTAACTGAAAAGTGCATAAAACAATCGCCATGTCCTATTCAAATAACTTTAT

 AACC ← lisRC2 (*EcoRI*)

TTGG

Imo1507

1507N1 (*Bam*HI) →
ATCACTACTTGAAGCCTCTTCTCGCATTGTCTGCATTTGT
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 TAGTGATGAAC TTCGAGAAGAGCGTAACAGACGTAAACA

 TTTTCTCGGTCAACAGTTAGCGTCACTGTACCACCAAGTTGTTCTCGCGCCAACTCACTC
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 AAAAGAGCCAGTTGTCAATCGCAGTGACATGGTGGTTCAACAAGAGCGCGTTGAGTGAG

 GCTTTATCTGCAGCCGATTGAATGGTAAAACCTGATAAAAATAAGTACACAGACGACTGTG
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 CGAAATAGACGTCGGCTAACTTACCATTTTGGACTATTTTATTCATGTGTCTGCTGACAC

 AATATAAATTAGTTGTAAAACAGATCTTCCTTTTCTCGCTTTCATGCTGAGCCATGCTCTC
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 TTATATTAATCAACATTTTGTCTAGAAGGAAAAGAGCGAAAGTACGACTCGGTACGAGAG

 TTAAAAAATTCATGTGATTTCCCTCCATTCGGTTTCTACTCCACTAAGATTACTGGGGAG
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 AATTTTTTTAAGTACACTAAAGGAGGTAAGCCAAAGATGAGGTGATTCTAATGACCCCTC

 TTATGAAGAAAGTATGAACAAACTATGATGCATATTTTAACTTTTCGCGAAAAAATAAT
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 AATACTTCTTTCATACTTGTGTTGATACTACGTATAAAATTTGAAAGCGCTTTTTTTATTA

 TTGGCTTGATTATTAGGTCTAATTAGGCTAGTTTTAATGTAAGAGGAGTGAGAACAGAAT
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 AACCGAACTAATAATCCAGATTAATCCGATCAAAATTACATTCTCCTCACTTTGTCTTA

← 1507N2 (*Kpn*I)
 ATGAAATTACTTATGATAGAAGATAAATGTAAGTGTCTGTGAAATGATAGAAATGTTCTTT
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+

1 60

TACTTTAAATGAATACTATCTTCTATTACATTCACAGACACTTTACTATCTTTACAAGAAA

61 120

ATGAAAGAAGAAATTGATGCTACATTTGTTTCATGATGGCAAAATGGGTTATGAAGCGTTT

TACTTCTTCTTTAACTACGATGTAACAAGTACTACCGTTTTACCCAATACTTCGCAAA

121 180

TTTAAAGATGATTATGATATTGCGATTATTGACCTAATGCTTCCCTAATATGGACGGAATG

AAATTTCTACTAATACTATAACGCTAATAACTGGATTACGAAGGATTATACCTGCCTTAC

181 240

ACCATTTGCCGTAATAATCCGTGAAGTAAGCGATGTGCCAATTATCATTTTAACGGCTAAA

TGGTAAACGGCATTTTAGGCACCTTCATTGCTACACGGTTAATAGTAAAATTGCCGATTT

241 300

GAGTCAGAAATCCGATCAAGTGC TTGGTCTCGAAATGGGCGCAGATGACTATGTAACAAA

CTCAGTCTTAGGCTAGTTCACGAACCAGAGCTTTACCCGCGTCTACTGATACATTGTTTT

```

301  CCATTTAGCCCACTTACTTTAATGGCTCGAATTAAGCTGTTACACGCCGCAAAAATAGT 360
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GGTAAATCGGGTGAATGAAATTACCGAGCTTAATTTTCGACAATGTGCGGCGTTTTTATCA

361  GCCACTTCTACAGAAAATAATGAAGATATCCTAGAAACAACCTTATTTTAAAAATTAGTAAA 420
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CGGTGAAGATGTCTTTTATTACTTCTATAGGATCTTTGTTGAATAAAAATTTAATCATT

421  CGCAC  ACGCGAAATTTTTTATCAAGATGAGCTACTTGATGCTCTAACACCTAAAGAATT 480
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GCGTGTGCGCTTTAAAAAATAGTTCTACTCGATGAACTACGAGATTGTGGATTTCTTAA

481  CGATTTACTATATTTTTTTGATGCAACATCCACGACAAGTGTTTTCAAGAGAACAAATTGCT 540
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GCTAAATGATATAAAAAACTACGTTGTAGGTGCTGTTTCACAAAAGTTCTCTTGTTAACGA

541  GGAACAAGTTTGGGGTTATCAGTTCTACGGAGATGAGCGCACAGTGGACGTTACATCAA 600
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CCTTGTTCAAACCCCAATAGTCAAGATGCCTCTACTCGCGTGTACCTGCAAGTGTAGTT

601  ACGTTTACGCCAAAAAATCGCCACCGAAACAAAGCCATTTTTGCACACCGTCTGGGGTGT 660
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TGCAATGCGGTTTTTTTAGCGGTGGCTTTGTTTCGGTAAAAACGTGTGGCAGACCCACA
1507C2 (KpnI)
      >
661  TGGCTACAAATTTGATGAAACGGAATGAAGCAAATGAAATTTAAATATGCTTACCAATTG
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
ACCGATGTTTAAACTACTTTGCCTTACTTCGTTTACTTTAAATTTATACGAATGGTTATC

TATTTTTCACACAATTTATCATTTTGCTCATTGCTTGTATTATGATTGGGGTGCTTGTCT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
ATAAAAAGTGTGTTAAATAGTAAAACGAGTAACGAACATAATACTAACCCACGAACAGA

CCCCTCATTAAAGATTATTTTTTACCAAAGCCAAGTAGATGACTTAACAAGTTATGGGC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GGGTGAGTAATTTTCTAATAAAAATGGTTTTCGGTTTCATCTACTGAATTGTTCAATACCCG

AAACGATTTCCAGGGATATTCGTTATTCGCCACAAGATGCAACGATGCAAGTTTGAACA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TTTGCTAAAGGTCCCTATAAGCAATAAGCGGTGTTCTACGTTGCTACGTTCAAACTTGT

CGTATCAGCGAATTTTAGATGTTAAAAAAATTCATTATACAATCAAGAATGCCAACGACG
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GCATAGTCGCTTAAATCTACAATTTTTTTAAGTAATATGTTAGTTCTTACGGTTGCTGC

AAACCATTTATCCAACACAGATGAATCAGCCTTTACCTAAGGATTTCTCTATTTCTGCGG
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TTTGGTAAATAGGTTGTGTCTACTTAGTCGAAATGGATTCCCTAAAGAGATAAAGACGCC

ATGATAAGAAAAGCTTGAAAGTGGTGAACCGTTAGTAAGAAAATAGATAATCGCTTTA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TACTATTCTTTTTCGAACTTTCAACCACTTTGCCAATCATTCTTTTATCTATTAGCGAAAT
      <
ACAAAGAAAT
-----+
TGTTTCTTTA
1507C4 (EcoRI)

```

Imo17451745N1 (*Bam*HI)

TTGTATTCTTTTTAGCAACAGGAAGTATCATTACTTCA
 -----+-----+-----+-----+-----+
 AACATAAGAAAAATCGTTGTCCTTCATAGTAAATGAAGTA

CTGAAAAAGGCAAGTTTGAGATTTTATTTAAACTAGGGGTAATTAGTTACAGATGCTGTT
 -----+-----+-----+-----+-----+
 GACTTTTTCCGTTCAAACCTCTAAAATAAATTTGATCCCCATTAATCAATGTCTACGACAA

AAATTATTTCCAAGCAGGTATGGCCGATTTTTGTTATTCTACTGAAAAAGAAATCCGGA
 -----+-----+-----+-----+-----+
 TTTAATAAAGGTTTCGTCCATACCGGCTAAAAACAATAAGGATGACTTTTTCTTTAGGCCT

ATTATTTTTTTGGAATTGCGCATTCCATGGCTGCACGTGGGGTATTTCTATTAATTTAAT
 -----+-----+-----+-----+-----+
 TAATAAAAAACCTTAACGCGTAAGGTACCGACGTGACACCCCATAAAGATAATTAATTA

GGATAATATAAAAATATCCGGTATTAATTTGGTACAGGTATTTATATTGTCTGTTATACGGC
 -----+-----+-----+-----+-----+
 CCTATTATATTTTATAGGCCATAATTAACCATGTCCATAAATATAACAGACAATATGCCG

GTATTACTTTTTGTGTATCAATTCTTTTACCAAATTTGTGATGGCCAATAAAAAGTAATT
 -----+-----+-----+-----+-----+
 CATAATGAAAAACACATAGTTAAGAAAATGGTTTTAACACTACCGTTATTTTTTCATTAA

GGCTTTTGTGGTTATTTTCAGCTAAAATGAGAAGAGAGTTCCACCGAGGGAGGCCTAGAA
 -----+-----+-----+-----+-----+
 CCGAAAACACCAATAAAGTCGATTTTACTCTTCTCTCAAGGTGGCTCCCTCCGTGATCTT

1745N2 (*Kpn*I)

ATGGTAAGGTATATATCGTAGAAGATGATGAAGTGATTTCGTGATACAATTCGAAAACAT
 -----+-----+-----+-----+-----+
 TACCATTTCCATATATAGCATCTTCTACTACTTCACTAAGCACTATGTTAAGCTTTTTGTA

1 60

TTAAGTAAATGGGGATTTGAGATTGGTGTAGTAGAGGATTTTAAACAATATTTTACAAGAG
 -----+-----+-----+-----+-----+
 AATTCATTTACCCCTAAACTCTAACACATCATCTCCTAAAATTGTTATAAAATGTTCTC

61 120

TTTTTAGCTTTTCGAACCCCAATTAGTTATTTTAGATGTTAATCTTCTTTCTTTGATGGT
 -----+-----+-----+-----+-----+
 AAAAATCGAAAGCTTGGGGTTAATCAATAAAATCTACAATTAGAAGGAAAGAACTACCA

121 180

TTTTATTGGTGTAATCAAATCCGAGAAGTTTCGAATGTACCCATTATCTTTTTATCATCA
 -----+-----+-----+-----+-----+
 AAAATAACCACATTAGTTTAGGCTCTCAAAGCTTACATGGGTAATAGAAAAATAGTAGT

181 240

CGTAATTCGCGAATGGACCAAATAATGGGCATGAACATGGGTGCAGATTATTATATTGAA
 -----+-----+-----+-----+-----+
 GCATTAAGCGCTTACCTGGTTTATTACCCGTACTTGTACCCACGTCTAATAATATAACTT

241 300

AAACCAGTTGATCTGGATGTTTTAATGGCGAGGATAAATGCTCTATTAAGGCGAACATAT
 -----+-----+-----+-----+-----+
 TTTGGTCAACTAGACCTACAAAATTACCGCTCCTATTTACGAGATAAATCCGCTTGTATA

301 360

TCCTACGCAGATTTAGAAGAAGCAAATGTAATGGAGCATAATAATGTTTTCTACACATT
 -----+-----+-----+-----+-----+
 AGGATGCGTCTAAATCTTCTCGTTTACATTACCTCGTATTATTACAAAAGGATGTGTAA

361 420

GATACGAACACACTTACACATTTAGAAGATAAAATTTGAGCTAACGAAAAATGAATTTTTG
 -----+-----+-----+-----+-----+
 ACTATGCTTGTGTAATGTGTAAATCTTCTATTTTAACTCGATTGCTTTTTACTTAAAAAC

421 480

```

ATTTTATATGAATTAATGAAACAAAAAGGTAGCATTGTAAGTCGTGATGAAATTATGCGC
481 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TAAAATATACTTAATTACTTTTGTTCATCGTAACATTCAGCACTACTTTAATACGCG
GCACCTTTGGGAAGATGAAAGTTTTGTTGATGATAATACATTGACAGTTAATGTTGTTTCGT
541 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CGTCAAACCCTTCTACTTTCAAAACAACACTACTATTATGTAAGTGTCAATTACAACAAGCA
ATTTCGTAAAAAAGTTGCAGAAATTGGTTTGAGCGAATTTATCAAAAACAAAAAAGGCCAA
601 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TAAGCATTTCGAAACGTCTTTAACCAAACCTCGCTTAAATAGTTTTGTTTTTTCCGGTT
GGATATATGATTGAATGACGAAAAACAGGGAGATAGCGCTAAAAAACCGAACTTGC
661 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CCTATATACTAACTTACTGCTTTTTGTCCCTCTATCGCGATTTTTTTGCGCTTGAACG
CCTGTTTTTCGTAAATGGAGGAGGAGTCCAAATGAAAATTTTAGTATTCGGTGGTACTCG
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GGACAAAAGCATTACCTCCTCCTCAGGTTTACTTTTTAAATCATAAGCCACCATGAGC
TTTTTTTTGGCAAGAAATTAGTGGAAAGACTTGTTCAGAAGGACATGATGTCACCATTTGG
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
AAAAAAACCGTTCTTTAATCACCTTTCTGAACAAAGTCTTCTGTACTACAGTGGTAACC
CACAAGGGGAAAAACAGAAGATAATTTTGGTGATACTGTCAAACGAGTTGTTTTAAATCG
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GTGTTCCCCTTTTTGTCTTCTATTAACCCTATGACAGTTTGCTCAACAAAATTTAGC
AGAATCAAGAGATGCTTTTATTCCAATTAGCAAAAGAAGACTGGGATGTTATTTACGATAA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TCTTAGTTCTCTACGAAATAAGGTTAATCGTTTTCTTCTGACCCTACAATAAATGCTATTT
TATATGTTTCTCTCCGAAAGAAGCACTTTATGCCGTAGATGCATTTAAAGGCAAGGTAAA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
ATATACAAAGAGAGGCTTTCTTCGTGAAATACGGCATCTACGTAAATTTCCGTTCCATTT
ACGATACATATATACATCACTCTCTGTTTATAGTCAAAAAGGTCGAGCTTTAGTTGA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TGCTATGTATATATGTAGTAGTGAGAGACAAATATCAGTTTTTCCAGCTCGAAATCAACT
                                     ←-----
                                     1745C4 (EcoRI)

```

resD

```

                                     resDN1 (BamHI)
                                     -----→
AAGATAAAGCCATTGTAGAAATTACTATTCATGAAGGCAG
-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TTCTATTTTCGGTAACATCTTTAATGATAAGTACTTCCGTC
AAATCGCCAAGTGCCTAAAATGTTTCGAGGCAGTTGGCTTTGAAGTACAAAAATTATCAAG
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TTTAGCGGTTACGCATTTTACAAGCTCCGTCAACCGAAACTTCATGTTTTTAATAGTTC
AGAAGAGTACTCGTTCTTGAATTTACGTGGTTTAAACGCAGGTGAACGTCGGGAATTATC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TCTTCTCATGAGCAAGAACTTAAATGCACCAAATTTGCGTCCACTTGCAGCCCTTAATAG
CCATCATGAAGTAAAACAATTAACAAACGGAAGCAAGATTTGGTAAAAATAAAAAAGTAACT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GGTAGTACTTCATTTTGTAAATTTTTGCCTTCGTTCTAAACCATTTTTATTTTTTCATTGA

```

```

TTTCTTACAAAATATACTTTCTAATAGCGTGT'TTTGTGAAAAACATGTATAATTTAAATC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
AAAGAATGTTTTATATGAAAGATTATCGCACAAAACACTTTTTGTACATATTAATTTAG

GTAGGAAATTTGGTATAGGCAATTATATGGT'TTTTCGTATGTGGGTACGGAAGATTCCA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CATCCTTTAAACCATATCCGTTAATATACCAAAAAAGCATACACCCATGCCTTCTAAGGT

TTTATCTGAATGAATGTAATGATCGT'TTTATGTAAATGAGAGTTAGGGGATGAGTACTT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
AAATAGACTTACTTACATTTACTAGCAAAAATACATTTACTCTCAATCCCCTACTCATGAA
                                     ←
                                     resDN2 (KpnI)
ATGAGTGAACAAGTTAGAGTGC'TTGTTGTGGATGATGAGGACCGGATACGACGCCTTCTT
1  -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
TACTCACTTGTTCAATCTCACGAACAACACCTACTACTCCTGGCCTATGCTGCGGAAGAA

AAGATGTATCTTGAAAGAGAAAACATCGTATTGAAGAAGCTAGTGATGGTGATCAAGCA
61  -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 120
TTCTACATAGAAC'TTCTCTTTTGATAGCATAACTTCTTCGATCACTACCACTAGTTCGT

TTAAGCATGGCGCTGAACAATAATTATGAAGTAATCCTACTTGATTTGATGATGCCTGGT
121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 180
AATTCGTACCGCGACTTGTTATTAATACTTCATTAGGATGAACTAACTACTACGGACCA

AAGATGGCATCGAAGTTTGTCTGTAAC'TGAGGGAGTTTAAATCCACACCCGTTGTCATGT
181 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 240
TTCTACCGTAGCTTCAAACAGCACTTGACTCCCTCAAATTTAGGTGTGGGCAACAGTACA

TTGACTGCAAAAGGAGAAGAAGCTAACCGAGTACAAGGCTTTGAAGTTGGTGACAGATGAT
241 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 300
AACTGACGTTTTCTCTTCTTCGATTGGCTCATGTTCCGAAACTTCAACCACGTCTACTA

TACATCGTAAAACATTTAGCCCAAGAGAAGTTGTGCTTCGCGTGAAGGCTGTTCTTTCGT
301 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 360
ATGTAGCATTTTGGTAAATCGGGTTCCTTCAACACGAAGCGCACTTCCGACAAGAAGCA

CGCGCCAAACAATCCTCAGAAGAATCAGCAGGAGGCACACCGGGAGACATTATTACCTTC
361 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 420
GCGCGGTTTGTTAGGAGTCTTCTTAGTTCGTCCCGTGTGGCCCTCTGTAATAATGGAAG

CCACATTTAAAAATTGATAACGAAGCTCACCGTGTATTGTTCGATGGAAAAGAAATCGGT
421 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 480
GGTGTAATTTTTAACTATTGCTTCGAGTGGCACAATAACAGCTACCTTTTCTTTAGCCA

TTGACACCGAAAGAATATGACTTGCTTTATTATTTAGCTAAATCTCCGGATAAAGTATTC
481 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 540
AACTGTGGCTTTC'TTATACTGAACGAAATAATAAATCGATTTAGAGGCCTATTTCATAAG

GACCGCGAGTCAC'TTTTAAAAGAAGTGTGGCGTTATGAATTC'TTTGGCGATTTGCGAACG
541 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 600
CTGGCGCTCAGTGAATAATTTCTTACACCGCAATACTTAAGAAACCGCTAAACGCTTGC

ATTGATACACACGTTAAAAGACTGCGCGAAAAAC'TGCATGATGTATCAGAAGACGCTGCG
601 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 660
TAACTATGTGTGCAATTTTCTGACGCGCTTTTTGACGTACTACATAGTCTTCTGCGACGC

AGAAATGATTGTAACAGTTTGGGGTCTTGATATAAATTTGAAGTTCCAGAAAGATTAATAA
661 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TCTTACTAACATTTGTCAAACCCAGAACCTATATTTAACTTCAAGGTCTTCTAATTATT

```

resDC1 (*KpnI*)



 AACAGACTAAGATAACGGGCAAAGACGTTTAAATCGGCAAGTGTATGCCGCACGTGCTTT

 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+

 TTGTCTGATTCTATTGCCGTTTCTGCAAATTAGCCGTTTACAATACGGCGTGCACGAAA

 TGTTTCGTTATTTTTTGGCAGGACCGAGGTGAGAATAGATGAAGATTTGGAATAGTAGGA

 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+

 ACAAGCAATAAAAAACGCTCCTGGCTCCACTCTTATCTACTTCTAAACCTTATCATCCT

 TTGTTGGGAAAATTTGGAGTACCATTATTCTTTTACTAATAGGGATTTTAGTTATTTCCG

 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+

 AACAACCCTTTTAAACCTCATGGTAATAAGAAAATGATTATCCCTAAAAATCAATAAAGGC

 GATTTTTAGTGGCAATGATTTATGAAAAAATAATATTACGGAATAACAAATGAATTAG

 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+

 CTAAAAATCACCGTTACTAAATACTTTTTTTATTATAATGCGCTTATTGTTTACTTAATC

 AAGACAAAACAGCCAGTATCATCACTGTAATGCAAGAAAATAATGAAGTAATCTCTGCTG

 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+

 TTCTGTTTTGTCGGTCATAGTAGTGACATTACGTTCTTTTATTACTTCATTAGAGACGAC

 AAAATAATAATGATTCTGCACTTATACTACTTGATGATACGATGGGCGTCATTATCGAAC

 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+

 TTTTATTACTAAGACGTGAATATGATGAACTACTATGCTACCCGAGTAATAGCTTG

 AAAACAAAAGCGTCTATCAATCACAGTCACCAGATACT

 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+

 TTTTGTTCGCA
 
 GATAGTTAGTGTCACTGGTCTATGA

 resDC2 (*EcoRI*)

Imo2010

TCGCCACGAACAGCCCATTAAGCTGGAAATCAATATTG

 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+

 ACGCGGTGCTTGTTCGGGTAATTCGACCTTTAGTTATAAC

 AAAAACGTTTCAATCATACTCAGATTCCAAGGTTTGCTCTGCAGCCGCTCATTGAAAATT

 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+

 TTTTTGCAAAGTTAGTATGAGTCTAAGGTTCCAAACGAGACGTCGGCGAGTAACTTTTAA

 TTTTCAAATATGCTTATAAAGAAAATCAAAATCCAATAGTCGTAATTACGGTCACAGCAG

 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+

 AAAAGTTTATACGAATATTTCTTTTAGTTTTAGGTTATCAGCATTAAATGCCAGTGTCTGTC

 AAAATAACAATTTGCAATTTAGAATTGAAGACAATGGTTTCGGGAATCGATGCGGAGAAAT

 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+

 TTTTATTGTTAAACGTTAAATCTTAACTTCTGTTACCAAGCCCTTAGCTACGCCTCTTTA

 TAAAAGAGGTGCAAGCAACAATTGAAAGTAAAGATGATACGAGCCACATCGGTCTAGCTA

 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+

 ATTTTCTCCACGTTTCGTTGTTAACTTTTCACTTCTACTATGCTCGGTGTAGCCAGATCGAT

 ATTTAAACAAACGATTGCAGCTTTTGTATGGAGAACTTATCGATTAACAATCAAGAGTA

 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+

 TAAATTTGTTTGCTAACGTCGAAAACATACTCTTTGAATAGCTAATTGTTAGTTCTCAT

 2010N1 (*BamHI*)



 AAGCAAATGAAGTACCATCATTCTGTTTCAAGTACCTCAAAATACGGGAGGAGAAAAGT

 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+

 TTCGTTTACTTCCATGGTAGTAAGACAAAGTTCATGGAGTTTTATGCCCTCCTCTTTTCA

```

1  ATGCTAAAAATTGTACTAGTAGACGACGAGCCCTTATTCTCAAAGGTTTAGAGAGCATT 60
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
   TACGATTTTTTAACATGATCATCTGCTGCTCGGGGAATAAGAGTTT CCAAATCTCTCGTAA
                                                    ←
                                                    2010N2 (KpnI)

61  ATTCCAGAATTCGAGCAATCAATTGAAATTATTGGAACGGCTAAAAATGGCGCAGTAGCA 120
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
   TAAGGTCTTAAGCTCGTTAGTTAACTTTAATAACCTTGCCGATTTTTACCCGCTCATCGT

120  TTAGATTTATTTGCTAATCAAGAAGTAGATGTCCTTTTGACCGATATAGAGATGCCTGTA 180
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
   AATCTAAATAAACGATTAGTTCTTCATCTACAGGAAAACGGCTATATCTCTACGGACAT

181  ATGAACGGTTTAGAATTAATCGACGAATGGAAAAACGACAACCCGCGACTAAAAC TATT 240
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
   TACTTGCCAAATCTTAATTAGCTGCTTACCTTTTTTGTGCTGTTGGGCGCTGATTTTGATAA

241  GTTCTTTTCGGGATTTGAAGATTTTCATTATGTGAAACGCGGGCTTTTCAGCGGGAATCGAA 300
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
   CAAGAAAGCCCTAAACTTCTAAAAGTAATACACTTTGCGCCCGAAAGTCGCCCTTAGCTT

301  AATTATTTATTTAAAACCTTTAAACGAACAAGAATTTAAAAGAAACACTTATACAAATAGAG 360
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
   TTAATAAAATAATTTTGAAATTTGCTTGTCTTAAATTTTCTTTGTGAATATGTTTATCTC

361  AAAAAACAAATGACAGACAGTGTGATACCAAGGGAAGAAGCGTATTACATCTTACGGGAC 420
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
   TTTTTTGTTTACTGTCTGTACACTATGGTTCCCTTCTTCGCATAATGTAGAATGCCCTG

421  AACACGATTTGGCGTTGGCTAAATTTACGAATTAATAAAGAAGAATGGGAAGAGCGTCTA 480
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
   TTGTGCTAAACCGCAACCGATTTAAATGCT TAATTATTTCTTCTTACCCTTCTCGCAGA

481  GCGTTGTATGATATGGCCTTAAATCCAAAAGAAAACGCTGTGCTCATCCAAATTC AAGCA 540
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
   CGCAACATACTATACCGGAATTTAGGTTTTCTTTTTCGACACGAGTAGGTTTAAAGTTCGT

541  ACGAAAGAAATCGATCTGGCCGAATGGAAAAATCTTCTGAACAGTATCGCAAGGACTTT 600
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
   TGCTTCTTTTAGCTAGACCGGCTTACCTTTTTTAGAAAGACTTGTCATAGCGTTCTGAAA

601  TCATTTATGCTACTTACACCAGAAAATGAAATAATAGTTGGAATAACCGAACAAACTTCG 660
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
   AGTAAATACGATGAATGTGGTCTTTTACTTTATTATCAACCTTATTGGCTTGTGTTGAAGC

661  CGATATCCGAACAAATTTTAGCAATTCATCAAGATATGAAAAACGAATTTCAAATGAAG 720
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
   GCTATAGGCTTGTTTAAAATCGTTAAGTAGTTCTATACTTTTTTGCTTAAAGTTTACTTC

721  GCTTTTTATCTATTTATTAGTGAAAAAGTTTCAGGGTGAAATGATGTATCCACAAGCTTTT 780
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
   CGAAAAATAGATAAATAATCACTTTTTTCAAGTCCACTTTACTACATAGGTGTTTCGAAAA

781  CGTCAACTTACAAGGCTGCTTCCAGAACGGCTTGTCCAAGAGCCTGGTAGTCTAATCGCC 840
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
   GCAGTTGAATGTTCCGACGAAGTCTTGCCGAACAGGTTCTCGGACCATCAGATTAGCGG

841  TACCAAAAACGTACGAAACATACTTGGCGTCCGAAGAGAAAACAACATCAACTCGCGAAA 900
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
   ATGGTTTTTGCATGCTTTGTATGAACCGCAGGCTTCTCTTTTGTGTTAGTTGAGCGCTTT

```

```

CTCCTCGTGATGAATAATGAAAAAGAAATTAAGCTTGGATAAAATAACTTTTTTAAAGAA
901 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 960
GAGGAGCACTACTTATTACTTTTTCTTTAATTTGGAACCTATTTATTGAAAAAATTTCTT

TGGAATGACCATAAACTGGAAAGCGACCCGCATCAAATGCTACATATTTGAATGAGTTAC
961 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1020
ACCTTACTGGTATTTGACCTTTTCGCTGGGCGTAGTTTACGATGTATAAAACTTACTCAAT

TTTGTGATGATGGCGGAATCGGATCCAAAAGAATTAAGTGAATCTATGGGGAGAATTGCC
1021 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1080
GAACACTACTACCGCCTTAGCCTAGGTTTTCTTAATTCACTTAGATACCCCTCTTAACGG

GAAGAAACAAGTATTGAGGGATTGGAAGAGGCGACACTAGCCTATGCTATTCGTTACTAT
1081 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1140
CTTCTTTGTTTCATAACTCCCTAACCTTCTCCGCTGTGATCGGATACGATAAGCAATGATA

AACCGCAAGAAACAAACCGATGAATCAAAAAGCCCTATTATTCAAATGTGCTTTCCTAC
1141 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1200
TTGGCGTTCTTTGTTTGGCTACTTAGTTTTTCGGGATAATAAGTTTTACACGAAAGGATG

ATCACGGAACATTTTCGAGAAGGAATGTCTTTGAAAACGCTCGGAAACGACTTCCATATT
1201 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1260
TAGTGCCTTGTAAGCGTCTTCTTACAGAACTTTTTCGAGCCTTTGCTGAAGGTATAA

AACGCAGTTTATCTCGGTCAACTTTTTCAAAAAGAAATGGGCGAACATTTTACGGATTAT
1261 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1320
TTGCGTCAAATAGAGCCAGTTGAAAAGTTTTTCTTTACCCGCTTGTAATAATGCCTAATA

CTAAATCGCTACCGGTCAACTATGCAAAAAGAAGAATTGCTTCAAAACAAAAGATAACTTA
1321 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1380
GATTTAGCGATGGCCAGTTGATACGTTTTCTTCTTAACGAAGTTTGTCTTTCTATTGAAT

ACCATCATCGCAGGGAAATCTGGTTATACCGATATGGCTTATTTTTATCGCCAGTTCAA
1381 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1440
TGGTAGTAGCGTCCCTTTAGACCAATATGGCTATACCGAATAAAAATAGCGGTCAAGTTT

AAGCACACAGGCGAAACACCGAATCGTTACCGAAAAATCCATCAATAAGATTATTTCTAA
1441 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TTCGTGTGTCCGCTTTGTGGCTTAGCAATGGCTTTTTAGGTAGTTATTCTAATAAAGATT

2010 C1 (KpnI)
  ───────────▶
TATTTGTCTATAAATCTAAACATCCGCAACTATTTTAACCCCTCGTAAAAACGATAAACTA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
ATAAACAGATATTTAGATTTGTAGGCGTTGATAAAATTGGGAGCATTTTTGCTATTTGAT

AAGATGTTGAAAGCACTTACAAAAAGAGGGGTGGATGGATTGAAAAAGTTTATCACA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TTCTACAACCTTTCGTGAATGTTTTTCTCCCCACCTACCTAACTTTTTTCAAAAATAGTG

AATTCGAGCTAATCGGATTTGGCTATTAATGGTACTTCCAGGCGTCTTTGGTTCCTGGT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TTAAGCTCGATTAGCCTAAACCGATAATTACCATGAAGGTCCGAGGAAACCAAGGACCA

TTTCTCATACTTACCAATGTTTGGTACAGTAATTGCGTTCAAAGATTACAAGATTGATGG
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
AAAGAGTATGAATGGTTACAAACCATGTCATTAACGCAAGTTTCTAATGTTCTAACTACC

GAAAGGATTTTTATCCAGTATTATGAGCAGTGACTGGGTGGGACTTGAAAAATTTAAATT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CTTTCCTAAAAATAGGTCATAATACTCGTCACTGACCCACCCTGAACTTTTAAAAATTTAA

```

```

TCTATTCCAAACAAACGACGCTTTTATTATTACCCGAAACACTGTTCTTTATAATTTAGT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
AGATAAGGTTTGTGCTGCGAAAATAATAATGGGCTTTGTGACAAGAAATATTAATCA

ATTTATTATCGTAGGGCTGTTTCTTGGT
-----+-----+-----+
TAAATAATAGCATCCCGACAAGAACCA
                ← 2010C2 (BamHI)

                vanRN1 (BamHI) →
cesR
ATATCATGTATGAGGCTTATAAATTGTTAAAAGAGTCTT
-----+-----+-----+-----+
TATAGTACATACTCCGAATATTTAACAATTTTCTCAGAA

TCCCTCCATTAATGGACAAACGCTTGTCTGCGGACGAAGAAGAGGCTATCAAGCAAATTA
-----+-----+-----+-----+-----+
AGGGAGGTAATTACCTGTTTGCGAACAGACGCCTGCTTCTTCTCCGATAGTTCGTTTAAT

TTTGGCCATAAAACAAGATTTATTGAATTTTCATGATTTTCGCTCGAGACGGGCAGGCG
-----+-----+-----+-----+-----+
AAAACCGGGTATTTTGTCTAAATAACTTAAAGTACTAAAAGCGAGCTCTGCCCGTCCGC

CAGAAGAATATATTGATTTTCATTTAGTCGTATCTTCTTCGATGACGATTGAAAGTGCTC
-----+-----+-----+-----+-----+
GTCCTTATATAAATAAAAGTAAATCAGCATAGAAGAAGCTACTGCTAACTTTACAGAG

ATTCGCTATGTGACGAAATGAGGCAGAGATTATGAATTTTATGCTAAAGCGGAAGTTC
-----+-----+-----+-----+-----+
TAAGCGATACACTGCTTTAACTCCGTCCTAATACTTAAAAATACGATTTTCGCTTCAAG

TTATCCACTTAGAGCCGGAAGAAGAACGGGTCTTACCAGAATTTAATCCGAGCTCTTTC
-----+-----+-----+-----+-----+
AATAGGTGAATCTCGGCCCTTCTTCTTGCCAGGAATGGTCTTAAATTAGGCTCGAGAAAG
                cesRN2 (KpnI) ←
ATTCGATTTGTTGCTAAAGTGTTACAATAGGTAGAAATAAGACTGGAAAGGACAATGAGT
-----+-----+-----+-----+-----+
TAAGCTAAACAACGATTTTACAATGTTATCCATCTTTATTCTGACCTTTCCTGTTACTCA
ATGACAACTTCTATTTTAATTGCTGATGATGACAAAGAAATGTTGATTTAGTAAAATTA
1 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
TACTGTTGAAGATAAAATTAACGACTACTACTGTTTCTTTAACAATAAATCATTTTAAT

TATTTACAAAATGAAGGATATACGATTTATCAAGCTTATGATGGTGCGGAAGTATGGCGT
61 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 120
ATAAAATGTTTTACTTCTATATGCTAAATAGTTTGAATACTACCACGCCTTCATAACGCA

TTAGTTCAAGAAAAACAGCCAACCTTAGTGATATTAGATATTATGATGCCTGAAATGAAC
121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 180
AATCAAGTTCTTTTTGTGCGGTTGAAATCACTATAATCTATAATACTACGGACTTTACTTG

GGCTTAGAAGTATGCCGATTAATGAGAGATAATGGGATTTTACTCCATCCTAATGCTT
181 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 240
CCGAATCTTCATACGGCTAATTACTCTCTATTACCCTAAAACCTGAGGGTAGGATTACGAA

AGTGCCAAGGCTGAAGACAACGACAAAATCATGGGTCTTTAACAGGTGCGGACGATTAT
241 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 300
TCACGGTTCCGACTTCTGTTGCTGTTTTAGTACCCAGAAAATTGTCCACGCCTGCTAATA

```

```

ATGGTCAAGCCATTCAATCCATTAGAGCTTTCTGTACGCGTGAAAGCTATTCTAAGAAGA
301 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 360
TACCAGTTCGGTAAGTTAGGTAATCTCGAAAGACATGCGCACTTTTCGATAAGATTCTTCT

ATGCAGCAAATGAGTCAAGCAGAGCCTGTTAGTCAAGATAAAAGTCATCATTGGGCCGATA
361 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 420
TACGTCGTTTACTCAGTTCGTCTCGGACAATCAGTTCATTTTCAGTAGTAACCCGGCTAT

GTAGTTGACCGCGGACTTCATGTTGTAACGGTTGGTGGCAAAGAACTTCATTTGACGACT
421 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 480
CATCAACTGGCGCCTGAAGTACAACATTGCCAACACCAGTTTCTTTGAAGTAAACTGCTGA

TCTGAATTTGATATTTTATTTTTACTAGCGAGTGAGCCAGGGCGCGTTTTTTAGTTTCAGAA
481 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 540
AGACTTAAACTATAAAATAAAAATGATCGCTCACTCGGTCCC GCGCAAAAATCAAGTCTT

TATATTTTTGAGAAGATTTGGCAAGAAAAGGCCCTTGGAGCGAGTAAGACAGTAATGGTC
541 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 600
ATATAAAAACCTCTTCTAAACCGTTCTTTTCCGGGAACCTCGCTCATTCTGTCATTACCAG

CATATTAGTAATTTGCGTGATAAGTTACGCGAGGCTATGGGTGGAGAAAAATGTGATTAAG
601 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 660
GTATAATCATTAAACGCACTATTCAATGCGCTCCGATACCCACCTCTTTTACACTAATTC
                                     cesRC1 (KpnI)
ACTATTTGGGGAGTAGGGTACAAAATTGAAATCTAAACTGGAAGTGTGTTTACGAAAAT
661 -----+-----+-----+-----+-----+-----+
TGATAAACCCCTCATCCCATGTTTTAACTTTAGATTTGACCTTGACAACAAATGCTTTTA

TAGCCATGTGATGAATGTTTGGCAGGCGACTTTTTTTGACGCTGTTTCTTGGGTTTTGGC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+
ATCGGTACACTACTTACAAACCGTCCGCTGAAAAAACGTCGACAAAGAACC CAAAACCG

GTTGATTACCATCCAAACTATTTATTTATGGAGCATTTCATTCCGGATGATTCTTTGTT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CAACTAATGGTAGGTTTGATAAATAAATACCTCGTAAAGGTAAGCCCTACTAAGAAACAA

TTTACGGGAAGTGTGCGCAGGCTATTGTTCAATTATTTGGAACGAATAAATATACGCGAAT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+
AAATGCCCTTACAGCGTCCGATAACAAGTTAATAAACCTTGCTTATTTATATGCGCTTA

CATGCAATCTTTTTGGATGATGTCGTTAAAATTTCTGATTATCTTTTTAATAGCTTGTCT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GTACGTTAGAAAAACCTACTACAGCAATTTTAAAGACTAATAGAAAAAT TATCGAACAGA

ATTCTTTGCTTTTTTCTATCGTTTGATGCGCCAAAGAATTTTGAAAAACA ACTGCGTAC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TAAGAAACGAAAAAAGATAGCAAACCTACGCGGTTTCTTAAAAC TTTTTGTTGACGCATG

GATTAATTTTGGCTTAAACGACGGGAAGCCAGTTGATACAGAAAGTTTTGTACCGGAAAT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CTAATTA AACGCGAATTGCTGCCCTTCGGTCAACTATGTCTTTCAAACATGGCCTTTA
                                     vanRC2 (EcoRI)
TCAAGAACTGGAACGT
-----+-----
AGTTCTTGACCTTGCA

```

phoPN1 (*Bam*HI) 

phoP

GGCTTGTAGTTTTGGGTGCTCGTGCGGCCACTCCGTCTG
 -----+-----+-----+-----+
 CCGAACATCAAAACCCACGAGCACGCCGGTGAGGCAGAC

CGCGACTAAACTTGAAAGCTGGTGAAAAAATTACAGAAGTAAACAGTCAACCAGTGC GTA
 -----+-----+-----+-----+
 GCGCTGATTTGAACTTTCGACCACTTTTTAAATGTCTTCATTTGTCAGTTGGTCACGCAT

CTCGCGAGGAACTATACGAAGCGCTAAACTTAAACCGAGCATTGTAAGCTGAAAGTAA
 -----+-----+-----+-----+
 GAGCGCTCCTTGATATGCTTCGCGATTTGAATTTGGCTCGTAAACATTTCGACTTTCATT

TCGATAATGCTGGTGAACCACGTTTTGAACAAACAGCACTTTATGAGAATGAATCATTG
 -----+-----+-----+-----+
 AGCTATTACGACCACCTGGTGCAAAACTTGTGTCGTGAAATACTTTACTTAGTAAAC

AACTTGGTTTGTATTATAAGAACCAAGATAATTTAGGACACCAGTGTGTTTGAAGCA
 -----+-----+-----+-----+
 TTGAACCAACAATAATTATCTTGGTCTATTAAATCCTGTGGTCACAACAACTTTCGT

GCATTGGTGTGTTTAAAGTTTTTGTAAAGATAAGATTAATATAAATGCATTTCTACCCGAAA
 -----+-----+-----+-----+
 CGTAACCACAAAATTCAAAACATTTCTATTCTAATTATATTTACGTAAAGATGGGCTTT

AGGTTAATTCATGCTATATTTTAGATAAAAAGGGTTACATAAAGAAGGGATGGGAAGTACG
 -----+-----+-----+-----+
 TCCAATTAAGTACGATATAAAATCTATTTTCCAATGTATTTCTTCCCTACCCTTCATGC

 phoPN1 (*Bam*HI)

1 TTGGTAAAAATCTTGTAGTTGATGATGAAGCTTCTATTGTTACCTTGCTACAATTTAAT 60
 -----+-----+-----+-----+
 AACCATTTTTAAGAACATCAACTACTACTTCGAAGATAACAATGGAACGATGTTAAATTA

61 ATTGAAAAGCAGGATTTGAAGTGGTGACAGCTGAAGATGGTAGAACTGGGTATGAGCTC 120
 -----+-----+-----+-----+
 TAACTTTTTCGTCTAAACTTCACCACGTGTCGACTTCTACCATCTTGACCCATACTCGAG

121 GCTTTGTCCGAAAAGCCAGATTTAATTGTGCTTGATTTAATGCTTCCTGAGATGGACGGA 180
 -----+-----+-----+-----+
 CGAAACAGGCCTTTTCGGTCTAAATTAACACGAACATAATTACGAAGGACTCTACCTGCCT

181 ATCGAAGTAACAAAAAACCTTCGTCAAGATAAAGTAAATGTACCAATTTTAATGTTAACA 240
 -----+-----+-----+-----+
 TAGCTTCATTGTTTTTTTTGAAGCAGTTCATTTTCAATTTACATGGTTAAAATTACAATTGT

241 GCAAAAGATGAAGAGTTAGATAAAAATTATTGGACTTGAACCTGGAGCAGATGATTATATG 300
 -----+-----+-----+-----+
 CGTTTTCTACTTCTCAATCTATTTTAATAACCTGAACCTGAACCTCGTCTACTAATATAC

301 ACTAAGCCTTTTAGTCCAAGAGAAGTAGTGGCGAGAATTAAGCTATCCTGCGTCAACA 360
 -----+-----+-----+-----+
 TGATTCGAAAATCAGGTTCTCTTCATCACCGCTCTTAATTTTCGATAGGACGCAGCTTGT

361 GAAGGAAAAGCAGAAATAATAGAAGAATTAACCGAAGATGTGGAAGCCACTATATTAATT 420
 -----+-----+-----+-----+
 CTTCCTTTTCGTCTTTATTATCTTCTTAATTGGCTTCTACACCTTCGGTGATATAATTA

421 GGTGATTTGAAAATTTGCCAGATAGTTACGAAGTGTATTTACAAGATGATTTACTTGAC 480
 -----+-----+-----+-----+
 CCACTAACTTTTTAAAACGGTCTATCAATGCTTCACATAAATGTTCTACTAAATGAACTG

```

CTAACACCGAAAGAATTTGAGTTATTATTATTCTTGGCGAATCATCGTGGCAAAGTTTTC
481 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 540
GATTGTGGCTTTTCTTAAACTCAATAATAATAAGGACCGCTTAGTAGCACCGTTTCAAAG

TCTAGAGACCAATTGCTCGATACTGTCTGGAACATGATTACGTTGGCGAAAACCGAATT
541 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 600
AGATCTCTGGTTAACGAGCTATGACAGACCTTGATACTAATGCAACCGCTTGGGCTTAA

GTAGACGTTTCATGTTAGCCATTTGCGCGATAAAAATCGAACTAGATACGAAACAACCTAAA
601 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 660
CATCTGCAAGTACAATCGGTAAACGCGCTATTTTAGCTTGATCTATGCTTTGTTGGATTT

AATATATCAAAACAATTCGTGGCTTCGGTTATAAAAATGGAGAACGTAAAAATAATGAAGAA
661 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 720
TTATATAGTTTTGTTAAGCACCGAAGCCAATATTTTACCTCTTGCATTTTATTACTTCTT

ATTATGGCTGAAAATCGGGTTATCCTTTTTTATCTTATTTTTCGTTGTGATGGTTATTGT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TAATACCGACTTTTAGCCCAATAGGAAAAAATAGAATAAAAAGCAACACTACCAATAACA

TGGGATTTTTTCCGGGGAACATAATGAAATCAACGTAATAAATATGAAAGAAAATCAATT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
ACCCTAAAAAAGGCCCTTGATTACTTTAGTTGCATGAATTTATACTTTCTTTTAGTTAA

TTAGAAGATGACGCAAAAATTCTGCTTCAAACAATAATATGGAGAATTTAGATTTAGAT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
AATCTTCTACTGCGTTTTTAAAGACGAAGTTTGTGATTATACCTCTTAAATCTAAATCTA

AAAGATGCCGCAACTATCCAAAAAAGTCTTGATCCACTCGGCGAGGACATTGATGCACGC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TTTCTACGGCGTTGATAGTTTTTTTTCAGAACTAGGTGAGCCGCTCCTGTAACACTACGTGCG

ATTACGGTGATTGATAGCAAAGGCGACGTGGTAGCTGATACAAAAAAGACCCGGAAAAA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TAATGCCACTAACTATCGTTTTCCGCTGCACCATCGACTATGTTTTTTTCTGGGCCTTTTT

CTTGATAACCATATGAATCGGCCCGAAGTAACAGATATTCTGAAAAAAGGGGAAAGCGTT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GAACTATTGGTATACTTAGCCGGGCTTCATTGTCTATAAGACTTTTTTCCCTTTCGCAA

GGTATTTCAATCCGTGAAAGTGATTCACTTGGTTA
-----+-----+-----+-----+-----+
CCATAAAGTTAGGCACTTTCACTAAGTGAACCAAT

```

phoPC3 (*KpnI*)

phoPC4 (*EcoRI*)

degU

```

AATAATGATCCAACATAAGGAACCTCCATAAGTTGATGCA
-----+-----+-----+-----+-----+
TTATTACTAGGTTGTATTCTTGGAGGTATTCAACTACGT

TTTAGTCTGCTTTTATTTTATCCGAAAGCAAAGCGATTGTATAGATATTTTCTAAGTGC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+
AAATCAGACGAAAATAAAATAGGCTTTTCGTTTCGCTAACATATCTATAAAAAGATTACAG

AGTGGATGAAGTGACGGCAAATTCGTGTTATAATAAAAACTACTATTACTTTAGACTAGT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TCACCTACTTCACTGCCGTTTAAAGCACAATATTATTTTTGATGATAATGAAATCTGATCA

TTTTCAATTACATTTTATAGGCATATAGGAGTAATTTTCTTGGGCTATGCAGTATAATCA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+
AAAGTTAATGTAATAATATCCGTATATCCTCATTAAAAGAACCCGATACGTCATATTAGTT

```

degUN1 (*BamHI*)

```

AGGTATAGTTTGTGTTGGAAATAGGTAAGTTTGAGTAAATAGTACTTAAAAGAGAAATGT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TCCATATCAAACACAACCTTTATCCATTCAAACTCATTATCATGAATTTTCTCTTTACA

TTAATTGCCAATTTTATGGCAGGGATTATAAGGTTAAGCGGTTTTGCTACTTAAAAAGGA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
AATTAACGGTTAAAAATACCGTCCCTAATATTCCAATTCGCCAAAACGATGAATTTTCTCT

GATGTTTTTCGATTGCAAAGAGGCTTGGTGAATTAGATAAGTGAAGGAGGAGTAGTCATT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CTACAAAAGCTAACGTTTCTCCGAACCACTTTAATCTATTCACTTCCTCCTCATCAGTAA
                                     ← degUN2 (KpnI)

ATGGCACTCAAATCATGATTGTAGATGATCATCAGTTGTTTTCGCGAAGGTATCAAGCGA
1 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
TACCGT GAGTTTTAGTACTAACATCTACTAGTAGTCAACAAAGCGCTTCCATAGTTGCT

ATTTTAGAGTTGGAAGATTCTTTTGAGGTCGTAGCGGAAGCTGAAAATGGTAAAAATATC
61 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 120
TAAAACTCAACCTTCTAAGAAAACCTCAGCATCGCCTTCGACTTTTACCATTTTTATAG

GTAGCAAAGTTCGCGAATATAAACCAGATATTGTTTTAATGGATATTAATATGCCAACT
121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 180
CATCGTTTTCAAGCGCTTATATTTGGTCTATAACAAAATTACCTATAATTATACGGTTGA

GTGAACGGACTAGATGCAACTGAAATGCTAGTACGTCAATTTCTAGCATCAAAGTAATC
181 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 240
CACTTGCCCTGATCTACGTTGACTTTACGATCATGCAGTTAAAGGATCGTAGTTTCATTAG

GTCTTGACTATTCATGATACAGATGAATATGTAACAGAAGCACCTTAGAGCTGGAGCAGTC
241 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 300
CAGAACTGATAAGTACTATGTCTACTTATACATTTGCTTTCGTGAATCTCGACCTCGTCAG

GGCTATTTATTTAAAAGAAATGGATGCTCATGAACTTGTAGAAGCTGTAAAAATTGTTGAT
301 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 360
CCGATAAAATAATTTTCTTTACCTACGAGTACTTGAACATCTTCGACATTTTAAACAACTA

AATGGAGGCGGTATATTCATCCACGTGTAGCAATTAATTAATTCGTGAATACCGCCAT
361 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 420
TTACCTCCGCGCATATAAGTAGGTGCACATCGTTAATTTAATTAAGCACTTATGGCGGTA

TTAGCAAGCACTAACACTTCTCAAGGTGTTTATGGCTACCAACAACCAGAAGTCAAATG
421 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 480
AATCGTTTCGTGATTGTGAAGAGTTCCACAAATACCGATGGTTGTTGGTCTTCAGTTTTAC

CCACTACACATCTTAACGCATAGAGAGTGCGAGGTATTGCAACTTCTTACCGATGGAAAA
481 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 540
GGTGATGTGTAGAATTGCGTATCTCTCACGCTCCATAACGTTGAAGAATGGCTACCTTTT

AGTAACCGCGAATTGGGGAGACACTTTTCATTAGTGAAAAACAGTAAAAAACCATGTA
541 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 600
TCATTGGCGCCTTAACCCCTCTGTGAAAAGTAATCACTTTTTTGTCATTTTTGGTACAT
                                     degUC1 (KpnI)

AGTAGTATTTTACAAAAAATGAAAGTGAATGATAGAACTCAAGCGGTGGTAACGGCAATC
601 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 660
TCATCATAAAATGTTTTTACTTTCACTTACTATCTTGAGTTCGCCACCATTGCCGTTAG
AAGCACGGCTGGGTATACATTGCTAAAGAAATCTCAGGGGGACTATATGAACGAAAAAA
661 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TTCGTGCCGACCCATATGTAAGCGATTCTTTAGAGTCCCCCTGATATACTTGCTTTTTT

```

```

TAGCAGTGGTTACTGACAGCACAACTTATTTGCCAGACGAAGTGAAAGAGCAGCTACGAA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
ATCGTCACCAATGACTGTCTGTTGAATAAACGGTCTGCTTCACTTTCTCGTTCGATGCTT

TCAATGTCGTGCCACTTTCTGTAATAATTGATGGGAAATCTTATCGTGAAGGTGAGGAAC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
AGTTACAGCACGGTGAAGACATTATTAACCTTTAGAAATAGCACTTCCACTCCTTG

TGTCTGCAACCGATTTTTATCGAAAAGTAAAAGAAGCTGAGAATTTCCCAACTTCCTCTC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
ACAGACGTTGGCTAAAAATAGCTTTTCATTTTCTTCGACTCTTAAAGGGTTGAAGGAGAG
                                     ←
AACCTGCCCCAGGAGAATTCATTCACTTGTTTTGAAAACCTGAAAAGAACAAGGTTTTGATA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TTGGACGGGTCTCTTAAAGTAAAGTGAACAACTTTTGGACTTTCTTGTTCAAAATAT
TTGGACGGGTCTCTTAA
    degUC2 (EcoRI)
TGTAATTAGTATTCATCTATCAAGTGGTATTAGTGAACGTTTCAGAATGCGGCTTCAGC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
ACATTAATCATAAGTAGATAGTTTACCATAATCACCTTGCAAAGTCTTACGCCGAAGTCG

CTGGAGAACTGATTGAAGGGCTAAATGTAGTCGCTTATGATTCTGAGCTTTCTTGTATGG
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GACCTCTTGACTAACTTCCCGATTTACATCAGCGAATACTAAGACTCGAAAGAACATACC

CGCAAGG
-----
GCGTTCC
    
```

Imo2583

```

                                     2583N1 (BamHI) →
CAA AAT TCT GCT AC A T T T C A T C A A A C T G G T G G T G T G C A T A
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
G T T T T A A G A C G A T G T A A A G T A G T T T G A C C A C C A C G T A T

ATGCGGCACTATGTAGTTCAGCGGAAATAATATACAGCAGGATGGACATAGGTCCGCATA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TACGCCGTGATACATCAAGTCGCCTTTATTATATGTCTGCTTACCTGTATCCAGCGGTAT

ATGCCTTAGATAAAAATATATGGTCGCGCCTTGCAAGACGGGACATCTACTGAAGATAAGG
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TACGGAATCTATTTTATATACCAGCGCGGAACGTTCTGCCCTGTAGATGACTTCTATTCC

CAATTATTTTTAGTGGGCGCATTTCTTCGGAAATCCTCGTTAAAAACAGCAAAACTAGGTT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GTTAATAAAAATCACCCGCGTAAAGAAGCCTTTAGGAGCAATTTTGTCTGTTTTGATCCAA

GCGGAATTATTTTGTCTCGTTCTGCCCCAACCGAACTGGCGATTAATATGGCCGAAGAGT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CGCCTTAATAAAAACAGAGCAAGACGGGGTTGGCTTGACCGCTAATTATACCGGCTTCTCA

TAAATATTACAACAGTTGGCTTTATCCGGGGCGATAGGTTAAATGTCTATTCCGGATTTG
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
ATTTATAATGTTGTCAACCGAAATAGGCCCGCTATCCAATTTACAGATAAGGCCTAAAC

AACGAATCACGTAAGTTTGATATGATGCAGTAAAATAAGACGGTAAGGTGAGCGGTGAAA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TTGCTTAGTGCAATCAAACATACTACGTCATTTTATTCTGCCATTCCACTCGCCACTTT
                                     ←
                                     2583N2 (KpnI)
    
```

1 ATGAAACAAATATTAGTAGTAGATGATGATCGGCATATACTTAACTTGTGGGCCACTAT 60
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TACTTTGTTTATAATCATCATCTACTACTAGCCGTATATGAATTTGAACACCCGGTGATA
 61 TTGCGTGCAGAAGGCTTCCATGTACTTGAGGCAAGTGATGGGGTAGAAGCAGAAAAAATA 120
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 AACGCACGCTTCCGAAGGTACATGAAC TCCGTTCACTACCCCATCTTCGTCTTTTTTAT
 121 GTTGAACAGAGCAAGTTCATTTAGCTGTAATTGATGTGATGATGCCTAACATGGATGGT 180
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 CAACTTTGTCTCGTTCAAGTAAATCGACATTA ACTACTACTACGGATTGTACCTACCA
 181 TTTGAACTTTGCCAAAAAATGCGCGCAAGTTATCCTGATATCCCTGTTATTATGTTGACA 240
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 AACTTGAAACGGTTTTTTTACGCGCGTTCAATAGGACTATAGGGACAATAATACTGT
 241 GCTAAAGATGCGCTGGCGGATAAATCACGCGGTTTTGAAGTGGGCACAGATGATTATGTC 300
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 CGATTTCTACGCGACCGCCTATTTAGTGCGCCAAAAC TCCACCCGTGTCTACTAATACAG
 301 ACAAACCCTTTGAACCAGAAGAGCTGATCTTTCGAATTCGTGCGTTGCTACGGCGTTCC 360
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 TGTTTTGGGAAACTTGGTCTTCTCGACTAGAAAGCTTAAGCACGCAACGATGCCGCAAGG
 361 AATCAAGCAAGCGAAGTCAAAATCAACATCGGAAACATTACTATCGATCAAAAAAGCTAC 420
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 TTAGTTCGTTTCGTTTCAGTTTTAGTTGTAGCCTTTGTAATGATAGCTAGTTTTTTTCGATG
 421 GGCATAAAAAATTGGCAACCAAGAACGAATGATCCCCTGAAAGAATTTGAGCTTTTATAT 480
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 CCGTATTTTTAACC GTTGGTTCCTTGCTTACTAAGGGCACTTTCTTAAACTCGAAAATATA
 481 CAGCTAGCAAGCTATCCTGGCCGGATTTTTACTCGAGAAGAATTAATTGAGCGGATTTGG 540
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 GTCGATCGTTTCGATAGGACCGGCC TAAAAATGAGCTCTTCTTAATTAACTCGCCTAAACC
 541 CAACGTGATTATGATGGTAGTGACCGGACAGTGGATGTACATATTAACGTTTGC GTGAC 600
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 GTTGCAC TAATACTACCATCACTGGCCTGTCACTACATGTATAATTTGCAAACGCACTG
 601 CATTTTGATGAAGAAAAGGATGGTATTCGAATTTGTTACGGTGC GCGGCGTTCGTTATAAA 660
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 GTAAACTACTTCTTTTCTACCATAAGCTTAACAATGCCACGCGCCG CAGCCAATATTT
 661 TTGGAGGAGACA AGATGAAATCGTTATACAGTCGAATAGTTGTCACGATGCTTGTCTGTTA
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 AACCTCCTCTGTTCTACTTTAGCAATATGTCAGCTTATCAACAGTGCTACGAACAGCAAT
 TCATCCTTTCCAGTAGTTTGCTCGGCTTTTTCTTTGCAAACATTTATTACCAAATAAAAT
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 AGTAGGAAAGGTCATCAAACGAGCCGAAAAAGAAACGTTTGTAATAATGGTTTATTTTA
 TAAAAC TTTTTAACGACGAAAAAACAGCCAAAATAGCGAAGGAAGTCCAACAATTTTACG
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 ATTTTGAAAAATTGCTGCTTTTTTGTGCGTTTTTATCGCTTCCTTCAGGTTGTTAAAATGC
 AGTCAAATGCTACGATTTCTTTAAATGAGTACTTGGAATGTGGGCGA ACTGGGATATG
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 TCAGTTTACGATGCTAAAGAAATTTACTCATGAACCTTTTACACCCGCTTGACCCTATAC

2583C1 (KpnI)



```

AATTATATTTGACAGATGGCGCGGAAAAATCCACTTATTTTGGTGGTGCTTTTCGAAAAA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TTAATATAAACTGTCTACCGCGCCTTTTTAGGTGAATAAAAACCACCACGAAAAAGCTTTTT

AAGATTTACCAGATAAGACAATCAAGCAAGTACTAGACGGAGATACTTATCATGGAATTG
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TTCTAAATGGTCTATTCTGTTAGTTCGTTTCATGATCTGCCTCTATGAATAGTACCTTAAC

ACTCATTTCGATACAGGCATTTTTCATCACAGGCTTTTTTTGATAATGATGTGCGAAATACC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TGAGTAAGCTATGTCCGTAAAAGTAGTGTCCGAAAAAACTATTACTACACGCTTTTATGG
                                     ←
                                     2583C2 (EcoRI)
    
```

kdpE

```

GAGACCGAACTATTCACGTGAAAAGTTCCGCGTGATCTTTTT
-----+-----+-----+-----+-----+
CTCTGGCTTGATAAGTGCACCTTTCAAGGCGCACTAGAAAA

GATGGTTCGGATGGATGGGACACTGATTGAGCAAGTGTATTAAATTTAATGGAAAAATGC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CTACCAAGGCTACCTACCCTGTGACTAACTCGTTCACGAATAATTAATTTACCTTTTACG

GCTACGTCACGGTGGAACTGGTGCAGAAGTTTGGGTAGACGTGACGAAAACGAAACAAAG
-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CGATGCAGTGCCACCTTGACCACGTCTTCAAACCCATCTGCACTGCTTTTGCTTTGTTTC

                                     2678N1 (BamHI)
                                     →
TGCGATTTTCAGTGTACGCGATAATGGAAAAGGAATTCCGGAAAATCGTTTGGCAGATTT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+
ACGCTAAAAGTCACATGCGCTATTACCTTTTCTTAAGGCCTTTTAGCAAACCGTCTAAA

ATTTGATACTTTTTCGGTAGAGGCAAGAGAACGCTCAGACATGTCCCGTGGCTTGGGGCT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TAAACTATGAAAACGCCATCTCCGTTCTCTTGGAGTCTGTACAGGGCACCGAACCCCGA

TGGCTTATCGATTTGTATGTCGATTATTCGGGCACACGACGGAACCTTTGGAAGCAAAAAA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+
ACCGAATAGCTAAACATACAGCTAATAAGCCCGTGTGCTGCCTTGAAACCTTCGTTTTTT

TAACAAACATGGTGGGGCGACATTCTGGTTCACCTTTGCCACTAGACGGAGGAGATGGAAA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+
ATTGTTTGTACCACCCCGCTGTAAGACCAAGTGAACGGTGATCTGCCTCCTCTACCTTT

ATGAACAGCAAGCGCTTGTGCTAATTGTGGAAGATGAAGATGGCATCAGTAATTTTATT
1 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
TACTTGTGCTTCGCCGAACACGATTAACACCTTCTACTTCTACCGTAGTCATTAATAA
                                     ←
                                     2678N2 (KpnI)
TCGGCTGTTTTGACGGCGAGCGATTACTCGGTAATTAAGCAGTGAATGGAAAAGAAGCG
61 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 120
AGCCGACAAAACCTGCCGCTCGCTAATGAGCCATTAATTTTCGTCACTTACCTTTTCTTCGC

CTAGAACAGACGGCTAGCCATTGCGCCGATGTAGTGTGCTTGACCTTGGTTTGCCAGAT
121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 180
GATCTTGTCTGCCGATCGGTAAGCGGCCTACATCACAACGAACTGGAACCAAACGGTCTA

TATGGAAGGACTAGACGTGCTTCGGGATATTTCGTGTTTGGTCAAAAAGTGCCGATTATTGT
181 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 240
ATACCTTCTGATCTGCACGAAGCCCTATAAGCACAAACCAGTTTTTCACGGCTAATAACA
    
```

TGTATCCGCGCGGGATCACGAACGGGAAAAAGTAAC TGC GCTTGATCTTGGCGCAGATGA
 241 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 300
 ACATAGGCGCGCCCTAGTGCTTGCCCTTTTTTCATTGACGCGAACTAGAACCGCGTCTACT

 TTATATTACGAAACCATTCGGCACATCGGAACTCCTCGCGCGTATTGAAACAGCGCTACG
 301 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 360
 AATATAATGCTTTGGTAAGCCGTGTAGCCTTGAGGAGCGCGCATAAGCTTGTTCGCGATGC

 ACACATTCAGCCAAGCAGTAAAGAATCGCCAAATGACCATATTATTTCGATTCAAGACCT
 361 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 420
 TGTGTAAGTCGGTTCGTCATTTCTTAGCGGTTTACTGGTATAATAAGCGTAAGTTCTGGA

 GTATATTGATGACGACCGCCGACTTGTCAAATGGACGATACGGAAATCCATTTTACGCC
 421 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 480
 CATATAACTACTGCTGGCGGCTGAACAGTTTTACCTGCTATGCCTTTAGGTAAAATGCGG

 GATTGAATATAAAATTTTACTCCTGTTAGCTCGCCACGCTGGAAAAGTCCTTACACATGA
 481 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 540
 CTAAC TTATATTTTAAAATGAGGACAATCGAGCGGTGCGACCTTTTCAGGAATGTGTACT

 CTTTATTATTTCGAGAAATTTGGGGGCCTTATCCAAGTGAAAATCAAGCGCTTCGAGTCAA
 541 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 600
 GAAATAATAAGCTCTTTAAACCCCGGAATAGGTTCACTTTTAGTTTCGCGAAGCTCAGTT

 TATGAGTAACATCCGACGTAAAATTGAAAAAATCCGGCAGAACCTGCATACATTTTGAC
 601 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 660
 ATACTCATTGTAGGCTGCATTTTAAC TTTTTTTTAGGCCGCTTTGGACGTATGTAAAAC TG

 AGAAGTTGGGGTTGGATACCGGATGGCAGAAGAA TAATAATATGTTATGATAAAAAATAAA
 661 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 TCTTCAACCCCAACCTATGGCCTACCGTCTTCTTATTATTATACAATACTATTTTTATTT

 CGCCAGGAGGAATTAATATGCATAAAACAATCCGTAGCGTAGACGTTTATTATGAAAAAT
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 GCGGTCTCTCTTAATTATACGTATTTTGT TAGGCATCGCATCTGCAAATAACTTTTTTA

 ATGGTGAAGGAATACCGATAATAATGATTCATGGCTTTGCTCCTGATTTCGACGCTGATGA
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 TACCACTTCTTATGGCTATTATTACTAAGTACCGAAACGAGGACTAAGCGTCGACTACT

 TTGGTTGTATGGAGCCAGTCTTTGATAAGGAAAGCTCGTTCTCACGCATATATTTGGATT
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 AACCAACATACCTCGGTCAGAAACTATTCTTTTCGAGCAAGAGTGCGTATATAAACCTAA

 TGCTTGGAAATGGGAAAAACCGAGAATTACGACTCAATTCAAAATGCTGACCATGTACTCA
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 ACGGACCTTACCCTTTTTGGCTCTTAATGCTGAGTTAAGTTTTACGACTGGTACATGAGT

 CGCTTTTACTAGAATTTATTGAAGCGTAATTCGGGCGAGCAATTTG TACTCGCTGGAG
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 GCGAAAATGATCTTAAATAACTTCGCCATTAAGGCCCGCTCGTTAAACATGAGCGACCTC

 AATCGTATGGTGGCTATTTAACTCGCGGAATCGCGGCGAAAATGCCAGATAGAGTACTCG
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 TTAGCATACCACCGATAAATTGAGCGCCTTAGCGCCGCTTTTACGGTCTATCT CATGAGC
 GAGTCTTGCTTATTTGT
 -----+-----+-----
CTCAGAACGAATAACA

2678C2 (EcoRI)

8.2 Tabellarische Darstellung der bei 24° C durch DegU regulierten Gene

Vollständige Liste der in *L. monocytogenes* EGD und *L. monocytogenes* $\Delta degU$ bei 24° C unterschiedlich exprimierten Gene. Die Gene wurden nach funktionellen Kategorien geordnet. Gen mit Expressionswerten > 2,0 gelten als stärker, Gene mit Expressionswerten < 0,5 als schwächer exprimiert. Expressionswerte zwischen diesen Ausschluß-Grenzen werden als nichtreguliert angesehen. Bei den in fetter Schrift betonten Proteinen bzw. Genen handelt es sich um die, deren Transkription auf Proteinebene als DegU-reguliert identifiziert wurde.

Name	Gen ID	Funktion	Klassifizierung	$\frac{\emptyset}{WT/\Delta degU}$
Lmo0540	<i>lmo0540</i>	Unbekannt, homolog zu Penicillinbindungs Protein	Zellwandprotein	7,88
Lmo1216	<i>lmo1216</i>	Unbekannt, homolog zur N-Acetylmuramoyl-L-Alanin Amidase	Zellwandprotein	2,89
Lmo0428	<i>lmo0428</i>	Unbekannt, homolog zur PTS Fruktose-spezifischen Enzymkomponente IIC	Transport/Bindungsproteine und Lipoproteine	2,35
Lmo0782	<i>lmo0782</i>	Unbekannt, homolog zur Mannose-spezifischen PTS-Komponente IIC	Transport/Bindungsproteine und Lipoproteine	1,95
Lmo0783	<i>lmo0783</i>	Unbekannt, homolog zur Mannose-spezifischen PTS-Komponente IIB	Transport/Bindungsproteine und Lipoproteine	1,83
Lmo0784	<i>lmo0784</i>	Unbekannt, homolog zur Mannose-spezifischen PTS-Komponente IIA	Transport/Bindungsproteine und Lipoproteine	2,26
Lmo1516	<i>lmo1516</i>	Unbekannt, homolog zum Ammoniumtransporter NrgA	Transport/Bindungsproteine und Lipoproteine	0,46
Lmo2683	<i>lmo2683</i>	Unbekannt, homolog zur Cellobiose Phosphotransferasekomponente IIB	Transport/Bindungsproteine und Lipoproteine	2,31
Lmo0180	<i>lmo0180</i>	Unbekannt, homolog zum Zucker-ABC-Transporter, Permease-Protein	Transport/Bindungsproteine und Lipoproteine	1,84
Lmo2000	<i>lmo2000</i>	Unbekannt, homolog zur PTS mannosenspezifischen Enzymkomponente IID	Transport/Bindungsproteine und Lipoproteine	2,43
Lmo2666	<i>lmo2666</i>	Unbekannt, homolog zur PTS galaktitolspezifischen Enzymkomponente IIB	Transport/Bindungsproteine und Lipoproteine	1,89
CydB	<i>lmo2717</i>	Unbekannt, stark homolog zur Cytochrom D Ubichinoloxidase Untereinheit II	Membranbioenergetik (Elektronentransportkette und ATP-Synthase)	2,01
CydA	<i>lmo2718</i>	Unbekannt, stark homolog zur Cytochrom D Ubichinoloxidase Untereinheit II	Membranbioenergetik (Elektronentransportkette und ATP-Synthase)	2,22
Lmo0685	<i>lmo0685</i>	Unbekannt, homolog zum Flagellenmotorprotein MotA	Motilität und Chemotaxis	22,07
MotB	<i>lmo0686</i>	Unbekannt, homolog zu Flagellenmotorprotein MotB	Motilität und Chemotaxis	4,46
CheY	<i>lmo0691</i>	Chemotaxis Response Regulator	Regulation	4,53
CheA	<i>lmo0692</i>	Zweikomponentensystem Histidin	Sensor (Signal-)	26,47

Lmo0696	<i>lmo0696</i>	Kinase CheA Unbekannt, homolog zu Flagellenhakenprotein	transduktion) Motilität und Chemotaxis	19,43
Lmo0697	<i>lmo0697</i>	Unbekannt, homolog zu Flagellenhakenprotein FlgE	Motilität und Chemotaxis	15,29
Lmo0698	<i>lmo0698</i>	Unbekannt, schwach homolog zu Flagellenschalterprotein	Motilität und Chemotaxis	21,83
Lmo0699	<i>lmo0699</i>	Unbekannt, homolog zum Flagellenschalterprotein FliM	Motilität und Chemotaxis	19,78
Lmo0700	<i>lmo0700</i>	Unbekannt, homolog zum Flagellen Motorschalterprotein FliY	Motilität und Chemotaxis	19,82
Lmo0705	<i>lmo0705</i>	Unbekannt, homolog zum flagel- lenassoziiertem Protein FlgK	Motilität und Chemotaxis	10,73
Lmo0706	<i>lmo0706</i>	Unbekannt, homolog zum flagel- lenassoziiertem Protein 3 FlgL	Motilität und Chemotaxis	16,30
Lmo0707	<i>lmo0707</i>	Unbekannt, homolog zum flagel- lenassoziiertem Protein 2 FliD	Motilität und Chemotaxis	16,19
Lmo0708	<i>lmo0708</i>	Unbekannt, homolog zu hypothe- tischem Protein	Motilität und Chemotaxis	17,46
Lmo0710	<i>lmo0710</i>	Unbekannt, homolog zum Flagellen Basalkörperprotein FlgB	Motilität und Chemotaxis	15,86
Lmo0711	<i>lmo0711</i>	Unbekannt, homolog zum Flagellen Basalkörperprotein FlgC	Motilität und Chemotaxis	9,22
Lmo0712	<i>lmo0712</i>	Unbekannt, homolog zum Flagel- lenhaken-Körperkomplexprotein FliE	Motilität und Chemotaxis	9,93
Lmo0713	<i>lmo0713</i>	Unbekannt, homolog zum Flagellen-Basalkörper M-Ring- Protein FliF	Motilität und Chemotaxis	15,57
Lmo0714	<i>lmo0714</i>	Unbekannt, homolog zum Flagel- lenmotorschalterprotein FliG	Motilität und Chemotaxis	8,84
Lmo0716	<i>lmo0716</i>	Unbekannt, homolog zur H ⁺ - transportierenden ATP-Synthase- Alphakette FliL, flagellenspezi- fisch	Motilität und Chemotaxis	8,81
Lmo1699	<i>lmo1699</i>	Unbekannt, einige Homologien zu methylakzeptierendem Chemo- taxisprotein	Motilität und Chemotaxis	8,62
Lmo0676	<i>lmo0676</i>	Unbekannt, homolog zum Flagel- lenbiosyntheseprotein FliP	Motilität und Chemotaxis	7,16
Lmo0677	<i>lmo0677</i>	Unbekannt, homolog zum Flagel- lenbiosyntheseprotein FliQ	Motilität und Chemotaxis	14,60
Lmo0678	<i>lmo0678</i>	Unbekannt, homolog zum Flagel- lenbiosyntheseprotein FliR	Motilität und Chemotaxis	16,63
Lmo0679	<i>lmo0679</i>	Unbekannt, homolog zum Flagel- lenbiosyntheseprotein FlhA	Motilität und Chemotaxis	26,47
Lmo0680	<i>lmo0680</i>	Unbekannt, homolog zum flagel- lenassoziierten Protein FlhA	Motilität und Chemotaxis	19,24
Lmo0681	<i>lmo0681</i>	Unbekannt, homolog zum Flagel- lenbiosyntheseprotein FlhF	Motilität und Chemotaxis	13,35
Lmo0682	<i>lmo0682</i>	Unbekannt, homolog zum Flagel- lenhaken-Basalkörperprotein FlgG	Motilität und Chemotaxis	12,87
Lmo0683	<i>lmo0683</i>	Unbekannt, homolog zur chemo- taktischen Methyltransferase CheR	Motilität und Chemotaxis	10,43
Lmo0689	<i>lmo0689</i>	Unbekannt, homolog zum CheA- aktivitätsregulierenden Protein CheV	Motilität und Chemotaxis	13,93
FlaA	<i>lmo0690</i>	Flagellin	Motilität und Chemotaxis	96,50

Lmo0693	<i>lmo0693</i>	Unbekannt, homolog zum Flagel- lenschalterprotein FliY, C- terminaler Teil	Motilität und Chemotaxis	16,55
Lmo0723	<i>lmo0723</i>	Unbekannt, homolog zu Methyl- akzeptierendem Protein	Motilität und Chemotaxis	14,15
Lmo0514	<i>lmo0514</i>	Unbekannt, homolog zu Internalin; putatives Peptidoglykan- gebundenes Protein (LPXTG)	Oberflächenprotein	0,20
Lmo0701	<i>lmo0701</i>	Unbekannt	Oberflächenprotein	11,74
Lmo0182	<i>lmo0182</i>	Unbekannt, homolog zur α - Xylosidase und α -Glukosidase	Spezifischer Stoffwechsel (KH und verwandte Moleküle)	2,12
Lmo0415	<i>lmo0415</i>	Unbekannt, homolog zur Endo- 1,4- β -Xylanase	Spezifischer Stoff- wechsel (KH und verwandte Moleküle)	7,16
Lmo0811	<i>lmo0811</i>	Unbekannt, homolog zur carbonischen Anhydrase	Spezifischer Stoff- wechsel (KH und verwandte Moleküle)	0,45
Lmo1254	<i>lmo1254</i>	Unbekannt, homolog zur α , α - Phosphotrelalase	Spezifischer Stoff- wechsel (KH und verwandte Moleküle)	2,38
Lmo1998	<i>lmo1998</i>	Unbekannt, homolog zum Optin Stoffwechselprotein	Spezifischer Stoffwechsel (KH und verwandte Moleküle)	1,88
Lmo1999	<i>lmo1999</i>	Unbekannt, schwach homolog zur Glukosamin-Fruktose-6-Phosphat Aminotransferase	Spezifischer Stoff- wechsel (KH und verwandte Moleküle)	2,74
Lmo2467	<i>lmo2467</i>	Unbekannt, homolog zur Chitin- ase und zum Chitin-Bindungs- protein	Spezifischer Stoff- wechsel (KH und verwandte Moleküle)	0,29
Lmo2663	<i>lmo2663</i>	Unbekannt, homolog zur Polyol- Dehydrogenase	Spezifischer Stoff- wechsel (KH und verwandte Moleküle)	2,12
Lmo1494	<i>lmo1494</i>	homolog zur 5-Methylthio- adenosin/S-Adenosylhomocystein Nukleosidase	Stoffwechsel der Nukleotide und Nukleinsäuren	3,92
Lmo0032	<i>lmo0032</i>	Unbekannt, homolog zum Xyloserepressor	Regulation	3,68
Lmo0651	<i>lmo0651</i>	Unbekannt, homolog zu Transkriptionsregulator	Regulation	4,31
RpsO	<i>lmo1330</i>	ribosomales Protein S15	ribosomales Protein	4,53
Lmo0717	<i>lmo1717</i>	Unbekannt, homolog zur Transglykosylase	Phagen-verwandte Funktion	7,83
Lmo2292	<i>lmo2292</i>	Protein Gp11 (Bakteriophage A118)	Phagen-verwandte Funktion	1,99
Lmo2294	<i>lmo2294</i>	Protein GP9 (Bakteriophage A118)	Phagen-verwandte Funktion	1,83
Lmo2296	<i>lmo2296</i>	Unbekannt, homolog zu Hüllprotein (Bakteriophage A118)	Phagen-verwandte Funktion	1,88
Lmo0156	<i>lmo0156</i>	Unbekannt	homolog zu listeriellem Protein unbekannter	1,99

Lmo2806	<i>lmo2806</i>	Unbekannt, hypothetisches sekretiertes Protein	Funktion homolog zu Protein unbekannter Funktion anderer Organismen	0,36
Lmo0511	<i>lmo0511</i>	Unbekannt, konserviertes hypothetisches Protein	homolog zu Protein unbekannter Funktion anderer Organismen	3,97
Lmo0688	<i>lmo0688</i>	Unbekannt, homolog zu unbekanntem Protein	homolog zu Protein unbekannter Funktion anderer Organismen	10,18
Lmo0724	<i>lmo0724</i>	Unbekannt, homolog zum YvpB-Protein von <i>B. subtilis</i>	homolog zu Protein unbekannter Funktion anderer Organismen	32,08
Lmo0964	<i>lmo0964</i>	Unbekannt, homolog zum YjbH-Protein von <i>B. subtilis</i>	homolog zu Protein unbekannter Funktion anderer Organismen	2,22
Lmo0990	<i>lmo0990</i>	Unbekannt, konserviertes hypothetisches Protein	homolog zu Protein unbekannter Funktion anderer Organismen	2,48
Lmo0254	<i>lmo0254</i>	Unbekannt	Unbekannt	2,53
Lmo0675	<i>lmo0675</i>	Unbekannt	Unbekannt	4,21
Lmo0684	<i>lmo0684</i>	Unbekannt	Unbekannt	39,96
Lmo0687	<i>lmo0687</i>	Unbekannt	Unbekannt	20,04
Lmo0694	<i>lmo0694</i>	Unbekannt	Unbekannt	5,66
Lmo0695	<i>lmo0695</i>	Unbekannt	Unbekannt	10,38
Lmo0702	<i>lmo0702</i>	Unbekannt	Unbekannt	18,38
Lmo0703	<i>lmo0703</i>	Unbekannt	Unbekannt	17,87
Lmo0704	<i>lmo0704</i>	Unbekannt	Unbekannt	16,50
Lmo0709	<i>lmo0709</i>	Unbekannt	Unbekannt	17,12
Lmo0715	<i>lmo0715</i>	Unbekannt	Unbekannt	8,11
Lmo0718	<i>lmo0718</i>	Unbekannt	Unbekannt	8,03
Lmo1257	<i>lmo1257</i>	Unbekannt	Unbekannt	2,00
Lmo1700	<i>lmo1700</i>	Unbekannt	Unbekannt	4,12
Lmo2803	<i>lmo2803</i>	Unbekannt	Unbekannt	0,48
DegU	<i>lmo2515</i>	Stark homolog zum <i>B. subtilis</i> Response Regulator DegU	Regulation	5,61
PrfA	<i>lmo0200</i>	Listeriolysin-positives regulatorisches Protein	Regulation	1,05
Hly	<i>lmo0202</i>	Listeriolysin O-Vorläufer	Verschiedene	1,12
Mpl	<i>lmo0203</i>	Zink-Metalloprotease Vorläufer	Stoffwechsel von AS und verwandten Molekülen	1,30
ActA	<i>lmo0204</i>	Aktinpolymerisation induzierender Vorläufer	Oberflächenprotein	1,07
PlcB	<i>lmo0205</i>	Phospholipase C	Fettstoffwechsel	0,98
InlA	<i>lmo0433</i>	Internalin A	Oberflächenprotein	1,5
InlB	<i>lmo0434</i>	Internalin B	Oberflächenprotein	1,57

Tab. 11: Vollständige Liste der bei 24°C durch DegU regulierten Gene von *L. monocytogenes* EGD. Gene bzw. deren Transkripte, die auf Proteinebene als DegU-reguliert identifiziert wurden, sind in fetter Schrift betont.

8.3 Abkürzungen

α -	anti- (bei Seren)
° C	Grad Celsius
μ	Mikro-
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxidsulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BHI	"Brain-Heart-Infusion"
BMM Φ	"bone marrow derived macrophages", Knochenmarksmakrophagen
BSA	"bovine serum albumine", Rinderserumalbumin
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
CFU	"colony forming units", Kolonie-bildende Einheiten
ca.	cirka
Ca ²⁺	Calciumionen
cDNA	komplementäre DNA
Cm	Chloramphenicol
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlendioxid
C-Terminus	Carboxylterminus
d	desoxy
DAG	Diacylglycerin
Da	Dalton
d. h.	das heißt
dest.	destilliert
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	"Dulbeco's modified eagle's medium"
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	2'-Desoxynukleosid-5'-triphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
dsDNA	doppelsträngige DNA
DTT	Dithiothreitol
ECL	"enhanced chemoluminescence"
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykol-bis-(β -aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
Em	Erythromycin
Endkonz.	Endkonzentration
EtOH	Ethanol
etc.	und so weiter
evtl.	eventuell
FACS	"Fluorescence activated cell sorter"
F-Aktin	filamentöses Aktin
FCS	"fetal calf serum", fötales Kälberserum
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
g	Gramm
G-Aktin	globuläres Aktin, Monomere
h	Stunde
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-2-ethansulfonsäure

HRP	"horse-radish peroxidase", Meerrettichperoxidase
HTH	helix-turn-helix
IAA	Isoamylalkohol
i. d. R.	in der Regel
IgG	Immunglobulin
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactosid
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
KE	Kletteinheiten
Km	Kanamycin
Konz.	Konzentration
kV	Kilovolt
l	Liter
LB	"Luria-Bertani"
LD ₅₀	letale Dosis für 50 % der Versuchstiere
LPS	Lipopolysaccharid
LRR(s)	"leucine rich repeat(s)"
M	Molar
MAP	"mitogen-activated protein"
mA	Milliamper
MEM	"Minimal Essential Medium"
ml	Milliliter
min	Minute(n)
Mg ²⁺	Magnesiumionen
MOI	"multiplicity of infection"
MS	Massenspektromie
MW	Molekulargewicht
N-Terminus	Aminoterminus
NTP	Nukleosidtriphosphat
OD	optische Dichte
ORF	"open reading frame", offenes Leseraster
ori	Replikationsorigin
p. a.	Reinheitsgrad pro analysis
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	"phosphate-buffered saline", Phosphat-gepufferte Saline
PC	Phosphatidylcholin
PCR	"polymerase chain reaction", Polymerasekettenreaktion
pI	Isoelektrischer Punkt
PLC	Phospholipase C
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
..... ^R	resistent gegenüber...
RNase	Ribonuklease
RPMI	"Roswells park memorial institute" (Medium)
rpm	"rounds per minute", Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
SMHEM	Saccharose/MgCl ₂ /HEPES-Elektroporationsmedium
s. o.	siehe oben

ss	einzelsträngig
SSC	saline/sodium/citrate
s. u.	siehe unten
Sv	Serovariante, Serotyp
T	Thymin/Thymidin
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBS	"tris-buffered saline", Tris-gepufferte Saline
TCA	Trichloressigsäure
TE	Tris/EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
T _M	Schmelztemperatur
U	"Unit", Einheit
u. a.	unter anderem
UE	Untereinheit
u.	und
UV	ultraviolett
ÜN	über Nacht
ÜNK	Übernachtkultur
V	Volt
VASP	"vasodilator-stimulated phosphoprotein"
vgl.	vergleiche
Vol	Volumina
v/v	Volumen/Volumen
W	Watt (Einheit der Leistung)
WT	Wildtyp
X-Gal	5-Chlor-4-brom-3-indoyl-β-D-galactopyranosid
YT-Medium	Hefe-Trypton-Medium
z. B.	zum Beispiel

8.4 Publikationen

Originalarbeiten:

Williams, T., S. Bauer, D. Beier, and M. Kuhn. 2005. Construction and characterization of *Listeria monocytogenes* mutants with in-frame deletions in the response regulator genes identified in the genome sequence. *Infect. Immun.* **73**:3152-3159.

Williams, T., J. Bijou, D. Beier, W. Goebel, and M. Kuhn. Response regulator DegU of *Listeria monocytogenes* regulates the expression of flagella-specific genes. *FEMS Microbiol. Lett.* (submitted).

Poster:

Gareiß, B., S. Gopal, P. Herrmann, T. Williams, D. Beier, M. Kuhn, W. Goebel and J. Kreft. *Listeria* functional genomics II. Kompetenznetz PathoGenoMik: 2. Sitzung des Wissenschaftlichen Beirates. Würzburg, 1. – 2. 12. 2004.

8.5 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Tatjana Denise Williams
 Geburtsdatum: 15. September 1975
 Geburtsort: Werneck
 Staatsangehörigkeit: deutsch
 Familienstand: ledig
 Religion: evangelisch
 Dienstliche Adresse: Lehrstuhl für Mikrobiologie
 Biozentrum, Am Hubland
 97074 Würzburg
 Tel: 0931-888-4412
 Private Adresse: Friedhofstr. 13
 97532 Zell

Schule

09/1981-07/1984 Grundschole Üchtelhausen
 09/1984-06/1995 Olympia-Morata-Gymnasium Schweinfurt
 Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Studium

10/1995-09/2000 Biologie-Studium an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg
 09/2000-07/2001 Diplomandin am Lehrstuhl für Mikrobiologie der Julius-Maximilians-Universität Würzburg.
 Thema der Diplomarbeit:
 "Untersuchungen zur Rolle von ActA-bindenden Proteinen bei einer Infektion mit *Listeria monocytogenes*"

Promotion

07/2001-07/2004 Promotion; wissenschaftliche Angestellte nach Bat IIa/2 am Lehrstuhl für Mikrobiologie der Universität Würzburg im Rahmen des Sonderforschungsbereichs SFB 479 und des Kompetenzzentrums PathoGenoMik bei PD Dr. Michael Kuhn
 08/2004-10/2004 Promotionsstipendiatin des Hochwissenschafts-

programms HWP: "Chancengleichheit für Frauen in
Forschung und Lehre" am Lehrstuhl für
Mikrobiologie der Universität Würzburg

11/2004-heute

Ehrenamtliche Mitarbeiterin am Lehrstuhl für
Mikrobiologie der Universität Würzburg

Beschäftigungsverhältnisse während des Studiums

04/1999-05/1999

Studentische Hilfskraft am Lehrstuhl für Zoologie I
der Universität Würzburg

07/1999-09/1999

Praktikantin bei Bayer im Servicebereich zentrale
Forschung, Ressort Biotechnologie in der Abteilung
Mikrobiologie

03/2000-04/2000

Studentische Hilfskraft am Lehrstuhl für Zoologie I
der Universität Würzburg

07/2000-07/2000

Studentische Hilfskraft der Fakultät für Biologie der
Universität Würzburg

03/2001-04/2001

Studentische Hilfskraft am Lehrstuhl für Zoologie I
der Universität Würzburg

06/2001-07/2001

Studentische Hilfskraft der Fakultät für Biologie der
Universität Würzburg