

**Interaktion des Proteins ActA
von *Listeria monocytogenes*
mit dem Wirtszellprotein LaXp180**

Dissertation

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

vorgelegt von

Thilo Pfeuffer

aus Wollbach/Rhön

Würzburg, 2000

Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender:

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

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

Neben dem akademischen Grad „Diplom-Biologe 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

Der experimentelle Teil dieser Arbeit wurde von November 1996 bis Dezember 1999 am Lehrstuhl für Mikrobiologie (Prof. Dr. W. Goebel) am Theodor-Boveri-Institut für Biowissenschaften der Universität Würzburg durchgeführt.

Vielen Dank ...

an erster Stelle meinem Betreuer Herrn PD Dr. Michael Kuhn für die fachliche Anleitung, die vielen guten Ratschläge, unzählige wissenschaftliche und nicht-wissenschaftliche Diskussionen und ein erstklassiges Arbeitsklima.

Mein Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. Werner Goebel für das interessante Thema und seine vielen Ideen und Anregungen.

Bedanken möchte ich mich weiter bei Prof. Dr. Michael Bachmann und Julia Laubinger vom Institut für Physiologie der Universität Mainz für die gute Kooperation.

Für die bereitwillige Überlassung von Plasmiden, Antisera und gereinigten Proteinen bedanke ich mich recht herzlich bei Prof. Dr. André Sobel, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Paris, Dr. Andreas Kalmes und Dr. Tillman Schuster, Institut für Medizinische Strahlenkunde und Zellforschung, Universität Würzburg, Dr. Fredi Engelbrecht, Dr. Zeljka Sokolovic, Silke Hom, Jochen König und Christian Hüttinger vom Lehrstuhl für Mikrobiologie, Universität Würzburg.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Dr. Claudia Tengel, Dr. Fredi Engelbrecht, Dr. Justin Daniels und nicht zuletzt meinem langjährigen Laborkollegen Dr. Andreas Demuth für ihre freundschaftliche Unterstützung, tausend gute Ratschläge bei experimentellen Problemen und das Korrekturlesen dieser Arbeit. Besonderer Dank gilt auch Lars Greiffenberg für die langjährige Freundschaft während der gesamten Studien- und Promotionszeit und seine Hilfe bei Computerproblemen. Vielen Dank auch an Alexander Erhard für das Korrekturlesen.

Der größte Dank gilt meinen Eltern, die mir durch ihre finanzielle, vor allem aber persönliche Unterstützung mein Studium und diese Arbeit erst ermöglicht haben.

Zusammenfassung

Listeria monocytogenes, ein fakultativ intrazellulärer Krankheitserreger, besitzt die Fähigkeit, Wirtszellen zu penetrieren, sich in ihnen zu vermehren, sich intrazellulär zu bewegen und auch benachbarte Zellen direkt zu infizieren. Die intrazelluläre Fortbewegung erfolgt durch Polymerisation von zellulärem Aktin, wodurch charakteristische Aktinschwefel an einem Pol der Bakterien entstehen.

Der einzige bakterielle Faktor, der für die Aktinpolymerisation notwendig ist, ist das Oberflächenprotein ActA. ActA allein ist aber nicht in der Lage, Aktin zu polymerisieren, sondern kann dies nur in Assoziation mit Proteinen der Wirtszelle. Die einzigen bisher bekannten Wirtszellproteine, die direkt mit ActA interagieren, sind das Phosphoprotein VASP und der Arp2/3-Komplex. VASP bindet an den zentralen prolinreichen Bereich von ActA und beschleunigt durch die Rekrutierung von Profilin den Prozeß der Aktinpolymerisation. Der Arp2/3-Komplex interagiert mit dem N-terminalen Bereich von ActA und initiiert die eigentliche Aktin-Polymerisation.

Um weitere eukaryotische, mit ActA interagierende Proteine (AIPs) zu isolieren, wurde über einen „Yeast Two-Hybrid“-Test mit ActA als Köder eine embryonale Maus-cDNA-Genbank getestet. Dabei wurden drei verschiedene AIPs identifiziert, von denen eines identisch mit dem humanen Protein LaXp180 (auch „CC1“ genannt) ist. LaXp180 ist ein 180 kDa Protein mit über 50 theoretischen Phosphorylierungsstellen in der N-terminalen Hälfte, während die C-terminale Hälfte „coiled-coil“-Strukturen ausbilden kann. Darüberhinaus enthält LaXp180 eine Kern-Lokalisations-Sequenz und ein Leucin-Zipper-Motiv.

Die Bindung von LaXp180 an ActA wurde *in vitro* unter Verwendung von rekombinantem His₆-Tag-LaXp180 und rekombinantem ActA bestätigt, da rekombinantes ActA nur an einer Ni-Agarose-Säule gebunden wurde, wenn diese vorher mit His₆-Tag-LaXp180 beladen war. Über RT-PCR konnte zum ersten Mal die Expression LaXp180-spezifischer mRNA in verschiedenen Säugerzellen nachgewiesen und mit einem polyklonalen anti-LaXp180-Serum durch Immunopräzipitation erstmals ein 194 kDa großes Protein in Säugerezellen detektiert werden. Die intrazelluläre Lokalisation von LaXp180 wurde über Immunfluoreszenzmikroskopie untersucht. Immunfluoreszenzfärbungen von Fibroblasten mit dem anti-LaXp180-Serum zeigten eine starke Färbung der Zellkerne und definierter Bereiche direkt neben den Kernen, während das restliche Zytoplasma schwach gefärbt war.

Über Immunfluoreszenzmikroskopie mit dem anti-LaXp180-Serum an mit *L. monocytogenes* infizierten Zellen konnte gezeigt werden, daß LaXp180 mit der Oberfläche vieler, aber nicht aller intrazellulärer, ActA-exprimierender Listerien kolokalisiert. Dagegen wurde nie eine Kolokalisation mit intrazellulären, aber ActA-defizienten Mutanten beobachtet. Darüberhinaus ist LaXp180 asymmetrisch auf der Bakterienoberfläche verteilt und schließt sich gegenseitig mit der F-Aktin-Polymerisation aus.

LaXp180 ist ein putativer Bindungspartner von Stathmin, einem 19 kDa Phosphoprotein, das die Mikrotubuli-Dynamik reguliert. Über Immunfluoreszenz konnte gezeigt werden, daß auch Stathmin mit intrazellulären, ActA-exprimierenden *L. monocytogenes* kolokalisiert.

Summary

Listeria monocytogenes, a facultative intracellular pathogen, is able to penetrate and to multiply in host cells, to move intracellularly and to infect neighbouring cells directly. Intracellular movement is caused by the polymerisation of host cell actin leading to the generation of characteristic actin tails at one pole of the bacterium.

The only bacterial factor necessary for actin polymerisation is the surface protein ActA. However, ActA itself is unable to polymerize actin, and can only do so in association with host cell proteins. So far the only known host cell proteins directly interacting with ActA are the phosphoprotein VASP and the Arp2/3 complex. VASP binds to the central proline-rich repeat region of ActA and accelerates actin polymerisation by the recruitment of profilin. The Arp2/3 complex interacts with the N-terminal domain of ActA and initiates the actin polymerisation process.

To identify additional eukaryotic ActA-interacting proteins (AIPs), an embryonic mouse cDNA library was screened in a yeast two-hybrid approach using ActA as bait. Three different AIPs were isolated, one of which was identical to the human protein LaXp180 (also called „CC1“). LaXp180 is a 180 kDa protein with more than 50 theoretical phosphorylation sites in the N-terminal part. The C-terminal part is able to form coiled-coil structures. Furthermore, LaXp180 contains a nuclear localisation sequence and a leucine-zipper motif.

Binding of LaXp180 to ActA was demonstrated *in vitro* using recombinant histidine-tagged LaXp180 and recombinant ActA. Recombinant ActA was retained on a Ni-agarose column after prior loading of the column with histidine-tagged LaXp180. Using RT-PCR, the expression of LaXp180 specific mRNA in different mammalian cells was demonstrated for the first time. A protein with a molecular weight of 194 kDa was detected in cell extracts by immunoprecipitation with a polyclonal anti-LaXp180 antiserum. The intracellular localisation of LaXp180 was analysed by immunofluorescence microscopy. Immunofluorescence staining of fibroblasts with the anti-LaXp180 serum showed a strong staining of the nuclei and of defined regions next to the nuclei as well as a weak staining of the rest of the cytoplasm.

Fluorescence microscopy with the anti-LaXp180 antiserum of cells infected with *L. monocytogenes* revealed colocalisation of LaXp180 with the bacterial surface of a subset of intracellular, ActA-expressing listeriae. In contrast, colocalisation with intracellularly growing but ActA-deficient mutants was never observed. Furthermore, LaXp180 binding to intracellular *L. monocytogenes* was asymmetrical and mutually exclusive with F-actin polymerisation on the bacterial surface.

LaXp180 is a putative binding partner of stathmin, a 19 kDa phosphoprotein regulating microtubule dynamics. Using immunofluorescence, colocalisation of stathmin with intracellular, ActA-expressing *L. monocytogenes* was also demonstrated.

1 Einleitung

1.1 Zielsetzung der Arbeit

In einer früheren Arbeit wurden unter Verwendung des „Yeast Two-Hybrid“-Systems eukaryotische Proteine und Proteinfragmente, die von einer Expressionsgenbank kodiert werden, auf Interaktion mit dem Oberflächenprotein ActA aus *Listeria monocytogenes* getestet. Dabei konnten drei unterschiedliche Proteinfragmente isoliert werden, die offensichtlich an ActA binden (Pfeuffer, 1996). Zu zwei dieser ActA-interagierenden Proteine (AIPs) konnten bei Datenbankvergleichen keine Homologien zu bekannten Proteinen gefunden werden. Das dritte Fragment entsprach dem C-Terminus eines 180 kDa großen Proteins, das jetzt mit LaXp180 bezeichnet wird. LaXp180 wurde ursprünglich aufgrund einer Kreuzreaktion mit einem gegen das Autoantigen La gerichteten monoklonalen Antikörper isoliert. Das Kernprotein La bindet an eine Vielzahl von RNAs und fungiert offensichtlich als RNA-Chaperon, indem es die Sekundärstruktur von RNAs stabilisiert. Wiederum über einen „Yeast Two-Hybrid“-Test, bei dem das zelluläre Phosphoprotein Stathmin als Köder eingesetzt wurde, konnte eine Interaktion zwischen LaXp180 und Stathmin aufgezeigt werden. Das 19 kDa große Stathmin reguliert die Mikrotubulidynamik. Die Fähigkeit, Mikrotubuli zu depolymerisieren, wird dabei durch Phosphorylierung von Stathmin gesteuert.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte gezeigt werden, daß das *laXp180*-Gen in verschiedenen Zelltypen transkribiert und LaXp180 tatsächlich als Protein synthetisiert wird. Die Interaktion von LaXp180 mit ActA sollte über einen biochemischen Ansatz verifiziert und der für die Bindung an ActA verantwortliche Bereich eingegrenzt werden. Durch Immunfluoreszenzmikroskopie an mit *L. monocytogenes* infizierten Säugerzellen sollte überprüft werden, ob LaXp180 mit der Oberfläche der intrazellulären Bakterien assoziiert und auch Stathmin an der Bakterienoberfläche lokalisiert ist. Letzteres würde eine indirekte Bindung von Stathmin an ActA über LaXp180 bestätigen. Die folgenden Kapitel sollen einen Überblick über das fakultativ intrazelluläre Bakterium *L. monocytogenes*, dessen Oberflächenprotein ActA sowie die beiden eukaryotischen Proteine LaXp180 und Stathmin geben.

1.2 *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes wurde erstmals von Murray *et al.*, 1926, beschrieben und aufgrund der charakteristischen Monozytose im Blut experimentell infizierter Tiere *Bacterium monocytogenes* genannt. 1940 wurde es dann nach Joseph Lister (1827-1912) umbenannt, dem Pionier der antiseptischen Chirurgie. *L. monocytogenes* ist ein Gram-positives, fakultativ anaerobes, nicht sporulierendes Stäbchen (0,5 x 0,5-2 µm), das in einem breiten Temperaturbereich wachsen kann. *L. monocytogenes* ist Katalase-positiv, Oxidase-negativ, CAMP-positiv und hämolytisch auf Blutagarplatten. Bei Temperaturen zwischen 20 °C und 25 °C ist *L. monocytogenes* peritrich begeißelt und sehr beweglich, während die Flagellin-Synthese bei 37 °C reprimiert ist und die Listerien unbeweglich sind. Die Zellwand enthält Peptidoglykan, Teichonsäure, Lipoteichonsäure und besitzt alle charak-

teristischen Eigenschaften einer Gram-positiven Zellwand. *L. monocytogenes* ist in der Natur weit verbreitet und kommt im Boden, auf Pflanzen, im Wasser, in kontaminierten Nahrungsmitteln sowie in tierischen und menschlichen Fäkalien vor (Schuchat *et al.*, 1991).

L. monocytogenes verursacht ernsthafte Infektionen bei Personen mit einem geschwächten Immunstatus wie Schwangeren, Neugeborenen und älteren Menschen. Hauptsymptome einer Listerien-Infektion sind Septikämie, Enzephalitis, Meningoenzephalitis, in manchen Fällen Gastroenteritis sowie Aborte und Totgeburten bei Schwangeren. *L. monocytogenes* ist in der Lage, während der Infektion drei Barrieren zu überwinden: die Darmbarriere, die Blut-Hirn-Schranke und die Plazenta. Listeriose tritt beim Menschen meist nur sporadisch auf, erst in jüngster Zeit wurden kleinere Epidemien bekannt. Pathologische Listerieninfektionen sind relativ selten, erreichen aber eine Mortalität von über 20 % (Lorber, 1997). Die Listeriose beginnt beim Menschen in den meisten Fällen nach Aufnahme kontaminierter Nahrungsmittel (Schlech *et al.*, 1983). Die Bakterien erreichen den Gastrointestinaltrakt und durchbrechen die Darmbarriere. Über den Blutstrom gelangen sie in Leber und Milz, wo sie sich bei immunschwachen Menschen vermehren. Von hier aus können sich die Listerien dann auf das Gehirn und die Plazenta ausbreiten.

In den meisten infizierten Geweben kommt *L. monocytogenes* intrazellulär vor, da es seine eigene Phagozytose in normalerweise nicht-phagozytischen Zellen induzieren kann. Die Infektion der Wirtszelle beginnt mit der Aufnahme der Listerien entweder durch Phagozytose bei Makrophagen oder induzierte Phagozytose bei normalerweise nicht-phagozytischen Zellen. Das Eindringen der Bakterien in die Zelle beginnt mit einer Interaktion mit Rezeptoren in der Zytoplasmamembran, die das Bakterium schrittweise einhüllt. Dieser Prozeß unterscheidet sich vom „membrane ruffling“, das Salmonellen und Shigellen beim Eintreten in die Wirtszellen auslösen, welches dann zu deren Makropinozytose führt. Der Aufnahmemechanismus der Listerien, der dem Invasin-vermittelten Eindringen von *Yersinia* ähnlich ist, wird auch als „zipper“-Mechanismus bezeichnet, im Unterschied zum „trigger“-Mechanismus bei Salmonellen und Shigellen (Finlay *et al.*, 1991; Isberg und van Nhieu, 1994; Adam *et al.*, 1995; Swanson und Baer, 1995; Mengaud *et al.*, 1996).

Nach der Aufnahme in die Zelle befinden sich die Listerien in einer Vakuole, die von einer Membran umgeben ist. Die Vakuolenmembran wird lysiert, und bereits nach 30 min liegen die Bakterien frei im Zytoplasma vor und beginnen mit der Teilung. Die Verdopplungszeit beträgt ungefähr eine Stunde (Tilney und Portnoy, 1989). Gleichzeitig beobachtet man die Ausbildung eines zunächst ungeordneten Aktinsaumes um die einzelnen Bakterien, der innerhalb von ca. 2 h zu langen Schweifen umorganisiert wird. Bei der Fortbewegung durch Aktinpolymerisation verbleibt der Schweif immer an der selben Position im Zytoplasma, während das Bakterium am Ursprung des Schweifes durch ständige Neupolymerisation von Aktin mit einer Geschwindigkeit von ca. 0,3 $\mu\text{m/s}$ vorwärts geschoben wird (Tilney und Portnoy, 1989; Mounier *et al.*, 1990; Dabiri *et al.*, 1990; Theriot *et al.*, 1992). Gelangen die Listerien aufgrund ihrer Bewegung in die Nähe der Zellmembran, induzieren sie dort die Ausbildung Pseudopodien-ähnlicher Ausstülpungen, an deren Spitze sich jeweils ein Bakterium befindet. Auf Grund nicht näher bekannter Wechselwirkungen mit benachbarten Zellen werden diese Membranausstülpungen von den Nachbarzellen phagozytiert, was bereits vier Stunden nach der Infektion beobachtet werden kann. Das Bakterium befindet sich dann in einer von zwei Membranen umgebenen Vakuole. Für einen neuen Infektionszyklus werden beide Membranen lysiert (Tilney und Portnoy, 1989). Daher können sich Listerien, wenn sie einmal ins Zytoplasma gelangt sind, direkt von Zelle zu Zelle ausbreiten, ohne mit wichtigen humoralen Abwehrmechanismen des Wirts wie Antikörpern und dem Komplementsystem in Kontakt zu kommen. Diese Fähigkeit, sich direkt von Zelle zu Zelle auszubreiten und so ganze Gewebe zu infizieren, erklärt auch die Beobachtung, daß Antikörper bei einer Listeriose nicht protektiv sind und eine Immunität gegen Listerien T-Zell vermittelt ist.

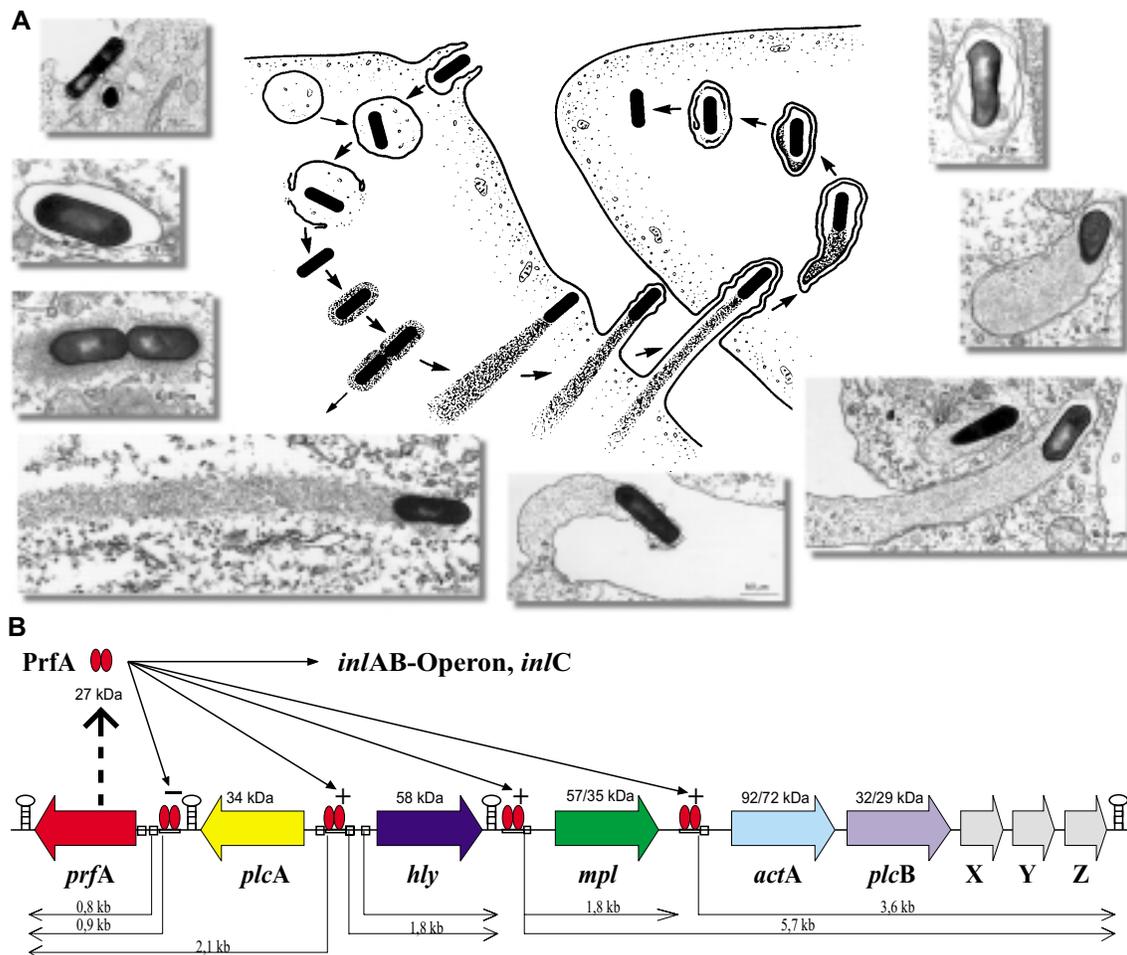


Abb. 1: Infektionszyklus und Virulenzgencluster.

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

B: Schematische Anordnung der Virulenzgene sowie ihre Organisation in Operons und ihre Regulation durch PrfA (von Fredi Engelbrecht, Institut für Mikrobiologie, Universität Würzburg).

Die verschiedenen Phasen des Infektionszyklus zeigt Abb. 1A. Der Eintritt in nicht professionelle Phagozyten wird letztlich durch mindestens zwei bakterielle Oberflächenproteine vermittelt: Internalin A (InlA) und Internalin B (InlB). Neben diesen gut charakterisierten Internalinen gibt es eine Reihe weiterer Internaline in *L. monocytogenes*, darunter das ins Medium sezernierte Internalin C (InlC) (Engelbrecht *et al.*, 1996; Dramsi *et al.*, 1997). Die Rolle dieser Internaline im Invasionsgeschehen, sowie die von p60 und ActA, ist nach wie vor unklar (Cossart und Lecuit, 1998). Für das Entkommen aus der Vakuole ist die Expression von Listeriolysin O (LLO) nötig, einem porenbildenden hämolytischen Toxin, das in manchen Zellen synergistisch mit einer Phosphatidylinositol-spezifischen Phospholipase C (PlcA) wirken kann (Parrisius *et al.*, 1986; Cossart *et al.*, 1989; Camilli *et al.*, 1993). In Makrophagen trägt auch ClpC, ein Mitglied der Clp-ATPase Familie von Streß-Proteinen zum Entkommen aus dem Phagosom bei, wobei der Wirkungsmechanismus allerdings noch unbekannt ist (Rouquette *et al.*, 1998). Die intra- und interzelluläre Bewegung durch Polymerisation von Aktin benötigt die Expression von ActA (Domann *et al.*, 1992; Kocks *et al.*, 1992). Die Lyse der von zwei Membranen umgebenen Vakuole erfolgt synergistisch durch LLO und die beiden Phospholipasen PlcA und PlcB (Vázquez-Boland *et al.*, 1992; Smith *et al.*, 1995b; Gedde *et al.*, 2000). Die vom Gen *plcA* kodierte Phospholipase C (PlcA) hydrolysiert spezifisch Phosphatidylinositol (Camilli *et al.*, 1991; Leimeister-Wächter *et al.*, 1991; Goldfine und Knob, 1992), während die von *plcB* kodierte Phospholipase C (PlcB) ein breites Spektrum an Substraten hat und die meisten Phospholipide hydrolysiert, die in biologischen Membranen vorkommen, einschließlich Sphingomyelin (Geoffroy *et al.*, 1991; Vázquez-Boland *et al.*, 1992; Goldfine

et al., 1993). PlcB wird nach Ansäuerung der Vakuole von der Metalloprotease Mpl und zellulären Proteasen proteolytisch aktiviert (Marquis *et al.*, 1997). Fast alle Gene, die diese Virulenzfaktoren kodieren, liegen „geclustert“ in einem 10 kb großen Bereich auf dem Chromosom (Abb. 1B). Eine Ausnahme ist das *inlAB*-Operon, das in einem anderen Bereich des Chromosoms liegt. Das Virulenzgencluster ist jedoch keine Pathogenitätsinsel, da es ziemlich klein ist und im Gegensatz zu den typischen Pathogenitätsinseln Gramnegativer Bakterien den gleichen GC-Gehalt wie der Rest des Chromosoms aufweist. Die meisten bekannten Virulenzgene werden absolut oder teilweise durch den „positive regulatory factor A“ PrfA kontrolliert (Leimeister-Wächter *et al.*, 1990; Mengaud *et al.*, 1991; Chakraborty *et al.*, 1992). PrfA ist ein Mitglied der CRP/FnR Familie von Transkriptions-Aktivatoren und besitzt ein ähnliches Helix-Turn-Helix Motiv wie CRP (Sheehan *et al.*, 1996). Erstaunlicherweise ist PrfA unter bestimmten Kulturbedingungen vorhanden, aber inaktiv, was damit begründet wird, daß an der PrfA-abhängigen Regulation entweder ein Kofaktor beteiligt ist oder PrfA durch eine post-translationale Modifikation aktiviert wird (Renzoni *et al.*, 1997).

1.3 ActA

L. monocytogenes hat einen effizienten Mechanismus entwickelt, sich durch Aktinpolymerisation intrazellulär fortzubewegen. Diese Art der Fortbewegung findet man auch bei anderen intrazellulären Pathogenen, die nicht mit *L. monocytogenes* verwandt sind, wie z.B. bei *Shigella flexneri* (Bernardini *et al.*, 1989), *Rickettsia* spp. (Heinzen *et al.*, 1993) und dem Vaccinia Virus (Cudmore *et al.*, 1995). Aus der Gattung *Listeria* ist nur noch *L. ivanovii* in der Lage, sich durch Aktinpolymerisation fortzubewegen (Karunasagar *et al.*, 1993; Kreft *et al.*, 1995). Auch Endosomen und Phospholipid-Vesikel bewegen sich in nicht-infizierten Zellen und zytoplasmatischen Extrakten ebenfalls mit Aktin-reichen Schweifen fort (Ma *et al.*, 1998; Cameron *et al.*, 1999). Einen ähnlichen Mechanismus findet man bei Vorgängen, die sich an der Vorderseite (in Wanderungsrichtung) von wandernden Zellen abspielen, wie zum Beispiel Neutrophilen, die zum Infektionsherd wandern oder metastatischen Krebszellen. Färbungen von Dünnschnitten infizierter Zellen mit dem S1-Fragment von Myosin zeigten, daß die Aktin-Schweife aus quervernetzten kurzen Filamenten bestehen, wobei die „barbed ends“, die schnell polymerisierenden Enden, zum Bakterium hin gerichtet sind, was die Vermutung nahe legte, daß die Polymerisation am Hinterende des Bakteriums stattfindet (Tilney und Portnoy, 1989; Cossart und Kocks, 1994). Videomikroskopie infizierter Zellen, denen fluoreszierende Aktin-Monomere injiziert wurden, bestätigten, daß die Aktinpolymerisation an einem Pol des Bakteriums stattfindet und sich das Bakterium weiterbewegt, während der Schweif stationär im Zytoplast bleibt (Dabiri *et al.*, 1990; Sanger *et al.*, 1992; Theriot *et al.*, 1992). Da die Rate der Schweifbildung mit der Fortbewegungsgeschwindigkeit der Listerien streng korreliert, liegt es nahe, daß die treibende Kraft für die Fortbewegung allein die Aktinpolymerisation ist (Theriot *et al.*, 1992).

Der listerielle Faktor, der zur Polymerisation des Aktins der Wirtszelle nötig ist, ist das Oberflächenprotein ActA. ActA wurde fast zur gleichen Zeit einerseits anhand von Mutanten entdeckt, die kein Aktin polymerisieren und sich nicht mehr intrazellulär fortbewegen konnten (Kocks *et al.*, 1992) und andererseits durch Sequenzierung des Bereichs stromabwärts des *mpl*-Gens (Domann *et al.*, 1992). ActA-Mutanten können sich nicht mehr intrazellulär fortbewegen und bilden dadurch charakteristische Mikrokolonien in der Nähe des Zellkerns. Sie sind auch nicht mehr in der Lage, sich von Zelle zu Zelle auszubreiten und daher avirulent in Mäusen. ActA ist ein 639 AS großes Protein mit einem theoretischen Molekulargewicht von 67 kDa, läuft aber in SDS-Gelen auf der Höhe von 92 kDa. ActA wird von dem Gen *actA* kodiert, das auf dem Virulenzgencluster im Lecithinase-Operon stromabwärts des *mpl*-Gens liegt, welches eine Metalloprotease ko-

diert (Abb. 1B). Sowohl stromaufwärts des *actA*-Gens als auch des *mpl*-Gens befindet sich jeweils ein PrfA-regulierter Promotor. Die Termination der Transkription erfolgt hinter ORF Z Rho-unabhängig. Das Gen *actA* kann sowohl vom eigenen Promotor aus zusammen mit *plcB* und den drei kurzen ORFs X, Y und Z als 3,6 kb langes Transkript exprimiert werden, als auch vom *mpl*-Promotor aus als 5,7 kb lange mRNA (Abb. 1B).

ActA besitzt ein N-terminales Signalpeptid (AS 1-29), das nach dem Transport durch die bakterielle Membran abgespalten wird. Am C-terminalen Bereich befindet sich das für Zellwandproteine Gram-positiver Bakterien typische Motiv LPATK (AS 513-517), über das Proteine in der Zellwand verankert werden. Der C-Terminus (AS 613-639) bildet einen hydrophoben Membrananker. ActA hat somit alle Eigenschaften eines bakteriellen Oberflächenproteins (Domann *et al.*, 1992; Kocks *et al.*, 1992; Pistor *et al.*, 1995). ActA liegt als Dimer oder Tetramer vor, wobei der N-terminale Bereich (AS 126-155) für die Dimerisierung verantwortlich ist (Mourrain *et al.*, 1997; Cicchetti *et al.*, 1999). Diese und alle folgenden Angaben der Aminosäurepositionen von ActA beziehen sich auf die von Domann *et al.*, 1992 publizierte Sequenz, bei der AS 1 die erste Aminosäure des Signalpeptides ist und AS 30 die erste Aminosäure des reifen Proteins. In Abb. 2 ist ActA schematisch dargestellt.

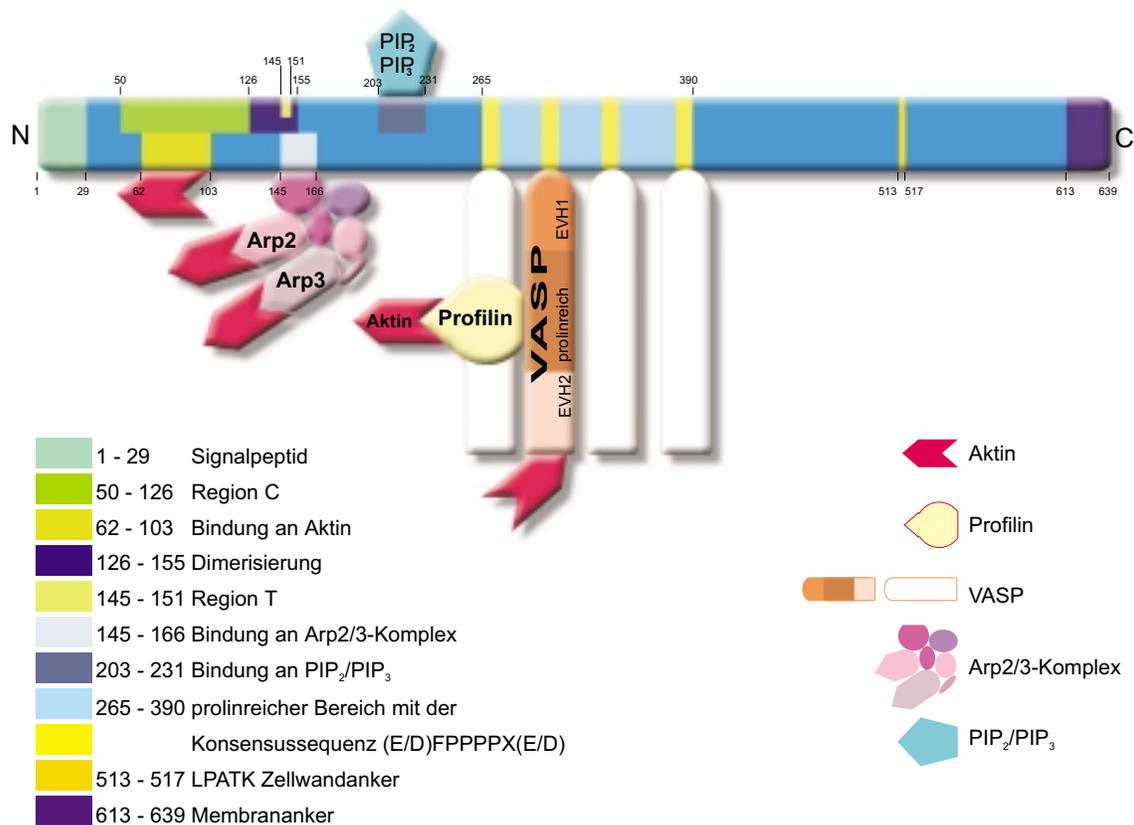


Abb. 2: ActA.

Zur besseren Übersichtlichkeit wurde nur eines der vier VASP mit den drei Domänen und den Bindungspartnern Profilin und Aktin dargestellt, die anderen drei VASP sind nur angedeutet. Die Angabe der Aminosäurepositionen beziehen sich auf die von Domann *et al.*, 1992 publizierte Sequenz.

Immunfluoreszenzanalysen haben gezeigt, daß ActA nur auf der Bakterienoberfläche, nicht aber im Aktinschweif vorkommt. Zur Verteilung von ActA auf der Bakterienoberfläche gibt es zwei unterschiedliche Theorien: Die Gruppe um Pascale Cossart veröffentlichte Daten, die nahelegen, daß ActA polar auf der Bakterienoberfläche verteilt ist, mit einer höheren Konzentration an einem Pol des Bakteriums. An diesem Pol findet dann verstärkt Aktinpolymerisation statt und der Schweif entsteht. Demnach wäre allein durch diese polare Verteilung die Stelle vorbestimmt, an der der Schweif entsteht, und somit auch die Richtung der Fortbewegung (Kocks *et al.*, 1993; Cossart und Kocks, 1994; Cossart und Lecuit, 1998). Die Gruppe um Jürgen Wehland findet dagegen keine Anzeichen für eine po-

lare Verteilung von ActA auf der Oberfläche und vermutet daher, daß ActA gleichmäßig auf der Oberfläche verteilt ist (Niebuhr *et al.*, 1993). Zahlreiche *in vitro*-Experimente, die in einem zytoplasmatischen Extrakt aus *Xenopus* durchgeführt wurden, sollten zur Klärung der bis heute umstrittenen Frage beitragen. Die Adsorption eines rekombinanten ActA-LytA-Fusionsproteins an die Oberfläche von *Streptococcus pneumoniae* löste an der gesamten Oberfläche Aktinpolymerisation aus, die aber zu keiner Fortbewegung führte. Erst wenn durch Teilung und anschließendes Auseinanderbrechen der Tochterzellen Pneumokokken entstanden sind, deren Oberfläche nur am jeweils alten Zellpol mit dem Fusionsprotein bedeckt war, trat Fortbewegung ein (Smith *et al.*, 1995a). In infizierten Gewebekulturzellen wird eine Fortbewegung von *L. monocytogenes* frühestens nach einer Teilung beobachtet. Dies legt die Vermutung nahe, daß durch die Teilung aus der symmetrischen Aktinwolke ein unsymmetrisches Gebilde entsteht, was schließlich eine gerichtete Fortbewegung ermöglichen könnte (Robbins *et al.*, 1999). Durch Benetzen von kleinen Polystyrol-Kügelchen mit ActA stellte sich heraus, daß bei sehr kleinen Kügelchen ($\varnothing \leq 0,5 \mu\text{m}$) auch eine gleichmäßige Bedeckung der Oberfläche mit ActA zu einer gerichteten Bewegung führen kann, was durch zufällige Unregelmäßigkeiten in der Dichte der Aktinfilamente oder thermische Bewegung erklärt wird. Ab einem Durchmesser von $2 \mu\text{m}$ entsteht gerichtete Bewegung jedoch nur bei asymmetrisch benetzten Kügelchen. Diese Beobachtung postuliert für die Fortbewegung der relativ großen Listerien eine polare Verteilung von ActA auf der Oberfläche (Cameron *et al.*, 1999).

Um herauszufinden, ob ActA alleine ausreicht, die Aktinpolymerisation zu induzieren, wurde das *actA*-Gen in Säugerzellen transfiziert. Dabei lagert sich ActA in die äußere Membran von Mitochondrien ein, da die Aminosäuresequenz der 26 C-terminalen Aminosäuren von ActA der Signalsequenz ähnlich ist, durch die eukaryotische, nukleär kodierte Proteine in die Mitochondrien transportiert werden. Auf der Oberfläche der Mitochondrien ist ActA tatsächlich in der Lage, die Polymerisation von globulärem Aktin (G-Aktin) in filamentöses Aktin (F-Aktin) zu induzieren und so das Aktin-Zytoskelett um die Mitochondrien zu reorganisieren (Pistor *et al.*, 1994; Friederich *et al.*, 1995). 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 zeigen eindeutig, daß ActA nicht nur die Aktinpolymerisation induzieren kann, sondern auch für die Fortbewegung verantwortlich ist (Theriot *et al.*, 1994; Marchand *et al.*, 1995). ActA ist demnach der einzige listerielle Faktor, der zur Induktion der Aktinpolymerisation und zur Fortbewegung nötig ist.

Das ActA-Protein wird aufgrund von Auffälligkeiten in der Aminosäuresequenz artifizial in drei Bereiche unterteilt: einen N-terminalen Bereich (AS 30-264), einen charakteristischen zentralen Bereich aus vier prolinreichen Sequenzwiederholungen (AS 265-390) und einen C-terminalen Bereich (AS 391-639, siehe Abb. 2) (Domann *et al.*, 1992). Vergleiche der Aminosäuresequenz ergaben, daß der prolinreiche Bereich und der C-Terminus Ähnlichkeit (22 % Identität) mit Zyxin haben, einem Protein, das mit den Fokalkontakten und Aktin-Streißfasern assoziiert ist (Golsteyn *et al.*, 1997). Der N-Terminus von ActA hingegen zeigt Ähnlichkeit (25 % Identität) mit der C-terminalen Region von Vinculin (AS 879-1066), einem Protein, das mit seinem C-Terminus an Aktin binden kann (Gilmore und Burridge, 1996; Lasa *et al.*, 1998). Demnach besitzt ActA zwei Domänen mit Ähnlichkeit zu eukaryotischen Proteinen, die an der Organisation des Zytoskeletts beteiligt sind (Cossart und Lecuit, 1998). ActA wird, wie bereits oben für PC-PLC beschrieben, bei niedrigem pH-Wert durch die Metalloprotease (Mpl) gespalten und dadurch inaktiviert. Dies erfolgt in der von zwei Membranen umgebenen Vakuole nach dem Übertritt in eine Nachbarzelle und könnte erklären, weshalb die Bakterien erst 1-3 h nach der Lyse der Vakuole Aktin polymerisieren und Schweife ausbilden (Robbins *et al.*, 1999). ActA liegt in der Wirtszelle phosphoryliert vor, was in einer SDS-PAGE zu drei geringfügig unterschiedlichen Banden führt. Welche Rolle die im Zytoplasma erfolgende Phosphorylierung

von ActA spielt, ist noch unklar (Brundage *et al.*, 1993). Bei rekombinantem ActA, dem der C-Terminus fehlt, sind dagegen keine unterschiedlichen Phosphorylierungszustände mehr zu erkennen. Die offenbar im C-terminalen Bereich stattfindende Phosphorylierung scheint aber für die Fortbewegung der Bakterien nicht nötig zu sein, da ActA auch ohne den C-Terminus funktionsfähig ist (Lasa *et al.*, 1995).

Über Deletionsanalysen wurde versucht herauszufinden, welche Bereiche von ActA für dessen Funktion verantwortlich sind. Ergebnis war, daß der N-terminale Bereich (NActA) absolut essentiell ist, während der zentrale prolinreiche Bereich die Fortbewegungsgeschwindigkeit der Listerien erhöht (Lasa *et al.*, 1995; Lasa *et al.*, 1997). Auch können sich Listerien allein durch Expression des N-Terminus als NActA-LacZ-Fusionsprotein noch fortbewegen, was die Deletionsanalysen bestätigt (Lasa *et al.*, 1997). Genauere Analysen grenzten zwei kleine Bereiche im N-Terminus ein, die für die Aktinpolymerisation wichtig sind: die Region C (AS 50-126) und die Region T (AS 145-151, vgl. Abb. 2). Beide Regionen sind nicht an der Initiation der Aktinpolymerisation beteiligt, da letztere auch bei Deletion beider Regionen abläuft, sondern an der eigentlichen Schweifbildung: Deletion der Region T verhindert die Schweifbildung völlig, während Deletion der Region C zu diskontinuierlichen Schweifen führt (Lasa *et al.*, 1997).

Eine direkte Bindung von ActA an Aktin konnte erst vor wenigen Jahren nachgewiesen werden. Ein synthetisches Peptid (AS 62-103, siehe Abb. 2) aus dem N-Terminus von ActA kann *in vitro* F- und G-Aktin binden (Lasa *et al.*, 1997). Versuche mit an Latex-Kügelchen gekoppelten Fusionsproteinen aus GST (Glutathion S-Transferase) und diesem kurzen Bereich von NActA (AS 62-103) bestätigten die Bindungsstelle (siehe Abb. 2). Bindungsversuche mit Voll-Länge ActA dagegen zeigten eine Interaktion nur mit G-Aktin, während eine Bindung an F-Aktin nicht nachweisbar war (Cicchetti *et al.*, 1999). Es wird angenommen, daß es neben Aktin noch weitere zelluläre Faktoren gibt, die an der Aktinpolymerisation beteiligt sind. Über Immunfluoreszenz mit Antikörpern gegen bereits bekannte Zytoskelettproteine konnten verschiedene Proteine identifiziert werden, die neben Aktin im Aktinschweif vorkommen. Solche Färbungen werden an fixierten, mit *L. monocytogenes* infizierten Zellen durchgeführt. Auf diese Weise wurden die Proteine α -Aktinin, Tropomyosin, Vinculin, Villin, Talin, Ezrin/Radixin, Fimbrin, Cofilin, Profilin und VASP (vasodilator-stimulated phosphoprotein) im listeriellen Aktinschweif nachgewiesen (Dabiri *et al.*, 1990; Kocks *et al.*, 1993; Dold *et al.*, 1994; Theriot *et al.*, 1994; Chakraborty *et al.*, 1995). Von diesen Proteinen sind nur Profilin und VASP zwischen dem Aktinschweif und der Bakterienoberfläche lokalisiert - alle anderen sind im Schweif enthalten. Für VASP konnte eine direkte Bindung an gereinigtes ActA *in vitro* gezeigt werden. VASP bindet auch an das ActA-homologe Protein IactA (150 kDa) von *L. ivanovii* und ist auch mit Aktinfilamenten assoziiert, die von *S. flexneri* zur intrazellulären Fortbewegung polymerisiert werden (Chakraborty *et al.*, 1995).

VASP gehört zur Familie der Ena/VASP Proteine. Neben VASP gehört zu dieser Familie das *Drosophila*-Protein Ena (Enabled), dessen Säuger-Homologes Mena („mammalian Ena“) und das murine Evl („Ena-VASP like“) (Purich und Southwick, 1997; Niebuhr *et al.*, 1997; Cicchetti *et al.*, 1999). VASP und Mena kommen in Fokalkontakten und Streßfasern vor. Alle Proteine dieser Familie haben drei Domänen: eine N-terminale Ena-VASP-homologe Domäne (EVH-1), einen zentralen prolinreichen Bereich und die C-terminale Domäne EVH-2 (vgl. Abb. 2). Auch für Mena konnte die Bindung an ActA gezeigt werden (Gertler *et al.*, 1995; Gertler *et al.*, 1996). VASP und Mena binden mit der konservierten EVH-1 Domäne an die Konsensussequenz (E/D)FPPPPX(D/E), die insgesamt viermal (die sog. prolinreichen „repeats“) im zentralen prolinreichen Bereich von ActA vorkommt (Niebuhr *et al.*, 1997). Die „natürlichen“ Liganden von VASP und Mena sind die zellulären Proteine Zyxin und Vinculin, die ebenfalls solche EVH-1 Bindungsmotive enthalten. Zyxin enthält wie ActA vier EVH-1-Bindungsmotive, während in Vinculin diese prolinreiche Sequenz nur einmal vorkommt. Zyxin und Vinculin sind in Fokalkontak-

ten lokalisiert und zeigen in Teilbereichen Homologien zu ActA (s.o.) (Gertler *et al.*, 1996; Reinhard *et al.*, 1996). Neueste Untersuchungen belegen, daß VASP als Homotetramer vorliegt (Bachmann *et al.*, 1999).

VASP und Ena binden an F-Aktin und Profilin. F-Aktin wird von VASP über die C-terminale EVH-2 Domäne gebunden (siehe Abb. 2). Die Affinität von VASP zu F-Aktin wird dabei über die Phosphorylierung von Ser157 durch eine cAMP-abhängige Proteinkinase reguliert. Phospho-VASP bindet mit sehr hoher Affinität, während Dephospho-VASP 40-fach schwächer bindet. Nach Entfernen von VASP aus zyttoplasmatischen Extrakten können sich die Listerien in diesen Extrakten nicht mehr fortbewegen, obwohl Aktinpolymerisation um die Bakterien herum stattfindet. VASP ist daher nicht an der Aktinpolymerisation direkt beteiligt, sondern organisiert offensichtlich das Aktinengeflecht so, daß eine vorwärtstreibende Kraft entstehen kann (Laurent *et al.*, 1999). Dies steht im Einklang mit früheren Versuchen, bei denen eine Deletion der EVH-1-Bindungsmotive in ActA zu einer drastischen Verringerung der Fortbewegungsgeschwindigkeit der Listerien führte. Letztere hängt dabei linear von der Anzahl der prolinreichen „repeats“ in ActA ab (Smith *et al.*, 1996; Niebuhr *et al.*, 1997). Die Bindung von VASP an Profilin (vgl. Abb. 2) erfolgt über GPPPPP-Motive, von denen VASP und Mena jeweils mehrere enthalten. Das 15 kDa-Protein Profilin ist ein universelles Regulationsprotein für das Aktin-Zytoskelett, das die Elongation der Aktinfilamente beschleunigt. Es bindet an Aktin-Monomere, schützt als „capping“ Protein die Enden der Aktinfilamente und tauscht an den Aktinmonomeren gebundenes ADP gegen ATP aus (Purich und Southwick, 1997). Die Entfernung von Profilin aus zyttoplasmatischen Extrakten führt zu einer starken Verlangsamung der Fortbewegung von Listerien, wobei die Aktinpolymerisation jedoch nicht beeinträchtigt wird. Dies deckt sich mit der Abnahme der Geschwindigkeit bei Deletion der EVH-1-Bindungsstellen in ActA, wodurch VASP und somit indirekt auch Profilin nicht mehr binden können. Profilin steigert demnach die Fortbewegungsgeschwindigkeit der Bakterien (Smith und Portnoy, 1997; Laurent *et al.*, 1999).

Analysen der Sekundärstruktur haben ergeben, daß α -Helices und β -Faltblattstrukturen gleichmäßig über das gesamte ActA-Protein verteilt und nicht in einem bestimmten Bereich konzentriert sind. Aktin-bindende Proteine wie Vinculin, Profilin und Gelsolin werden über Phosphoinositide reguliert, wobei in Profilin und Gelsolin Konformationsänderungen ausgelöst werden. Daher wurden verschiedene Phosphoinositide daraufhin untersucht, ob sie eine Konformationsänderung von ActA auslösen können. Während Phosphatidylcholin keinen Effekt zeigte, führten Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) und Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PIP₃) zu einer deutlichen Veränderung in der Sekundärstruktur von ActA mit Schwerpunkt im N-terminalen Bereich. Die Bindung von (PIP₂) und (PIP₃) erfolgt dabei im N-terminalen Bereich (AS 203-231, siehe Abb. 2) (Cicchetti *et al.*, 1999).

Für die Induktion der Aktinpolymerisation auf der Bakterienoberfläche reicht allein ein Komplex aus sieben Proteinen aus, der sog. Arp2/3-Komplex. Zwei Untereinheiten dieses Komplexes sind die „actin related proteins“ Arp2 und Arp3, die anderen wurden mit p41-Arc, p34-Arc, p21-Arc, p20-Arc und p16-Arc bezeichnet (Welch *et al.*, 1997b; Welch *et al.*, 1997a). Nur eine Mischung aus gereinigtem ActA und dem Arp2/3-Komplex kann die Aktinpolymerisation effizient initiieren. Da der gereinigte Arp2/3-Komplex alleine die Nukleation der Aktinfilamente *in vivo* nur schwach induziert und gereinigtes ActA keinen Effekt zeigt, wird angenommen, daß ActA den Arp2/3-Komplex auf der Oberfläche der Listerien aktiviert. Der Arp2/3-Komplex interagiert dabei mit der N-terminalen Domäne von ActA im Bereich der AS 145-166 (siehe Abb. 2) (Welch *et al.*, 1998; Cicchetti *et al.*, 1999; Machesky und Gould, 1999). Der Arp2/3-Komplex bindet an die „pointed ends“ der Aktinfilamente und kann sie quervernetzen. Dies erklärt auch, warum der Komplex über den gesamten Aktinschweif verteilt zu finden ist (Mullins *et al.*, 1998). Daß der Arp2/3-Komplex essentiell für die Schweifbildung ist, zeigten Versuche, bei denen durch

Überexpression von Scar1-Fragmenten die Schweifbildung völlig unterdrückt wurde. Scar1 ist ein Mitglied der Wiskott-Aldrich-Syndrom-Protein (WASP)-Familie, das, wie auch WASP, mit dem Arp2/3-Komplex interagiert. Die Listerien konnten lediglich Aktinwolken ausbilden (May *et al.*, 1999).

Zur Induktion der Aktinpolymerisation ist der Arp2/3-Komplex essentiell, reicht zur Fortbewegung der Listerien aber nicht aus. Der Arp2/3 Komplex wird normalerweise durch die Proteine der WASP/Scar-Familie aktiviert, welche die Organisation des Zytoskellts an Signaltransduktionskaskaden koppeln. So aktiviert Cdc42, eine kleine GTPase der Rho-Familie, das Wiskott-Aldrich-Syndrom-Protein N-WASP, und letzteres den Arp2/3-Komplex. Listerien und Shigellen können die Aktivierung durch Cdc42 nachahmen und so die Signaltransduktion der Wirtszelle umgehen. Während das IcsA-Protein von *Shigella* N-WASP rekrutiert und aktiviert, was zur Aktivierung von Arp2/3 führt, aktiviert ActA den Arp2/3-Komplex direkt durch Imitation von N-WASP. (Egile *et al.*, 1999; Loisel *et al.*, 1999). Um herauszufinden, welche zellulären Proteine für die Aktinpolymerisation essentiell sind, wurde die Fortbewegung von Listerien *in vitro* nicht in zytoplasmatischen Extrakten, sondern in einer physiologischen Pufferlösung getestet, die neben F-Aktin und ATP die verschiedenen gereinigten Proteine enthielt. Ergebnis war, daß sich Listerien bereits in Anwesenheit von lediglich ADF („actin depolymerizing factor“, auch „Cofilin“ genannt), Capping-Protein und dem Arp2/3-Komplex unter Ausbildung normaler Schweife bewegen, wenn auch sehr langsam. Darüberhinaus sind Profilin und VASP, wenn auch nicht essentiell, dennoch wichtig für die Bewegung, da Profilin die Fortbewegungsgeschwindigkeit um den Faktor 2-3 erhöht, während VASP die Geschwindigkeit um das Zehnfache steigert. Dagegen ist α -Aktinin für die Fortbewegung nicht nötig. Eine Veränderung der α -Aktinin-Konzentration hatte ebenfalls keinen Einfluß auf die Geschwindigkeit, aber die Schweife waren in Abwesenheit von α -Aktinin weniger dicht und die Listerien drifteten in der Lösung umher, was vermutlich auf fehlende Querverbindungen der Filamente sowohl im Medium als auch im Schweif zurückzuführen war (Loisel *et al.*, 1999). Frühere Versuche, bei denen α -Aktinin-Fragmente mikroinjiziert wurden, die eine dominant negative Mutation simulierten, zeigten ebenfalls, daß dieses Protein, das Aktinfilamente quervernetzt, für eine effiziente Schweifbildung nötig ist (Dold *et al.*, 1994).

Für die Fortbewegung sind neben dem aktivierten Arp2/3-Komplex und Aktin noch ADF und das Capping-Protein nötig, die für eine ausreichend hohe Konzentration an freiem G-Aktin an der Oberfläche der Bakterien sorgen (Loisel *et al.*, 1999). Die Fortbewegung durch Aktinpolymerisation resultiert aus dem schnellen Umsatz von Aktinfilamenten, die an den „barbed ends“ ständig wachsen, während an den „pointed ends“ ständig Depolymerisation stattfindet. Effiziente Fortbewegung kann nur erfolgen, wenn nicht alle „barbed ends“ im Zytosol verlängert werden, sondern nur dort, wo Bewegung stattfinden soll. An dieser Stelle muß dann auch genügend G-Aktin zur Verfügung stehen. Dies wird durch „capping“ der „barbed ends“ erreicht. Durch „capping“ aller „barbed ends“ wird an den „pointed ends“ G-Aktin frei. Diese Depolymerisation läuft jedoch in reinen F-Aktin-Lösungen nur sehr langsam ab. ADF und Profilin beschleunigen den Filament-Umsatz und damit auch die Depolymerisation synergistisch um das 125-fache, was die Konzentration an ATP-G-Aktin im Gleichgewichtszustand drastisch erhöht (Carlier *et al.*, 1997; Rosenblatt *et al.*, 1997; Carlier, 1998; Didry *et al.*, 1998; Ressad *et al.*, 1999). Diese hohe Gleichgewichtskonzentration an ATP-G-Aktin ist quasi der Brennstoff für die Fortbewegung der Bakterien. Für die Fortbewegung durch Aktinpolymerisation ist kein Myosin-Motor nötig, sie wird allein durch die bei der ATP-Hydrolyse während der Aktinpolymerisation freiwerdende Energie angetrieben (Loisel *et al.*, 1999).

Die Aktinpolymerisation läuft vermutlich in drei Stufen ab: im ersten Schritt müssen freie „barbed“ Enden erzeugt werden, entweder durch Nukleation (Neubildung) oder durch „uncapping“ bereits existierender Filamente. Im zweiten Schritt werden Aktin-Monomere angelagert, was zur Fortbewegung der Listerien führt. Der dritte Schritt beinhaltet die

Entlassung des wachsenden Aktinfilaments vom Polymerisationskomplex, das „Capping“, Quervernetzen und schließlich das Erzeugen neuer „barbed ends“. Der Phänotyp der diskontinuierlichen Schweife bei Deletion der Region C wird damit erklärt, daß freie „barbed ends“ erzeugt werden und auch Aktinpolymerisation stattfindet, jedoch das „Capping“ zu schnell abläuft, was dazu führt, daß die Bakterien in der Bewegung gehemmt sind, bis der kritische Wert an freien „barbed ends“ wieder erreicht ist und Aktinpolymerisation abläuft. Durch dieses „stop-and-go“ könnten die diskontinuierlichen Schweife erklärt werden. Dieser Mechanismus legt die Vermutung nahe, daß eine Funktion von ActA darin besteht, freie Aktinfilamente vor dem „Capping“ zu schützen (Cossart und Lecuit, 1998).

Die bisherigen Daten ergeben zusammenfassend folgendes Bild: ActA liegt auf der Bakterienoberfläche als Dimer oder Tetramer vor, wobei die Hauptaufgabe von ActA darin besteht, als langgestrecktes, flexibles Gerüstprotein Andockstellen für Wirtszellproteine zur Verfügung zu stellen. An den vier EVH-1-Bindungsstellen im zentralen prolinreichen Bereich ist jeweils ein VASP-Tetramer gebunden. VASP rekrutiert Profilin, welches Aktinmonomere bindet und an den N-terminalen Teil von ActA weitergibt, wo die freien „barbed ends“ vom ebenfalls an den N-terminalen Bereich gebundenen Arp2/3-Komplex verlängert und gleichzeitig vor dem „Capping“ geschützt werden (Cicchetti *et al.*, 1999).

Neben der Induktion der Aktinpolymerisation wird ActA noch eine zweite Aufgabe bei der Invasion von *L. monocytogenes* in Epithelzellen und Makrophagen zugeschrieben, da ActA-Deletionsmutanten im Gegensatz zum Wildtyp weniger invasiv sind (Alvarez-Dominguez *et al.*, 1997). ActA bindet an Heparansulfat-Proteoglykane auf der Oberfläche der Zellen. Präinkubation der Listerien mit Heparin oder Heparansulfat verhinderte die Adhäsion und die nachfolgende Aufnahme der Listerien in Epithelzellen und Makrophagen. Adhäsion und Invasion verminderten sich auch signifikant durch spezifisches Entfernen von Heparansulfat von der Zelloberfläche. Der Malaria-Erreger *Plasmodium falciparum* bindet ebenfalls über das Circumsporozoiten-Protein (CS) an Heparansulfat auf der Oberfläche der Wirtszelle (Frevert *et al.*, 1993). Zugabe eines synthetischen Peptids, das der Bindungsstelle des CS-Proteins entspricht, konnte die Adhärenz der Listerien an die Zelloberfläche unterdrücken. Sequenzvergleiche zeigten, daß es im N-Terminus von ActA (AS 127-136) ein dem CS-Protein sehr ähnliches Motiv gibt (Alvarez-Dominguez *et al.*, 1997). Auch scheint ActA die Signaltransduktionskaskaden der Wirtszelle zu beeinflussen, da bei einer ActA-Deletionsmutante von *L. monocytogenes* die persistente Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B eingeschränkt ist (Hauf *et al.*, 1997).

1.4 LaXp180

Der systemische Lupus erythematosus (SLE) ist eine Autoimmunerkrankung, die sich in Arthritiden, Hauterscheinungen („Schmetterlingserythem“), Blutbildveränderungen, Nephritis, Pleuritis, bis hin zu Perikarditis und Endokarditis sowie neurologischen und psychischen Störungen äußern kann. Typisch für SLE ist das Auftreten antinukleärer Antikörper, Antikörper gegen Doppelstrang-DNA, gegen Erythrozyten, Leukozyten, Thrombozyten und Gerinnungsfaktoren. Eine Ausprägung der rheumatischen Erscheinungen, die beim SLE auftreten, stellt das sogenannte Sjögren-Syndrom dar. Neben dem Bindegewebe, das z.B. bei der rheumatischen Arthritis entzündet ist, sind vor allem exokrine Drüsen wie Tränen- und Speicheldrüsen entzündet und stellen die Sekretion ein, was zu einer Austrocknung der entsprechenden Stellen führt (Pschyrembel, 1993). Beim Sjögren-Syndrom spielen vor allem zwei Autoantigene eine Rolle, die Sjögren-Syndrom-assoziierten Antigene A (SS-A, Ro) und B (SS-B, La) (Tan, 1989). Die Bezeichnungen Ro und La stehen für die Initialen der Patienten, aufgrund deren Erkrankung die Antigene zuerst entdeckt wurden (Mattioli und Reichlin, 1974). Diese Antigene sind Bestandteile von Ribonukleoproteinpartikeln (RNPs), im Kern als snRNPs oder im Zytoplasma als scRNPs bezeichnet, die mit den Patientenseren koprizipitieren.

Das 50 kDa große nukleäre Phosphoprotein La (448 AS) ist phylogenetisch hoch konserviert (Bachmann *et al.*, 1986b) und unter normalen Bedingungen im Zellkern lokalisiert (Rutjes *et al.*, 1999). Bisher wurden La eine ganze Reihe verschiedenster Funktionen zugeschrieben. Um alle Funktionen erklären zu können, wird postuliert, daß La als RNA-Chaperon fungiert und die Sekundärstruktur von RNA stabilisiert (Yoo und Wolin, 1997; Kremerskothen *et al.*, 1998; Heise *et al.*, 1999). So spielt La offensichtlich eine Rolle bei der RNA-Polymerase-III-Transkription und -Termination (Gottlieb und Steitz, 1989b; Gottlieb und Steitz, 1989a; Maraia, 1996; Fan *et al.*, 1997), beim 3'-RNA-Prozessieren (Yoo und Wolin, 1997), bei der Stabilisierung von mRNAs (McLaren *et al.*, 1997), bei der Signaltransduktion der Mitose-induzierten Translation bestimmter mRNAs (Jefferies *et al.*, 1997), beim nukleären RNA-Import und Retention der RNA im Kern (Grimm *et al.*, 1997) und bei der Translation (Meerovitch *et al.*, 1993; Craig *et al.*, 1997). Weiter ist La eine ATP-abhängige Helikase, die dsRNA-Substrate entwindet. Unter ATP-Verbrauch kann La sowohl DNA-RNA-Hybride als auch doppelsträngige RNA (dsRNA) aufschmelzen (Bachmann *et al.*, 1990a; Hühn *et al.*, 1997). Ursprünglich wurde gezeigt, daß La an den 3'-Oligo(U)-Schwanz aller primären RNA-Polymerase-III Transkripte einschließlich der Vorläufermoleküle der 5S-rRNA, tRNAs und einiger 4,5S-rRNAs wie auch an die U1- (ein RNA-Polymerase-II Transkript) und an die U6-snRNA binden kann (Hendrick *et al.*, 1981; Madore *et al.*, 1984; Stefano, 1984; Rinke und Steitz, 1985; Pruijn *et al.*, 1990). Da diese Oligo(U)-Schwänze während der 3'-Prozessierung von den meisten Transkripten entfernt werden, ist die Bindung von La an diese RNAs nur transient. Das La-Protein bindet auch an einige virale RNAs von Adenoviren, Ebstein-Barr-Viren, Vesicular-Stomatitis-Viren (VSV), Tollwut-Viren, Polio-Viren, Human-Immundeficiency-Viren (HIV), Influenza-Viren, Rubella-Viren, Hepatitis-B- und -C-Viren (Francoeur und Mathews, 1982; Wilusz *et al.*, 1983; Kurilla *et al.*, 1984; Park und Katze, 1995; Svitkin *et al.*, 1994; Pogue *et al.*, 1996; Meerovitch *et al.*, 1989; Meerovitch *et al.*, 1993; Ali und Siddiqui, 1997; Spangberg *et al.*, 1999; Heise *et al.*, 1999). Da diese RNAs jedoch keinen 3'-Oligo(U)-Schwanz besitzen, muß demnach ein alternatives La-Bindungsmotiv vorliegen. Neueste Untersuchungen deuten darauf hin, daß La möglicherweise eine Rolle bei der Apoptose spielt, da es in der frühen Phase der Apoptose dephosphoryliert und gespalten wird (Rutjes *et al.*, 1999). Transfektionsversuche mit La haben weiter gezeigt, daß La auch die Replikation von *Herpes simplex*-Viren beschleunigt (Bachmann *et al.*, 1998).

Mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern gegen La (Bachmann *et al.*, 1986a; Chan *et al.*, 1989; Kohsaka *et al.*, 1990; Offen *et al.*, 1990; Tröster *et al.*, 1995) konnte gezeigt werden, daß La nicht nur im Zellkern vorkommt, sondern sich auch im Zytoplasma befindet und nach Induktion durch Streßfaktoren wie UV-Strahlung, *Herpes*-Infektion und Gabe von Transkriptioninhibitoren vom Nukleus in das Zytoplasma wandert und daraufhin sogar auf der äußeren Zellmembran vorkommt (Bachmann *et al.*, 1990b). Bei Infektion mit dem *Herpes simplex*-Virus ist La mit Viruspartikeln assoziiert in den Zellfortsätzen an der Zelloberfläche nachweisbar, die sich nach der Virusinfektion abschnüren und die Viren freisetzen (Bachmann *et al.*, 1992b). Auch bei mitotischen Zellen und Wachstumsstimulierten Zellen während des Übergangs von der G₀ in die G₁-Phase ist La auf der Zelloberfläche lokalisiert (Bachmann *et al.*, 1992a).

Der monoklonale Antikörper 4B6 (IgG) (Tröster *et al.*, 1995), der durch Immunisierung von Mäusen mit rekombinantem, humanem La gewonnen wurde, erkennt spezifisch La aus Mensch, Maus, Ratte und Rind. Immunfluoreszenzfärbungen von Zellen mit 4B6 und Patientenseren zeigen eine punktierte Kernfärbung, wobei die Färbung mit 4B6 feiner ist. 4B6 erkennt das Epitop SKGRRFKGKGGKGN im C-Terminus des humanen La-Proteins, das auch von einigen Patientenseren erkannt wird und vermutlich die ATP-Bindungsstelle enthält. Beim La-Protein von Ratte und Maus besteht das Epitop aus der Aminosäuresequenz SKG, unterbrochen von einem Spezies-spezifischen Insert aus 16 Aminosäuren, dann gefolgt von der zweiten Hälfte des Epitops, der Sequenz RRFKGGKGGKGN. Dies wird damit erklärt, daß die

beiden Teile des Epitops bei Ratte und Maus eventuell konformationell erkannt werden und somit dem humanen linearen Epitop ähnlich sehen (Tröster *et al.*, 1995).

Um kreuzreagierende Strukturen zu identifizieren, die möglicherweise an der Entstehung von Autoantikörpern beteiligt sind, wurde eine cDNA-Genbank aus peripheren Blutlymphozyten einer Patientin mit SLE und Symptomen des Sjögren-Syndroms mit ihrem eigenen Autoimmunserum, das monospezifisch mit La reagiert, und dem monoklonalen Antikörper 4B6 getestet (Tröster *et al.*, 1994). Sieben cDNA-Klone wurden isoliert, die mit 4B6 reagierten, von denen aber nur sechs mit dem Patientenserum reagierten. Die sechs doppelt reaktiven Klone enthielten alle La-cDNAs, während der andere Klon (pKS30) eine unbekannte cDNA enthielt. Diese cDNA, die offensichtlich ein „unbekanntes humanes Autoantigen“ kodiert, wurde ursprünglich als „Klon 30“ bezeichnet (Accession-Nr.: z35085) (Wenz, 1995). Diese cDNA enthielt ein offenes Leseraster für ein ca. 70 kDa großes Protein, für das beim Vergleich mit der EMBL-Datenbank jedoch keine Homologien zu bekannten Proteinen gefunden wurden. Da kein Stop-Codon vor dem potentiellen Start-Codon vorhanden war, wurde angenommen, daß die cDNA unvollständig ist und nur das 3'-Ende der kompletten cDNA enthielt. Die Voll-Länge cDNA, die für ein ca. 180 kDa Protein (1591 AS) kodiert, wurde schließlich im Rahmen des japanischen „human genome project“ sequenziert und unter der Bezeichnung „Human mRNA for KIAA0203 gene“ (Accession-Nr.: d86958) in der EMBL Datenbank abgelegt. Aufgrund der Kreuzreaktivität mit La wird das Protein jetzt als „LaXp180“ bezeichnet.

„Yeast Two-Hybrid“-Analysen haben gezeigt, daß LaXp180 über einen kurzen Bereich (AS 1085-1226) an das Phosphoprotein Stathmin bindet. Da die Interaktion dabei vermutlich über „coiled-coil“ Strukturen erfolgt, wurde LaXp180 ursprünglich als „CC1“ („coiled-coil forming protein 1“) bezeichnet (Maucuer *et al.*, 1995).

1.5 Stathmin

Stathmin, auch als Onkoprotein 18 (Op18), p19, 19K, p18, Metablastin oder ProsoLin bezeichnet, ist der Prototyp einer neuen Familie von Mikrotubuli-regulierenden Proteinen (Ozon *et al.*, 1997; Riederer *et al.*, 1997; Gavet *et al.*, 1998). Zu dieser Familie gehören weiter die neuronalen Proteine SCG10, SCLIP, RB3 und dessen Spleiß-Varianten RB3' und RB3''. Stathmin wurde erst 1996 als Mikrotubuli-destabilisierendes Protein in *Xenopus* Oocyten-Extrakten beschrieben (Belmont und Mitchison, 1996). Ursprünglich wurde Stathmin als hitzestabiles Protein identifiziert, das in Leukämien überexprimiert ist und in Abhängigkeit von extrazellulären Signalen unterschiedlich phosphoryliert wird. Daher vermutete man seine Funktion in einer Art Relais („Stathmos“ = griech. Relais), das verschiedene Signaltransduktionswege integriert (Sobel und Tashjian Jr., 1983; Hanash *et al.*, 1988; Sobel, 1991). Stathmin ist ein 19 kDa großes zytosolisches Protein, das keine signifikante Bindung an Mikrotubuli zeigt, wohl aber an Tubulin-Heterodimere aus α - und β -Tubulin. Die Interaktion erfolgt dabei mit α -Tubulin (vgl. Abb. 3) (Belmont und Mitchison, 1996; Curmi *et al.*, 1997; Jourdain *et al.*, 1997; Larsson *et al.*, 1997). Immunfluoreszenzanalysen an Interphasezellen mit anti-Stathmin-Seren ergaben eine punktierte Färbung im Zytoplasma, die um den Kern konzentrierter war. Das Färbemuster kolokalisierte weder mit den Mikrotubuli noch mit anderen Zytoskelett-Filamenten, was belegt, daß Stathmin nicht mit polymerisiertem Tubulin assoziiert ist (Gavet *et al.*, 1998). Der Phosphorylierungszustand von Stathmin wird in Abhängigkeit von externen und internen Signalen reguliert. Die Phosphorylierung von Stathmin erfolgt an vier Serinresten (Ser16, Ser25, Ser38, Ser63) durch Kinasen, die den Zellzyklus steuern und durch Kinase-Kaskaden, die an Rezeptoren der Zelloberfläche gekoppelt sind (siehe Abb. 3). Die Phosphorylierung dieser Serinreste in bestimmten Kombinationen durch verschiedene Kinasen schaltet die depolymerisierende Wirkung auf die Mikrotubuli ab. Stathmin überträgt somit externe und interne zelluläre Signale auf die Regulation der Polymerisation von Mikrotubuli.

Als Antwort auf externe Signale wird Stathmin z.B. über die Raf/MEK/ERK-Kaskade phosphoryliert: aktiviertes Raf phosphoryliert und aktiviert MEK-1 und MEK-2 (MAP/ERK-Kinase), die wiederum ERK1 bzw. ERK2 („extracellular signal-regulated kinase“) phosphorylieren und aktivieren. Die aktivierte MAP-Kinase ERK1 kann Stathmin an Ser25 und Ser38 phosphorylieren (Abb. 3) (Lovrić *et al.*, 1998). Raf-Kinasen spielen eine entscheidende Rolle bei der Regulation der Zellproliferation, Transformation, Differenzierung und Apoptose (Kolch *et al.*, 1991; Samuels und McMahon, 1994; Pumiglia und Decker, 1997; Sewing *et al.*, 1997; Woods *et al.*, 1997; Weissinger *et al.*, 1997). Da Stathmin ein wichtiges Substrat der MAP-Kinasen ERK-1 und ERK-2 *in vivo* ist, scheint die Reorganisation der Mikrotubuli bei diesen Prozessen eine Schlüsselrolle zu spielen (Lovrić *et al.*, 1998). Die Phosphorylierung von Ser25 und in geringem Maße auch von Ser38 durch Mitglieder der Familie von MAP-Kinasen („mitogen activated protein“) nach Zugabe von Phorbol ester, nach Stimulation des T-Zell Antigenrezeptors, durch Zugabe von „nerve growth factor“, durch Hitzeschock und chemischen Streß wurde bereits gezeigt (Beretta *et al.*, 1993; Marklund *et al.*, 1993a; Marklund *et al.*, 1993b; Beretta *et al.*, 1995). Stathmin kann weiter an Ser16 durch die CaM Kinasen II und IV/Gr („Ca²⁺/Calmodulin-dependent kinase“) als Antwort auf Calcium-Signale phosphoryliert werden (Marklund *et al.*, 1993a; Marklund *et al.*, 1994b; Melander Gradin *et al.*, 1997; Melander Gradin *et al.*, 1998; le Gouvello *et al.*, 1998). Weiter können cAMP-abhängige Proteinkinasen und PKA (Proteinkinase A) Stathmin an Ser16 und Ser63 phosphorylieren (Schubart *et al.*, 1987; Beretta *et al.*, 1993).

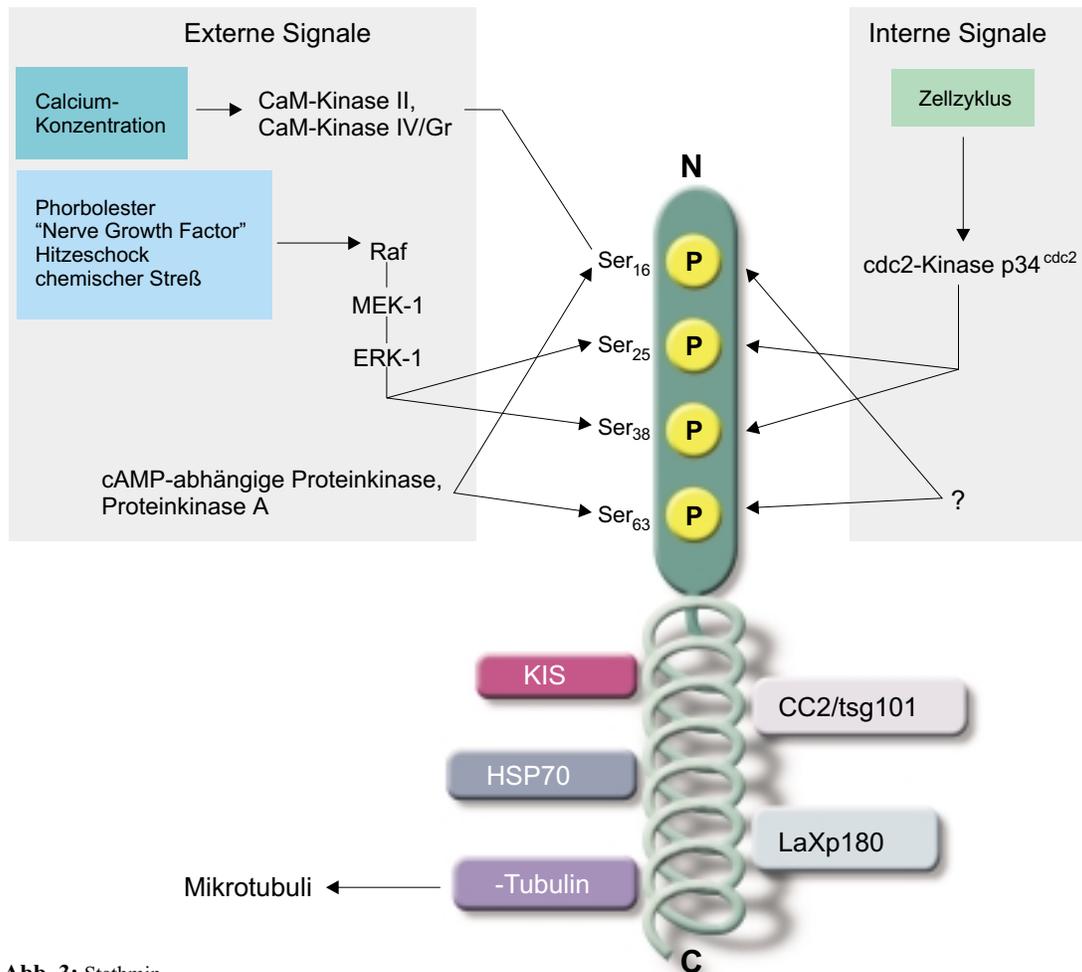


Abb. 3: Stathmin

Über interne Signale wird Stathmin beim Durchlaufen des Zellzyklus phosphoryliert. Damit eine Zelle in die Mitose-Phase übergehen und sich die Mitosespindel ausbilden kann, muß Stathmin durch Phosphorylierung aller vier Serin-Reste inaktiviert sein (Larsson

et al., 1997). Diese Phosphorylierung läuft sequenziell ab: Zuerst werden Ser25 und Ser38 durch die *cdc2*-Kinase p34^{*cdc2*} phosphoryliert, was dann die Phosphorylierung von Ser16 und Ser63 durch noch unbekannte Kinasen ermöglicht (siehe Abb. 3). In Säugerzellen reduziert die Überexpression von wildtypischem Stathmin den Anteil an polymerisiertem Tubulin in Form von Mikrotubuli, während die Mitosespindeln normal gebildet werden. Eine Mutation der p34^{*cdc2*}-Phosphorylierungsstellen in Stathmin führt zum völligen Verschwinden von polymerisiertem Tubulin, sowohl in der Interphase als auch während der Mitose (Marklund *et al.*, 1996; Larsson *et al.*, 1997). Demnach schaltet die Phosphorylierung bei der Mitose die destabilisierende Wirkung von Stathmin ab, was sowohl *in vitro* als auch *in vivo* gezeigt wurde (Horwitz *et al.*, 1997; Di Paolo *et al.*, 1997). Diese Inaktivierung setzt die Phosphorylierung von Ser16 und Ser63 voraus, die erst stattfinden kann, wenn Ser25 und Ser38 durch p34^{*cdc2*} phosphoryliert wurden. Die Inaktivierung von Stathmin ermöglicht dann die Ausbildung der Mitosespindel und führt insgesamt zu einem Anstieg der Konzentration an polymerisiertem Tubulin (Cassimeris, 1999). Die bedeutende Rolle von Stathmin während des Zellzyklus wird auch daran ersichtlich, daß bei Inhibition der Stathminexpression durch Antisense-RNA die Zelle im Übergang von der G₂- in die M-Phase arretiert (Luo *et al.*, 1994; Marklund *et al.*, 1994a).

Mikrotubuli haben definierte Enden: das schneller wachsende Plus-Ende und das langsamer wachsende Minus-Ende. Mikrotubuli bestehen aus linear angeordneten Heterodimeren aus α - und β -Tubulin. Die β -Tubulin Untereinheit zeigt zum Plus-Ende und α -Tubulin zum Minus-Ende. In Interphase-Zellen liegen die Minus-Enden im Centrosom-Komplex, die Plus-Enden zeigen zur Zellmembran. In der Mitosespindel sind die Plus-Enden mit den Kinetochor-Regionen der Chromosomen assoziiert. Die Dynamik der Mikrotubuli wird mit dem Modell der „dynamischen Instabilität“ beschrieben. Obwohl sich Mikrotubuli als Gesamtheit in einem Gleichgewichtszustand befinden, hat ein einzelnes Mikrotubuli-Filament nie die konstante Länge, die der Gleichgewichtszustand beschreibt, sondern durchläuft ständig lange Polymerisations- oder Depolymerisationsphasen, die eher selten abwechseln. Die „dynamische Instabilität“ wird durch vier Parameter beschrieben: die Polymerisations- und die Depolymerisationsrate, sowie die Häufigkeit von „Katastrophen“ und von „Rescues“. Als „Katastrophe“ wird dabei der schnelle Übergang von einer Polymerisations- in eine Depolymerisationsphase bezeichnet, als „Rescue“ der von einer Depolymerisations- in eine Polymerisationsphase. In der Depolymerisationsphase werden GTP-Tubulin-Untereinheiten an das Ende einer Mikrotubuli-Faser angelagert. Noch während oder gleich nach der Polymerisation hydrolysieren die Tubulin-Untereinheiten das gebundene GTP und setzen das hydrolysierte Phosphat frei. In der Depolymerisationsphase werden GDP-Tubulin-Untereinheiten sehr schnell von den Enden der Mikrotubuli freigesetzt. Mikrotubuli, die *in vitro* aus gereinigtem Tubulin polymerisiert wurden, sind viel weniger dynamisch als Mikrotubuli *in vivo*. So wachsen die Plus-Enden in Säugerzellen zehnmal schneller, und Katastrophen bzw. „Rescues“ treten zehnmal häufiger auf. Daher wird angenommen, daß die dynamische Instabilität durch zelluläre Proteine reguliert wird (Desai und Mitchison, 1997).

Stathmin besteht aus zwei Domänen, einer N-terminalen regulatorischen Domäne mit den vier Phosphorylierungsstellen, und einer C-terminalen α -helikalen „Interaktions“-Domäne, die über „coiled-coil“-Strukturen Wechselwirkungen mit anderen Proteinen eingehen kann (siehe Abb. 3) (Doye *et al.*, 1989; Maucuer *et al.*, 1990; Beretta *et al.*, 1993; Curmi *et al.*, 1994). Der Wirkungsmechanismus von Stathmin kann entweder darauf beruhen, daß Stathmin Tubulin-Dimere abfängt oder den Zustand der Katastrophe einleitet. Sowohl das Abfangen von Tubulin-Dimeren (Curmi *et al.*, 1997; Jourdain *et al.*, 1997) als auch die Einleitung der Katastrophe (Belmont und Mitchison, 1996) wurden *in vitro* als getrennte Ereignisse nachgewiesen. Kürzlich konnte gezeigt werden, daß Stathmin beide Aktivitäten in sich vereint, wobei die beiden Funktionen *in vitro* durch Veränderungen des pH-Wertes abgegrenzt oder durch Deletion spezifischer Bereiche unterschiedlichen Domänen

zugeordnet werden konnten. Da Stathmin die Katastrophenrate bei physiologischem pH-Wert (pH~7,4) erhöht, während die Bindung an die Tubulin-Heterodimere bei einem eher unphysiologischen pH-Wert (pH~6,8) stattfindet, wird vermutet, daß Stathmin Mikrotubuli in erster Linie durch Erhöhen der Katastrophenrate depolymerisiert. Bei Deletion der C-terminalen Domäne verliert Stathmin die Fähigkeit, Tubulin-Dimere zu binden und abzufangen, wohingegen bei Deletion der N-terminalen Domäne auch bei pH=7,4 keine Erhöhung der Katastrophenrate zu beobachten war (Howell *et al.*, 1999; Larsson *et al.*, 1999). Anzumerken ist noch, daß ein Protein, das selbst nur Tubulin-Dimere abfängt, in gewisser Weise zur Entstehung einer Katastrophe beiträgt, da eine niedrige Konzentration an freiem Tubulin automatisch die Katastrophe begünstigt (Walker *et al.*, 1988).

Die bereits oben beschriebene Suche nach Bindungspartnern von Stathmin über einen "Yeast Two-Hybrid Screen" führte zur Identifizierung der RNA-bindenden Kinase KIS („kinase interacting with Stathmin“), einem Protein der HSP70 Familie („heat shock protein 70“) und zwei Proteinen, die wahrscheinlich „coiled-coil“-Interaktionen eingehen können, CC1 („coiled-coil forming protein 1“) und das „tumor susceptibility protein“ CC2/tsg101 (Maucuer *et al.*, 1995; Li und Cohen, 1996; Maucuer *et al.*, 1997). CC1 wird inzwischen als „LaXp180“ bezeichnet (vgl. Abb. 3).

2 Ergebnisse

2.1 Vorarbeiten

In einer früheren Arbeit wurde unter Verwendung des „Yeast Two-Hybrid“-Systems, eines genetischen Systems zum Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen *in vivo*, nach Wirtszellproteinen gesucht, die mit ActA von *Listeria monocytogenes* interagieren (Pfeuffer, 1996). Hierzu wurde *actA* ohne die kodierenden Bereiche für die N-terminale Signalsequenz und den C-terminalen Membrananker in das GAL4-DNA-Bindungsdomäne (DB)-Plasmid pPC97 (Kalmes *et al.*, 1998) kloniert. Das dadurch entstandene Plasmid pPC97-ActA kodiert das ActA-DB-Fusionsprotein. Die für die Amplifikation des *actA*-Gens verwendeten Primer sind aus Tabelle 2 ersichtlich. Die Expression des ActA-DB-Fusionsproteins in den Hefestämmen *Saccharomyces cerevisiae* SFY526 und HF7c wurde über Western-Blots nachgewiesen. Da in beiden Hefestämmen nach Transformation des Plasmids pPC97-ActA die jeweiligen Reportergene (HIS3 bzw. *lacZ*) nicht aktiviert wurden, konnte das von pPC97-ActA kodierte Fusionsprotein als Köder eingesetzt werden, um mit ActA interagierende Proteine zu isolieren, die von der embryonalen Maus-cDNA-Genbank pPC67 (Chevray und Nathans, 1992) kodiert werden. Die Genbank pPC67 kodiert cDNA-Transkriptionsaktivator-Domäne (TA)-Fusionsproteine im Vektor pPC86 (vgl. Abb. 5A). Ungefähr $3,3 \cdot 10^6$ Klone, die ca. $2 \cdot 10^6$ der ursprünglichen cDNAs repräsentieren, wurden im Stamm HF7c auf mit ActA interagierende Proteine (AIPs) durchsucht. Zwischen zwei und sieben Tagen nach der Transformation sind insgesamt 89 Kolonien auf Histidin-freien Platten gewachsen, von denen 25 (28,1%) neben dem Reportergen HIS3 auch das zweite Reportergen *lacZ* aktiviert hatten. Diese 25 pPC67-cDNA Plasmide wurden isoliert und nach einer Passage in *E. coli* in die beiden Hefestämme, die bereits das Plasmid pPC97-ActA enthielten, rücktransformiert. Nach dieser zusätzlichen Kontrolle zur Eliminierung falsch Positiver konnten nur noch vier Klone das *lacZ*-Gen aktivieren. Ein solcher Rückgang an positiven Klonen nach der Rücktransformation wurde auch bei anderen „Yeast Two-Hybrid“-Tests beobachtet. Negativkontrollen, bei denen die vier pPC67-cDNA Plasmide (pPC67-15, pPC67-18, pPC67-37 und pPC67-70) alleine oder zusammen mit dem leeren Vektor pPC86 in beide Hefestämme transformiert wurden, führten nicht zu einer Aktivierung des *lacZ*-Gens. Jedes der vier pPC67-cDNA Plasmide konnte das *lacZ*-Reportergen nur zusammen mit pPC97-ActA aktivieren, was darauf schließen läßt, daß die cDNAs dieser vier Plasmide Proteine oder Proteinfragmente kodieren, die mit ActA interagieren.

Die cDNA-Inserts dieser vier Plasmide wurden komplett (pPC67-15) oder partiell bis zum Stop-Codon (pPC67-18, pPC67-37 und pPC67-70) sequenziert. Die Sequenzen sind in der EMBL Nukleotidsequenz-Datenbank veröffentlicht und im Anhang A.1 abgedruckt. Eine Übersicht über die Nukleotid- und die entsprechenden Peptid-Daten, sowie die jeweiligen Accession-Nummern der EMBL-Datenbank zeigt Tabelle 1.

Die cDNA-Inserts aller vier pPC67-cDNA Plasmide sind unvollständig und kodieren jeweils nur die C-terminalen Enden der mit ActA interagierenden Proteine (AIPs), ein Phänomen das oft bei „Yeast Two-Hybrid“-Tests auftaucht. Mit dem GCG (Genomic Computer Group)-Programm FASTA (Pearson und Lipman, 1988) wurden verschiedene Datenbanken auf homologe Sequenzen durchsucht und auch die einzelnen Sequenzen der

Sy-Programme (Expert Protein Analysis System) (<http://www.expasy.ch>) auf dem Server des Schweizer Instituts für Bioinformatik (SIB) ausgehend von dem von der Nukleotidsequenz (Accession-Nr. D86958) abgeleiteten offenen Leseraster ermittelt. Die Aminosäuresequenz des offenen Leserasters von LaXp180 sowie alle Primärstrukturdaten befinden sich im Anhang [A.2](#).

Anzahl der Aminosäuren:	1591
Theoretisches Molekulargewicht:	182817.5 Da
Theoretischer pI:	5.31

Die Aminosäurezusammensetzung ist unter [A.2.2](#) abgedruckt. Das offene Leseraster enthält insgesamt 271 positiv (Asp + Glu) und 211 negativ geladene Reste (Arg + Lys). Die berechnete Halbwertszeit für das Protein in Reticulozyten beträgt ca. 30 h. LaXp180 ist daher als instabil einzuschätzen.

Das Durchsuchen des offenen Leserasters mit dem Programm SCANPROSITE auf markante Sequenzmotive, die in der Datenbank PROSITE abgelegt sind, lieferte drei mögliche N-Glykosylierungs-Stellen, zwei Phosphorylierungsstellen der cAMP- und cGMP-abhängigen Proteinkinase, 22 Phosphorylierungsstellen der Proteinkinase C, 35 Phosphorylierungsstellen der Caseinkinase II, zwei Phosphorylierungsstellen der Tyrosinkinase, eine N-Myristoylierungsstelle, eine Amidierungsstelle, ein Motiv zum Verankern in der Zellwand und ein Leucin-Zipper-Motiv. Die genaue Auflistung der einzelnen Motive befindet sich unter [A.2.3](#). Bei der Verteilung der Phosphorylierungsstellen über das gesamte Protein fällt auf, daß der Großteil aller Phosphorylierungsstellen in der N-terminalen Hälfte von LaXp180 liegt.

Mit dem Programm PSORT, das Transportsignale und Lokalisationssequenzen auswertet, wurde eine Vorhersage der Lokalisation von LaXp180 in der Zelle getroffen. Aufgrund einer Kernlokalisationssequenz (NLS) (KPRK, AS 566-569) und des Leucin-Zipper DNA-Bindungsmotivs wurde errechnet, daß LaXp180 mit einer Wahrscheinlichkeit von 69.6 % ein Kernprotein ist. Mit einer Wahrscheinlichkeit von 13 % liegt es zytoplasmatisch, von 8.7 % mit dem Zytoskelett assoziiert, von 4.3 % vakuolär und von 4.3 % in Mitochondrien vor. Die Kernlokalisationssequenz entspricht dabei der „klassischen“ NLS des „large T antigens“ des SV40 Virus ([Hicks und Raikhel, 1995](#)).

Die Aminosäuresequenz von LaXp180 wurde mit dem Programm COILS überprüft, ob Sequenzbereiche sog. „coiled coil“-Strukturen ausbilden können. „Coiled-coil“-Bereiche können an andere „coiled-coil“-Bereiche binden, die auf dem gleichen oder einem anderen Protein liegen. Wie in [Abb. 6](#) ersichtlich, kann fast die komplette C-terminale Hälfte von LaXp180 „coiled-coils“ ausbilden.

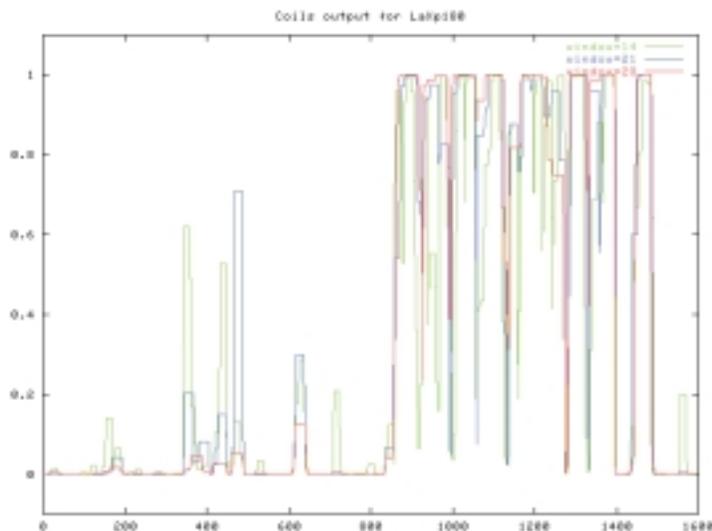


Abb. 6: „Coiled-coil“-Bereiche in LaXp180. Graphische Ausgabe des EXPASY (Expert Protein Analysis System) Programms `Coils` für die Aminosäuresequenz von LaXp180. X-Achse: Aminosäurepositionen von LaXp180; Y-Achse: Wahrscheinlichkeit, „coiled-coil“-Strukturen auszubilden über einen Bereich von 14 AS (grün), 21 AS (blau) und 28 AS (rot). Fast die gesamte C-terminale Hälfte von LaXp180 kann „coiled-coil“-Strukturen ausbilden.

Aufgrund dieser computergestützten Vorhersagen handelt es sich bei LaXp180 offen-

sichtlich um ein ca. 180 kDa großes Kernprotein, das über ein Leucin-Zipper-Motiv an DNA binden kann. Es besteht vermutlich aus einer N-terminalen regulatorischen Domäne, die an vielen Stellen von unterschiedlichen Kinasen phosphoryliert werden kann, und einer C-terminalen Interaktionsdomäne, die über „coiled-coil“-Strukturen an andere Proteine binden kann.

2.3 Interaktion von ActA-Fragmenten mit dem C-Terminus von LaXp180

Um herauszufinden, welcher Bereich von ActA für die Interaktion mit LaXp180 verantwortlich ist, wurden verschiedene ActA-Fragmente (Abb. 7) als GAL4-DB-Fusionsproteine im „Yeast Two-Hybrid“-System auf Interaktion mit dem von pPC67-15 kodierten C-Terminus (AS 1363-1591, vgl. Abb. 4B) von LaXp180 getestet, der an GAL4-TA fusioniert ist. Die DNA-Sequenzen der Fragmente wurden über eine im 5'-Primer enthaltene *SalI*-Schnittstelle und im 3'-Primer enthaltene *BglII*-Schnittstelle in den Vektor pPC97 kloniert. Die Nukleotidsequenzen aller ActA-Fragmente mit Ausnahme von Δ PActA wurden aus einem Lysat von *L. monocytogenes* EGD über PCR amplifiziert (Bubert *et al.*, 1997). Die Nukleotidsequenz von Δ PActA wurde aus einem Lysat des Stammes *L. monocytogenes* A49 amplifiziert, der ein *actA*-Gen enthält, dem der zentrale prolinreiche Bereich fehlt. In Abb. 7 sind die ActA-Fragmente schematisch dargestellt, Tabelle 2 gibt eine Übersicht über die ActA-Fragmente und die zur Amplifizierung ihrer DNA-Sequenzen verwendeten Primerpaare.



Abb. 7: Schematische Darstellung des ActA-Proteins und der ActA-Fragmente, die als Fusionsproteine an die GAL4-DNA-Bindungsdomäne (DB) im Vektor pPC97 exprimiert werden.

ActA	AS 30 - 613	5'-CGAGGTCGACAGCGACAGATAGCGAAGAT-3' 5'-TAGTAGATCTGCGTCGTATGGTTCCTGGTTCTTC-3'
NActA	AS 30 - 263	5'-CGAGGTCGACAGCGACAGATAGCGAAGAT-3' 5'-GGTGGCGAGATCTCCGAAGCATTACCTCTTC-3'
PActA	AS 264 - 429	5'-AGGTAAAGTCGACGGACTTCCCGCCACCACCT-3' 5'-TCCTCTAGATCTTAAATCAGCTAGGCGATCAAT-3'
CActA	AS 423 - 613	5'-CAGAAGAGTCTGACTGATCGCTAGCTGATTTAAG-3' 5'-TAGTAGATCTGCGTCGTATGGTTCCTGGTTCTTC-3'
NPActA	AS 30 - 429	5'-CGAGGTCGACAGCGACAGATAGCGAAGAT-3' 5'-TCCTCTAGATCTTAAATCAGCTAGGCGATCAAT-3'
PCActA	AS 264 - 613	5'-AGGTAAAGTCGACGGACTTCCCGCCACCACCT-3' 5'-TAGTAGATCTGCGTCGTATGGTTCCTGGTTCTTC-3'
Δ PActA	AS 30 - 190 und 470 - 613	5'-CGAGGTCGACAGCGACAGATAGCGAAGAT-3' 5'-TAGTAGATCTGCGTCGTATGGTTCCTGGTTCTTC-3'

Tabelle 2: Die zur Herstellung der ActA-Fragmente verwendeten Primerpaare. Die in den Primern enthaltenen *SalI*- und *BglII*-Schnittstellen sind unterstrichen. Die Aminosäurepositionen beziehen sich auf Domann *et al.*, 1992.

Die Ergebnisse des „Yeast Two-Hybrid“-Tests zeigt Tabelle 3. Weder der N-terminale (NActA) noch der C-terminale Bereich von ActA interagiert mit LaXp180. Im Gegensatz dazu führt die Fusion des zentralen prolinreichen Bereichs (PActA) an GAL4-DB zu einer starken Expression des *lacZ*-Reportergens, jedoch auch in Abwesenheit von LaXp180. Solche falsch positiven Ergebnisse beim Testen des prolinreichen Bereichs im „Yeast Two-Hybrid“-System wurden auch von anderen Arbeitsgruppen beobachtet (Mourrain *et al.*,

1997). Jedoch ergab die Expression der größeren ActA-Fragmente NPActA und PCActA, die den prolinreichen Bereich und zusätzlich den N- bzw. C-terminalen Bereich enthalten, ein positives Ergebnis. Die Negativkontrollen mit dem leeren Vektor pPC86 führten zu keiner (PCActA) oder nur schwachen (NPActA) Expression des Reportergens. Diese Daten zeigen, daß der prolinreiche Bereich von ActA für eine effiziente Interaktion mit LaXp180 anscheinend essentiell ist, aber für eine spezifische Bindung zusätzlich flankierende Bereiche nötig sind. Im Gegensatz dazu führte aber auch die Expression einer ActA-Variante ohne den prolinreichen Bereich (Δ PactA) zu einer schwachen, aber reproduzierbaren Expression von *lacZ*, was auf eine schwache Interaktion von Δ PactA mit LaXp180 hinweist.

	ActA	NActA	PActA	CActA	NPActA	PCActA	Δ PactA
-	-	-	-	-	-	-	-
pPC86	-	-	+++	-	+	-	-
pPC67-15	+++	-	+++	-	+++	+++	+

Tabelle 3: Ergebnis des β -Galaktosidase-Tests zur Überprüfung der Interaktion verschiedener ActA-Fragmente mit dem C-Terminus von LaXp180 in *S. cerevisiae* SFY526 (untere Zeile). Die ActA-Fragmente werden dabei als GAL4-DB-Fusionsprotein in pPC97, der C-Terminus von LaXp180 (AS1363-1591) als GAL4-TA-Fusion in pPC67-15 exprimiert. Als Negativkontrollen wurden die Plasmide, die die verschiedenen ActA-Fragmente kodieren, alleine (obere Zeile) oder zusammen mit dem leeren Vektor pPC86 (mittlere Zeile) getestet.

2.4 Herstellung eines polyklonalen anti-LaXp180-Serums

Zur Aufreinigung von rekombinantem LaXp180 wurde das QIAexpressTM-System (Qiagen) verwendet, bei dem Proteine mit einem „Tag“ aus sechs Histidinen versehen werden, die dann über eine Ni-NTA-Matrix (Nickel-Nitrilotriacetat) affinitätschromatographisch gereinigt werden können. Hierzu wurde das von J. Laubinger (Institut für Physiologie, Universität Mainz) konstruierte Plasmid pQHS30 verwendet, welches das C-terminale Drittel des humanen LaXp180 (AS 1036-1591, vgl. Abb. 4B) mit einem N-terminalen His₆-Tag enthält. Die Klonierung von pQHS30 erfolgte in zwei Schritten: Zuerst wurde ein 178 bp Fragment über PCR vom Plasmid pKS30 mit den Primern 5'-CTAAGAGGATCCA-TGACAATTGAA-3' (die *Bam* *H1*-Schnittstelle ist unterstrichen) und 5'-CCAATTTACTCTGCAG-TTC-3' amplifiziert und in pGEM-T (Promega) ligiert, wodurch das Plasmid pGEM-T1 entstand. Anschließend wurde ein 160 bp *Bam* *H1*/*Pst* 1-Fragment aus pGEM-T1 in den Vektor pQE30 (Qiagen) kloniert. Der Vektor pKS30 wurde beim Screening einer cDNA-Expressionsbibliothek aus peripheren Blut-Lymphozyten mit dem monoklonalen Antikörper 4B6 kloniert (Tröster *et al.*, 1994).

Das rekombinante His₆-LaXp180-Fusionsprotein wurde in *E. coli* M15 [pREP4] überexprimiert und über Ni-NTA-Säulen (Qiagen) unter denaturierenden Bedingungen affinitätschromatographisch gereinigt. Die Überexpression des ~60 kDa großen His₆-LaXp180 war am stärksten bei einer Induktion bei einer OD₆₀₀=1,0 mit 1 mM IPTG, 4 h in 2YT-Medium bei 37 °C (Abb. 8A). Eine exemplarische affinitätschromatographische Aufreinigung von His₆-LaXp180 unter denaturierenden Bedingungen ist in Abb. 8B dargestellt. Alle Fraktionen, die das His₆-LaXp180-Fusionsprotein enthielten, wurden vereinigt, mit 10% TCA gefällt, und zusätzlich über SDS-PAGE gereinigt. Nach Färbung mit Coomassie-Blau wurde die entsprechende Proteinbande ausgeschnitten und das Protein über eine BIOTRAPTM-Apparatur (Schleicher & Schüll) elektroeluiert. Nach Einengung des Volumens durch Zentrifugation in CentriconTM YM-10-Röhrchen (Millipore) mit 10 kDa Ausschlußgröße wurde das Protein über eine SDS-PAGE mit anschließender Silberfärbung erneut auf Reinheit überprüft (Abb. 8C).

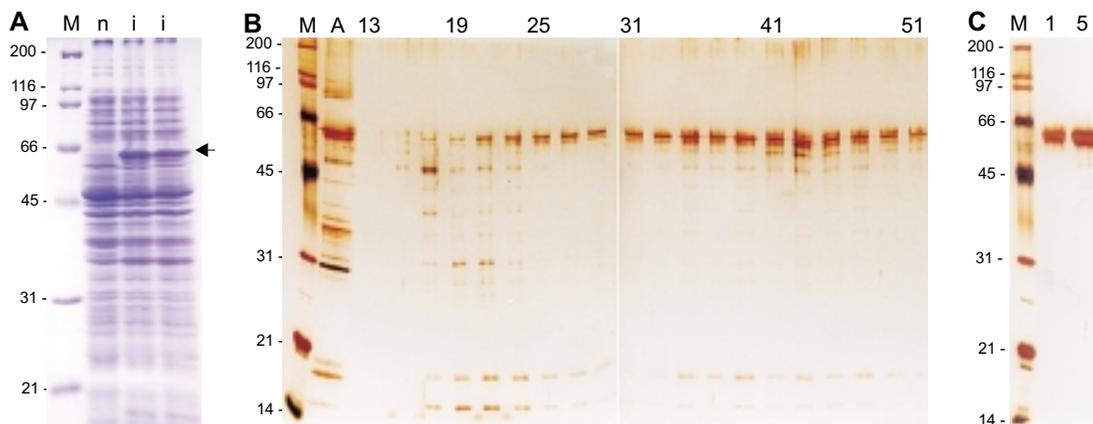


Abb. 8: Aufreinigung des rekombinanten His₆-LaXp180.

A: SDS-PAGE mit Gesamtprotein aus 150 µl Kultur von *E. coli* M15 pQHS30 nach Induktion mit 1 mM IPTG, 4 h (Coomassie-Blau Färbung). M: Marker, n: nicht induzierte Kontrolle, i: induzierte Ansätze. Das ca. 60 kDa große His₆-LaXp180 Fusionsprotein ist bei den induzierten Ansätzen deutlich sichtbar (Pfeil).

B: Elutionsprofil bei affinitätschromatographischer Aufreinigung von His₆-LaXp180 über eine Ni-NTA-Säule unter denaturierenden Bedingungen (Silberfärbung). M: Marker, A: Auftrag (Proteinextrakt, der auf die Säule gegeben wird), entspricht 10 µl Kultur von *E. coli* M15 pQHS30; anschließend wurden je 10 µl aller ungeradzahlgigen Fraktionen von 13-51 aufgetragen.

C: Gereinigtes His₆-LaXp180 nach zusätzlicher Aufreinigung über SDS-PAGE, Ausschneiden der 60 kDa-Bande und Elektroelution (Silberfärbung). M: Marker und 1 bzw. 5 µl gereinigtes Protein (0,33 µg/µl).

Mit dem gereinigten His₆-LaXp180 wurde ein New-Zealand-White Kaninchen (Charles River) zwischen den Schulterblättern mit 200 µg Protein und dem gleichen Volumen „Freund´s Adjuvant Complete“ (Sigma) immunisiert. Sechs und elf Wochen nach der ersten Immunisierung erfolgten „Booster“-Injektionen mit je 150 µg His₆-LaXp180 und dem gleichen Volumen „Freund´s Adjuvant Incomplete“ (Sigma). Das anti-LaXp180-Serum wurde 16 Wochen nach der ersten Immunisierung entnommen. Das vor der Immunisierung getestete Präimmenserum des Kaninchens zeigte keine Kreuzreaktionen mit Proteinen aus *L. monocytogenes*, *E. coli* und Säugerzellextrakten. Das anti-LaXp180-Serum reagiert auch in relativ hohen Konzentrationen sehr spezifisch mit dem rekombinanten His₆-LaXp180 in Gesamtlysaten von *E. coli* M15 pQHS30 und zeigt auch keine Kreuzreaktionen mit Proteinen aus *L. monocytogenes*, *E. coli* und Säugerzellen (Abb. 9A).

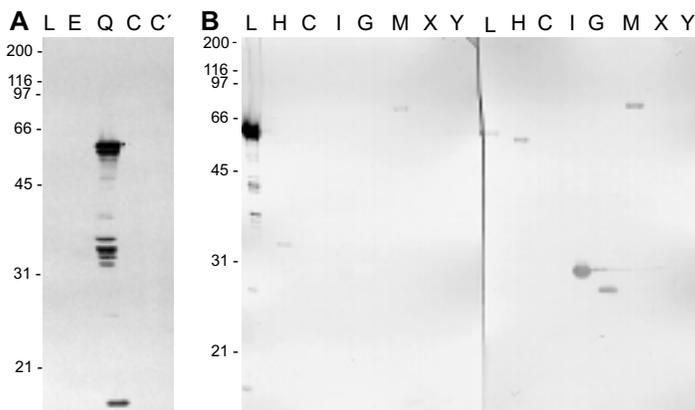


Abb. 9: Kontrolle des anti-LaXp180-Serums.

A: Western-Blot mit dem anti-LaXp180-Serum (1:500). Sekundärantikörper: SC-2004 (1:1000); Chloronaphthol-Entwicklung. L: Gesamtprotein aus 80 µl Kultur von *L. monocytogenes* EGD pERL3-79/1 nach MEM-Shift; E: Gesamtprotein aus 40 µl Kultur von *E. coli* M15 (Negativkontrolle); Q: Gesamtprotein aus 40 µl Kultur von *E. coli* M15 pQHS30 nach Induktion mit 1 mM IPTG, 4 h; C und C': Gesamtprotein aus Cos-1 Säugerzellen, 8 µl (C) bzw. 16 µl (C') (1 µl ca. 800 Zellen). Das anti-LaXp180-Serum reagiert auch in der relativ hohen Konzentration von 1:500 sehr spezifisch nur mit dem rekombinanten His₆-LaXp180 im Gesamtlysat von *E. coli* M15 pQHS30. Die anderen Banden in dieser Spur müßten His₆-LaXp180 Abbauprodukte sein, da

die erkannten Proteine allesamt kleiner sind und keine Kreuzreaktion mit *E. coli* M15 auftritt. Das Antiserum kreuzreagiert weder mit listeriellen noch mit Proteinen aus Säugerzellen.

B: Kreuzreaktivität mit anderen His₆-Tag Proteinen. Das anti-LaXp180-Serum wurde im Western-Blot auf Kreuzreaktivität mit verschiedenen rekombinanten eukaryotischen und prokaryotischen Proteinen mit einem His₆-Tag am N- oder C-Terminus (His₆^N bzw. His₆^C) getestet. Anti-LaXp180-Serum: 1:1000; Sekundärantikörper: SC-2004, 1:1000; Chloronaphthol-Entwicklung (linker Blot). Zur Kontrolle wurde der rechte Blot mit einem kommerziellen anti-His₆ Antikörper (Qiagen #34660), 1:1000, und sonst gleichen Bedingungen entwickelt. L: His₆^N-LaXp180, 0,1 µg; H: His₆^N-HlyA, 0,2 µg; C: His₆^N-CTex, 0,2 µg; I: His₆^N-InlC, 0,2 µg; G: His₆^C-GST, 0,2 µg; M: His₆^N-Mx, 0,2 µg; X: His₆^C-La, 0,2 µg; Y: His₆^N-La-C-Terminus, 0,2 µg. Das Anti-LaXp180 Serum zeigt nur mit His₆^N-Mx eine schwache Kreuzreaktion. Die Bande in Spur 2 scheint ein Abbauprodukt zu sein, da His₆^N-HlyA größer ist (siehe rechter Blot). Das Anti-LaXp180-Serum reagiert auch nicht mit La, obwohl LaXp180 als kreuzreaktives Protein mit einem anti-La-Antikörper isoliert wurde. Die His₆-Proteine wurden freundlicherweise zur Verfügung gestellt von C. Hüttinger (His₆^N-HlyA), J. König (His₆^N-CTex), S. Hom (His₆^N-InlC), Lehrstuhl für Mikrobiologie, Uni Würzburg, sowie von J. Laubinger, Institut für Physiologie, Uni Mainz (His₆^C-GST, His₆^N-Mx, His₆^C-La, His₆^N-La-C-Terminus).

Das anti-LaXp180-Serum wurde auch auf Kreuzreaktivität mit anderen rekombinanten eu- und prokaryotischen Proteinen mit His₆-Tag am N- oder C-Terminus getestet. Von sieben getesteten Proteinen reagierte das Antiserum nur schwach mit His₆-Mx. Beim Vergleich der jeweils ersten Spuren („L“) des rechten und linken Blots in Abb. 9B wird auch deutlich, daß das anti-LaXp180-Serum das LaXp180-Protein und nicht den His₆-Tag erkennt (Spur L im linken Blot), da vom anti-LaXp180-Serum zahlreiche Abbauprodukte erkannt werden, die offensichtlich keinen His₆-Tag besitzen, während der anti-His₅-Antikörper (Qiagen) im rechten Blot nur das vollständige Fusionsprotein erkennt.

Da das Serum in Immunfluoreszenzfärbungen in hohen Konzentrationen (1:20) leichte Kreuzreaktivität mit *L. monocytogenes* EGD zeigte, wurde das Antiserum für solche Färbungen mit *L. monocytogenes* EGD präadsorbiert, indem 1 ml Antiserum zu einem Pellet aus 2 ml einer logarithmisch gewachsenen *L. monocytogenes* EGD Kultur gegeben und gevortext, 20 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend abzentrifugiert wurde. Der ganze Vorgang wurde anschließend noch zweimal wiederholt.

2.5 Herstellung eines polyklonalen anti-ActA-Serums

Rekombinantes ActA wurde unter Verwendung des ImpactTM I-Systems (New England Biolabs) aufgereinigt. Hierbei wird ActA als ActA-Intein-CBD („chitin binding domain“)-Fusionsprotein exprimiert. Durch die CBD wird das Fusionsprotein an einer Chitin-Säule gebunden. Anschließend wird unter reduzierenden Bedingungen das anfusionierte ActA durch die Intein-Domäne abgespalten und von der Säule eluiert. Die Nukleotidsequenz, die das ActA-Protein (AS 30-607) ohne die N-terminale Signalsequenz und den C-terminalen Membrananker kodiert, wurde über PCR mit dem 5'-Primer 5'-GGTGGGTCCATGGCGACAG-ATAGCGAAGATTCTAG-3' (*Nco*I-Schnittstelle unterstrichen) und dem 3'-Primer 5'-GTATGGT-TCCCGGGTTCTTCCTTCGCTTTTTTCGTCTTC-3' (*Xma*I-Schnittstelle unterstrichen) aus *L. monocytogenes* EGD-Lysat amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde über die *Nco*I- und *Xma*I-Schnittstelle in den Vektor pCYB4 (New England Biolabs) kloniert. Das dadurch entstandene Plasmid pCYB-ActA kodiert das ActA-Intein-CBD-Fusionsprotein.

Die Überexpression des ~150 kDa großen ActA-Intein-CBD-Fusionsproteins in *E. coli* DH5α war am stärksten bei 30 °C, 4 h in 2YT-Medium nach Induktion mit 1 mM IPTG. Die OD₆₀₀ im Bereich von 0,5 bis 1,5 zum Zeitpunkt der Induktion hatte keinen Einfluß auf die Stärke der Überexpression. Die Überexpression des ActA-Intein-CBD-Fusionsproteins war jedoch wesentlich geringer als bei His₆-Tag Proteinen. Eine starke Überexpression ist auch nicht gewollt, da Intein-CBD-Fusionsproteine nativ aufgereinigt werden müssen. Starke Überexpression hätte zur Folge, daß das Fusionsprotein in Einschlußkörpern vorliegt und nur noch denaturierend in Lösung gebracht werden kann. Das denaturierte Protein bindet aber nicht mehr an Chitin und die Intein-Domäne verliert ihre Selbstspaltungs-Aktivität.

Der native Zellextrakt mit dem überexprimierten ActA-Intein-CBD-Fusionsprotein wurde auf eine Chitin-Säule geladen. Nach gründlichem Waschen wurde die Selbstspaltung des noch an der Chitin-Matrix gebundenen Fusionsproteins durch Zugabe von DTT induziert. ActA eluiert, während der Intein-CBD-Teil auf der Säule verbleibt. Die Analyse der Fraktionen über SDS-PAGE und Coomassie-Blau-Färbung zeigte neben einer dünnen Bande auf Höhe von ca. 90 kDa, die dem rekombinanten ActA aufgrund der Größe entspricht, weitere, zum Teil sehr starke Banden kleinerer Proteine (Abb. 10A). Ein Western-Blot mit einem Antiserum, das durch Immunisierung eines Kaninchens mit synthetischen Peptiden aus ActA gewonnen wurde (Z. Sokolovic, Lehrstuhl für Mikrobiologie der Universität Würzburg), bestätigte die Vermutung, daß es sich um Abbauprodukte des 90 kDa-ActA handelte (Abb. 10B). Alle Fraktionen, die rekombinantes ActA bzw. ActA-Abbauprodukte enthielten, wurden vereinigt und über ein präparatives SDS-Gel aufgetrennt. Nach Färbung mit Coomassie-Blau wurde neben der 90 kDa Bande auch die

sehr starke Doppelbande auf Höhe von 42 und 44 kDa ausgeschnitten und separat über das BIOTRAPTM-System elektroeluiert. Die Volumina der Proteinpräparationen wurden durch Zentrifugation in CentriconTM YM-10-Röhrchen mit 10 kDa Ausschlußgröße eingengt und über SDS-PAGE mit anschließender Silberfärbung erneut auf Reinheit überprüft (Abb. 10C). Mit den Proteinpräparationen wurde je ein New-Zealand-White Kaninchen (Charles River) zwischen den Schulterblättern immunisiert.

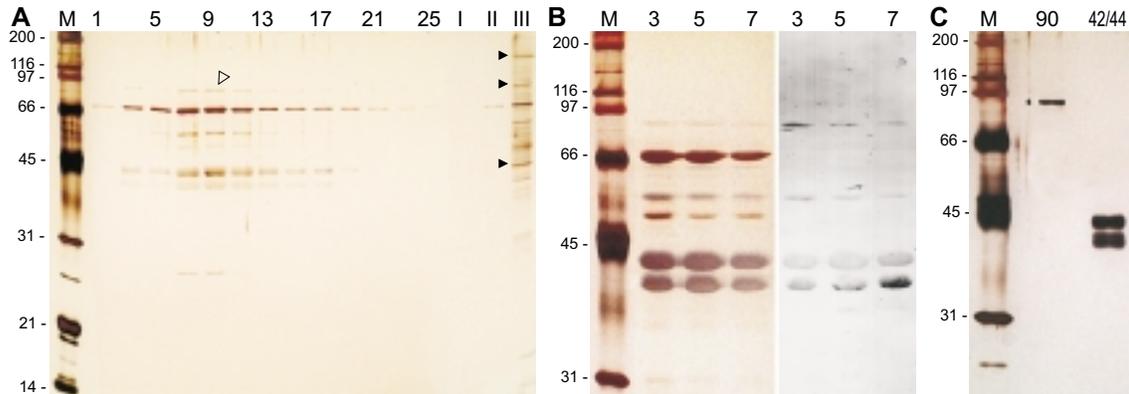


Abb. 10: Aufreinigung von rekombinantem ActA:

A: Elutionsprofil bei Aufreinigung von rekombinantem ActA mit dem ImpactTM I-System (New England Biolabs). ActA wird als 150 kDa ActA-Intein-CBD ("chitin binding domain")-Fusionsprotein in *E. coli* DH5 überexprimiert und auf einer Chitin-Säule gebunden. Durch Zugabe von DTT wird die Selbstspaltung des Inteins induziert. Das rekombinante ActA (90 kDa, ◁) wird von der Säule eluiert, während der Intein-CBD-Teil auf der Säule verbleibt. Von den ungeradzahligen Fraktionen à 1,5 ml (arabische Ziffern) sind jeweils 20 µl aufgetragen. Die beim Reinigen der Säule mit Regenerationspuffer aufgefangenen Fraktionen (römische Ziffern) enthalten neben dem abgespaltenen ActA (90 kDa, ◁) auch noch das ungespaltene Fusionsprotein (150 kDa, ◀) und den Intein-CBD-Teil (45 kDa, ▶). Silberfärbung; M: Marker.

B: Westernblot der Fraktionen 3, 5 und 7 mit einem anti-ActA-Peptidantikörper. Neben der dünnen Bande auf Höhe von 90 kDa enthalten auch die 55 kDa-Bande und die starke 42/4 kDa-Doppelbande ActA-Fragmente. Links Silberfärbung, rechts Blot mit dem Peptidantikörper 1:100; Sekundärantikörper: SC-2004 (1:1000), Chloronaphthol-Entwicklung; M: Marker.

C: Die 90 kDa- bzw. 42/44 kDa-Proteinpräparationen nach zusätzlicher Aufreinigung über SDS-PAGE, Ausschneiden der 90 kDa-Bande bzw. der 42/44 kDa-Doppelbande und Elektroelution. Silberfärbung; von jeder Präparation ist 1 µl aufgetragen; M: Marker.

Kaninchen 1 wurde mit 200 µg des 90 kDa-ActA und dem gleichen Volumen „Freund´s Adjuvant Complete“ (Sigma) immunisiert, Kaninchen 2 mit 200 µg der 42/44 kDa-ActA-Präparation und dem gleichen Volumen „Freund´s Adjuvant Complete“. Nach Vier Wochen erfolgte bei beiden Kaninchen eine „Booster“-Injektion mit je 100 µg der entsprechenden Proteinpräparation und dem gleichen Volumen „Freund´s Adjuvant Incomplete“ (Sigma). Da der Titer bereits sehr hoch war, wurde jedem Kaninchen fünf Wochen nach der ersten Immunisierung eine größere Menge Blut (35 ml) entnommen. Elf Wochen nach der ersten Injektion war der Titer erneut sehr hoch, weshalb Kaninchen 1 ausgeblutet wurde. Kaninchen 2 wurde ein zweites Mal mit 100 µg der 42/44 kDa-Proteinpräparation und dem gleichen Volumen „Freund´s Adjuvant Incomplete“ „geboostert“. 17 Wochen nach der ersten Immunisierung wurde Kaninchen 2 die letzte größere Menge Serum entnommen.

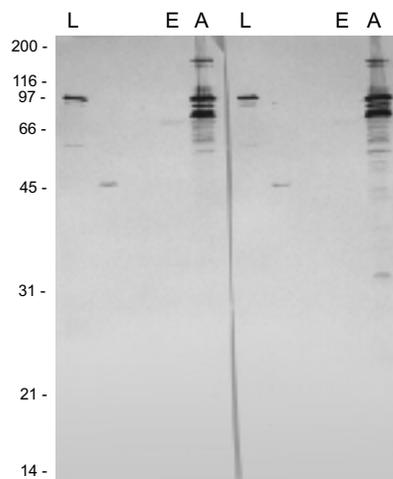


Abb. 11: Kontrolle der anti-ActA-Seren.

Western-Blot mit den anti-ActA-Seren (1:1000). Der linke Blot wurde mit dem anti-ActA-Serum 1, der rechte mit dem anti-ActA-Serum 2 entwickelt. Sekundärantikörper: SC-2004 (1:1000); Chloronaphthol-Entwicklung. L: Gesamtprotein aus 80 µl Kultur von *L. monocytogenes* EGD pERL3-79-1 nach MEM-Shift (97 kDa-ActA); : Gesamtprotein aus 80 µl Kultur von *L. monocytogenes* A49 pERL3-79-1 nach MEM-Shift (verkürztes 47 kDa-ActA, dem der prolinreiche Bereich fehlt); : Gesamtprotein aus 80 µl Kultur von *L. monocytogenes* 2 pERL3-79-1 (das *actA*-Gen fehlt komplett); E: Gesamtprotein aus 60 µl Kultur von *E. coli* pCYB4 (Negativkontrolle); A: Gesamtprotein aus 60 µl Kultur von *E. coli* pCYB-ActA (ActA-Intein-CBD-Fusionsprotein) nach Induktion der Überexpression des ActA-Fusionsproteins mit 1 mM IPTG bei 30°C über 4 h in 2YT Medium. Beide Seren reagieren sehr spezifisch mit ActA bzw. mit ActA-Abbauprodukten. Auch das ActA ohne den prolinreichen Bereich wird auf Höhe von 47 kDa erkannt (). Im *E. coli* pCYB4-Lysat (Negativkontrolle) wird nur eine Bande auf Höhe von ca. 75 kDa schwach erkannt, die bereits vom Präimmenserum schwach detektiert wurde. Im *E. coli* pCYB-ActA-Lysat (A) sind das ActA-Intein-CBD-Fusionsprotein auf Höhe von 150 kDa, das abgespaltene ActA auf Höhe von 90 kDa und weitere ActA-Abbauprodukte zu sehen.

Beide ActA-Antiseren erkennen sehr spezifisch sowohl rekombinantes als auch wildtypisches ActA. Zwischen Serum 1 und Serum 2 ist kein Unterschied feststellbar (Abb. 11). Für die Western-Blots zum Testen der Antiseren wurden *L. monocytogenes*-Stämme mit einer zusätzlichen Kopie des *prfA*-Gens auf dem Plasmid pERL3-79-1 verwendet, die zusätzlich noch 1 h in MEM („minimal essential medium“) inkubiert wurden, was zu einer verstärkten Expression aller PrfA-abhängigen Virulenzgene und somit von *actA* führt (Bohne *et al.*, 1996).

2.6 LaXp180 bindet ActA *in vitro*

Um die Ergebnisse der „Yeast Two-Hybrid“ Experimente zu bestätigen, wurde überprüft, ob ActA auch *in vitro* an LaXp180 binden kann. Hierzu wurde das C-terminale Drittel von LaXp180 (AS 1036-1591, vgl. Abb. 4B) mit einem N-terminalen His₆-Tag in *E. coli* M15 pQHS30 durch Induktion mit IPTG überexprimiert. Der native Rohextrakt, der das rekombinante His₆-LaXp180 in großer Menge enthält, wurde anschließend auf eine Ni-NTA Säule (Qiagen) geladen und intensiv gewaschen. Parallel dazu wurde in einem nativen Rohzellextrakt aus *E. coli* pCYB-ActA, der durch Induktion mit IPTG ActA als ActA-Intein-CBD („chitin binding domain“-Fusionsprotein überexprimiert, durch Zugabe von β -Mercaptoethanol die Selbstspaltung der Intein-Domäne induziert. Dieser Zellextrakt, der das bereits von der Intein-CBD-Fusion abgespaltene native ActA enthielt, wurde über die Säule gegeben, an der bereits das His₆-LaXp180 gebunden war. Nach intensivem Waschen wurden die Proteine mit einem ansteigenden Imidazol-Gradienten von der Säule eluiert. Die Fraktionen wurden mit TCA gefällt, über SDS-PAGE aufgetrennt und durch Western-Blots mit anti-ActA- und anti-LaXp180-Antiseren analysiert (Abb. 12). ActA eluierte in großer Menge in den gleichen Fraktionen zusammen mit LaXp180, was zeigt, daß ActA offensichtlich *in vitro* auf der Säule an LaXp180 gebunden war (Abb. 12 oben links, Abb. 13A und 13B).

An Stelle des His₆-LaXp180 wurde für eine geeignete Negativkontrolle ein beliebiges His₆-Protein gesucht, das nicht an ActA bindet. Schließlich wurde das listerielle Oberflächenprotein InlC mit einem N-terminalen His₆-Tag (F. Engelbrecht und S. Hom, Lehrstuhl für Mikrobiologie der Universität Würzburg) als Negativkontrolle verwendet, für das bereits Antiserum zur Verfügung stand. Nach Zugabe des Rohzellextraktes mit dem rekombinanten, bereits von der Intein-CBD-Fusion abgespaltenen ActA auf die Ni-NTA-Säule, an der bereits His₆-InlC gebunden war, eluierten nach intensivem Waschen nur Spuren von ActA zusammen mit großen Mengen des His₆-InlC (Abb. 12 oben rechts, Abb. 13D). Bei einer anderen Negativkontrolle, bei der die Säule vor Zugabe des rekombinanten ActA nur mit einem *E. coli*-Lysat ohne irgendein His₆-Protein beladen wurde, eluierte auch ActA von der Säule. Das Elutionsprofil von ActA unterschied sich hierbei jedoch deutlich vom Elutionsprofil in Anwesenheit von His₆-LaXp180. In Abwesenheit eines His₆-Proteins findet man ActA in den allerersten Fraktionen in relativ großer Menge. Die Menge an ActA nimmt dabei mit der Fraktionszahl kontinuierlich ab (Abb. 13C), während beim gleichen Experiment in Anwesenheit von His₆-LaXp180 in den ersten Fraktionen wenig ActA vorhanden ist, der ActA-Gehalt dann aber parallel zum LaXp180-Gehalt ansteigt und wieder abnimmt (Abb. 12 unten links, Abb. 13A und 13B). Das Eluieren von ActA von einer Säule, auf der kein His₆-Protein gebunden war, rührt vermutlich daher, daß die freien Bindungsstellen der Ni-NTA-Matrix nicht abgesättigt waren, ActA unspezifisch bindet und gleich in den ersten Fraktionen eluiert. Wenn die Ni-NTA-Matrix dagegen vor Zugabe des rekombinanten ActA mit irgendeinem anderen His₆-Protein abgesättigt ist, das nicht an ActA bindet, wie z.B. His₆-InlC, bleiben nur noch Spuren von ActA auf der Säule zurück, die dann in den ersten Fraktionen eluieren (Abb. 12 unten rechts, Abb. 13D).

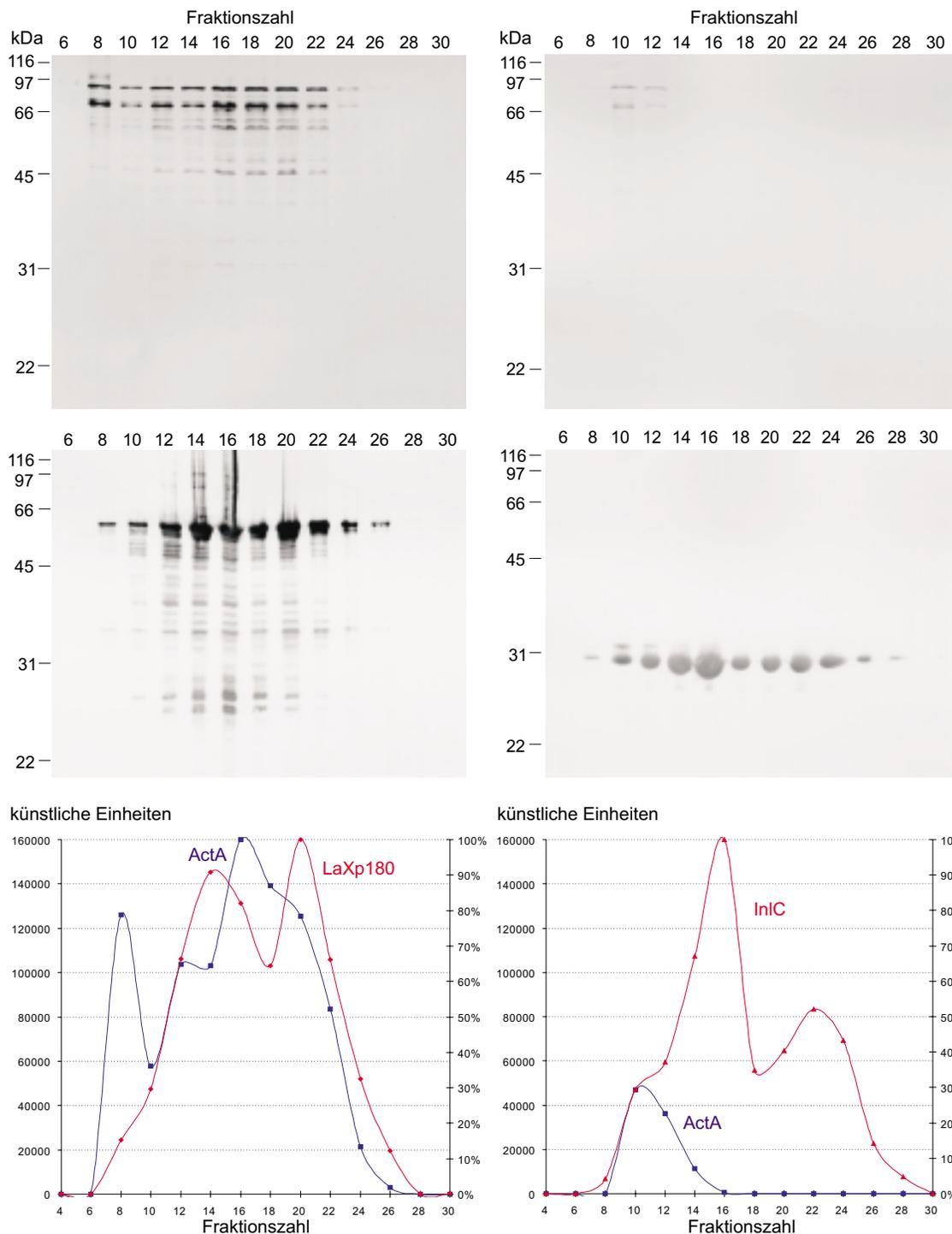


Abb: 12: LaXp180 bindet an ActA *in vitro*.

Linke Spalte: Elutionsprofil des His₆-LaXp180 (60 kDa großes C-terminales Fragment) (Mitte) und von rekombinantem ActA (oben) von einer Ni-NTA-Säule, die zuerst mit einem Rohextrakt aus *E. coli* M15 pQHS30, der das His₆-LaXp180 überexprimiert, beladen wurde und anschließend mit einem *E. coli* pCYB4-Extrakt, in dem ActA überexprimiert und bereits von der Intein-CBD-Fusion abgespalten war. Beide Proteine eluieren bei Zugabe von Imidazol in steigender Konzentration parallel von der Säule. Unten: Quantitative Analyse der Elutionsprofile durch densitometrisches Vermessen der Banden. ActA: blau, LaXp180: rot. Der scheinbare Rückgang der LaXp180-Konzentration in Fraktion 16 und 18 ist ein Artefakt, da die Proteinkonzentration in diesen Fraktionen so hoch war, daß sich das Pellet nach Fällen der Proteine nicht vollständig löste.

Rechte Spalte: Negativkontrolle. Der gleiche Interaktionstest wie oben beschrieben, jedoch mit His₆-InIC an Stelle von His₆-LaXp180. Wird zuerst ein Rohextrakt aus *E. coli*, der His₆-InIC überexprimiert, und anschließend ein Extrakt mit rekombinantem ActA auf die Säule geladen, eluiert ActA nach intensivem Waschen nur in Spuren und nicht parallel mit InIC. Elutionsprofil von ActA (oben) und His₆-InIC (Mitte). Unten: Quantitative Auswertung der Elutionsprofile. ActA: blau, InIC: rot. Die scheinbar geringeren Konzentrationen von InIC in Fraktion 18 und 20 sind wieder Artefakte. Jeweils linke Skala: Künstliche Einheiten für die Intensität der ActA-Banden (relative Werte), rechte Skala: relative prozentuale Bandenintensität (von LaXp180, links, bzw. InIC, rechts), wobei der Wert der jeweils stärksten Bande gleich 100 % gesetzt wurde. Für die Western-Blots wurden pro Spur jeweils 0,7 ml einer 1,5 ml Fraktion aufgetragen. 1. Ak: Anti-ActA 1, 1:1000 (oben); Anti-LaXp180, 1:1000 (Mitte links); Anti-InIC (S. Hom, Lehrstuhl für Mikrobiologie, Universität Würzburg), 1:4000 (Mitte rechts); 2. Ak: SC-2004, 1:1000; Chloronaphthol-Entwicklung.

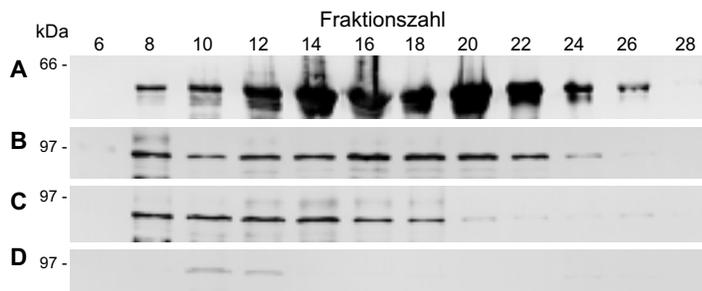


Abb. 13: Vergleich der Negativkontrollen bei *in vitro*-Bindungstests von ActA an LaXp180.

A: Elutionsprofil von His₆-LaXp180 von einer Ni-NTA-Säule. **B-D:** Elutionsprofile von rekombinantem ActA von einer Ni-NTA-Säule, die vor Zugabe von ActA mit einem *E. coli*-Lysat beladen wurde, in dem His₆-LaXp180 überexprimiert (**B**), kein His₆-Protein exprimiert (**C**) oder His₆-InlC überexprimiert (**D**). ActA eluiert in relativ großer Menge zusammen mit His₆-LaXp180 (**B**). Werden die freien Bindungsstellen der Ni-NTA-Matrix nicht durch His₆-Proteine abgesättigt, bindet ActA unspezifisch an die Matrix. Das Elutionsprofil verläuft dann aber nicht parallel zu dem von His₆-LaXp180 (**C**). Werden die Bindungsstellen vor Zugabe von ActA mit einem anderen His₆-Protein abgesättigt (hier His₆-InlC), eluiert ActA nur in Spuren (**D**). Für die Western-Blots wurden pro Spur jeweils 0,7 ml einer 1,5 ml Fraktion aufgetragen. 1. Ak: anti-LaXp180, 1:1000 (**A**) bzw. anti-ActA1, 1:1000 (**B-D**); 2. Ak: SC-2004, 1:1000; Chloronaphthol-Entwicklung.

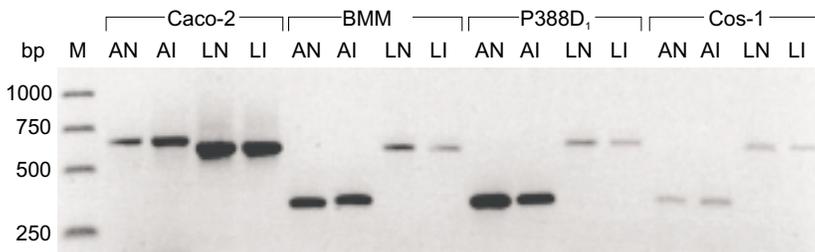
2.7 LaXp180 wird in verschiedenen Säugerzellen exprimiert

Die Expression von LaXp180 wurde über RT-PCR („Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction“) in verschiedenen Säugerzellen analysiert. Neben Cos-1-Fibroblasten aus der Grünen Meerkatze, humanen Caco-2-Epithelzellen und murinen P388D₁-Makrophagen-ähnlichen Zellen wurden auch primäre Knochenmarksmakrophagen BMM Φ der Maus verwendet. Hierzu wurde Gesamt-RNA aus mit *L. monocytogenes* EGD infizierten und nicht-infizierten Zellen isoliert, revers transkribiert und mit entsprechenden Primerpaaren amplifiziert (nach Kuhn und Goebel, 1994). Zur Kontrolle werden RT-PCRs mit β -Aktin-spezifischen Primerpaaren durchgeführt. Hierbei nimmt man an, daß die Konzentration von β -Aktin-mRNA in infizierten und nicht-infizierten Zellen gleich ist. Für die LaXp180-spezifischen PCRs wurden daher jeweils die Mengen an cDNA eingesetzt, die in vorausgegangenen β -Aktin-spezifischen-PCRs die gleiche Menge an PCR-Produkt ergaben. Die Primerpaare zur Amplifikation von LaXp180 und β -Aktin sowie die erwarteten Größen der PCR-Produkte sind in Tabelle 4 zusammengefaßt.

Abb. 14: Expression von LaXp180 in verschiedenen Säugerzellen.

Über RT-PCR wurde die Expression von LaXp180-spezifischen mRNAs in mit *L. monocytogenes* EGD infizierten und nicht-infizierten humanen Caco-2-Epithelzellen, Knochenmarksmakrophagen (BMM) und P388D₁-Makrophagen-ähnlichen Zellen der Maus und Cos-1 Fibroblasten aus Affen analysiert, indem Gesamt-RNA isoliert, revers transkribiert und mit LaXp180-spezifischen Primerpaaren über PCR amplifiziert wurde. Zur Kontrolle wurden β -Aktin-spezifische Primerpaare verwendet. M: Marker; AN: β -Aktin-spezifische PCR, nicht-infizierte Zellen; AI: β -Aktin-spezifische PCR, infizierte Zellen; LN: LaXp180-spezifische PCR, nicht-infizierte Zellen; LI: LaXp180-spezifische PCR, infizierte Zellen.

Zur Amplifikation der β -Aktin-spezifischen cDNA aus Caco-2-Zellen wurden Primerpaare für humanes β -Aktin verwendet (661 bp PCR-Produkt), die β -Aktin-spezifische cDNA aller anderen Zellen wurde über Primerpaare für Maus- β -Aktin amplifiziert (348 bp PCR-Produkt). In allen analysierten Zellen liegt LaXp180-mRNA vor, deren Konzentration sich im Verlauf einer *L. monocytogenes*-Infektion in den ersten vier Stunden der Infektion nicht verändert. Zur Amplifikation der LaXp180-cDNA aus allen vier Zelltypen wurde das gleiche Primerpaar verwendet, das für Maus-cDNA ein 609 bp und humane cDNA aufgrund zweier kurzer Deletionen im amplifizierten Bereich ein 594 bp großes Produkt erzeugt.



Gen (Spezies)	Primerpaar	Produkt
LaXp180 (Mensch/Maus)	5'-CGGGATAAAGATTTGATAGAGTC-3'	609 bp (Maus)
	5'-GCCTTTTTGGCTTGACAGTATTC-3'	594 bp (Mensch)
β -Aktin (Mensch)	5'-CTAGAAGCATTTGCGGTGGACGATGGAGGG-3'	661 bp
	5'-TGACGGGGTCAACCACACTGTGCCCATCTA-3'	
β -Aktin (Maus)	5'-TGGAATCCTGTGGCATCCATGAAAC-3'	348 bp
	5'-TAAACGCAGCTCAGTAACAGTCC-3'	

Tabelle 4: Primerpaare und Produktgrößen für die Kontrolle der Expression von LaXp180 in verschiedenen Säugerzellen über RT-PCR. Die Primerpaare wurden nach der Nukleotidsequenz des entsprechenden Gens der in Klammern angegebenen Spezies ausgesucht. Die Primerpaare zur Amplifikation von LaXp180

binden an hoch konservierte Bereiche des Gens von Maus und Mensch und ergeben aufgrund zweier kurzer Deletionen in der humanen Sequenz 609 bp (Maus) bzw. 594 bp (Mensch) lange Produkte. Die von Genen der Maus abgeleiteten Primerpaare wurden auch zur Amplifikation der entsprechenden Gene aus Cos-1-Affenzellen eingesetzt und ergeben gleich lange Produkte.

Wie in Abb. 14 gezeigt, wurde LaXp180-spezifische mRNA in allen analysierten Zelltypen detektiert. Eine Infektion der Zellen mit *L. monocytogenes* EGD in einem Zeitraum bis zu 4 h führte zu keiner meßbaren Veränderung in der LaXp180-mRNA-Konzentration.

2.8 Immunopräzipitation eines 194 kDa Proteins

Da trotz des Vorhandenseins von LaXp180-spezifischer mRNA in allen analysierten Säugerzellen in Western-Blots mit Lysaten aus Säugerzellen keine LaXp180-spezifische Bande vom anti-LaXp180-Serum erkannt wurde (Abb. 9A, Spuren C und C'), wurde versucht, LaXp180 über Immunopräzipitation nachzuweisen. Bei der Immunopräzipitation wird ein Rohproteinextrakt mit einem gegen das Zielprotein gerichteten Antikörper und Protein A-Agarose inkubiert. Protein A aus *Staphylococcus aureus* bindet spezifisch an die Fc-Region von Immunglobulinen und bildet mit dem Antikörper und dem gebundenen Antigen einen Komplex, der durch die Kopplung von Protein A an Agarosekügelchen durch Abzentrifugieren vom Proteinextrakt getrennt werden kann. Für die Immunopräzipitation von LaXp180 wurden neben Lysaten aus Cos-1-Fibroblasten auch Gehirnextrakte von Mäusen verwendet, da das Phosphoprotein Stathmin in der höchsten Konzentration im Gehirn vorkommt (Koppel *et al.*, 1990). Da Stathmin offensichtlich an LaXp180 bindet (Maucuer *et al.*, 1995), wurde angenommen, daß vermutlich auch LaXp180 im Gehirn in höherer Konzentration vorkommt. Die Lysate wurden mit dem anti-LaXp180-Serum und Protein-A-Agarose inkubiert. Nach Abzentrifugation des LaXp180-Antikörper-Protein-A-Agarose-Komplexes und mehreren Waschschrritten wurden die Präzipitate über SDS-PAGE getrennt und in Western-Blots mit dem anti-LaXp180-Serum analysiert. Als Negativkontrollen wurden Immunopräzipitationen mit dem Präimmenserum bzw. ohne jegliches Serum durchgeführt. Das Präimmenserum ist das Serum des Kaninchens, das vor der ersten Immunisierung mit dem entsprechenden Antigen gewonnen wurde.

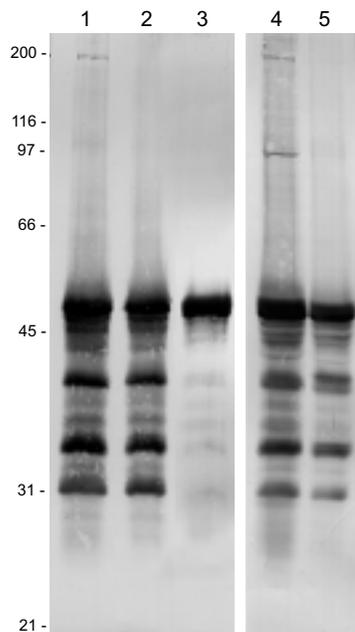


Abb. 15: Immunopräzipitation.

Proteinextrakte aus Cos-1-Fibroblasten (Spuren 1-3) oder Gehirnen von Mäusen (Spuren 4 und 5) wurden mit dem anti-LaXp180-Serum immunopräzipitiert (Spuren 1 und 4). Als Negativkontrollen wurden die Proteinextrakte mit dem Präimmenserum (Spuren 2 und 5) oder ohne Serum (Spur 3) präzipitiert. Nach Auftrennen der Präzipitate über SDS-PAGE (10%-iges PAA-Gel), Transfer auf Nitrozellulose und Western-Blot mit dem anti-LaXp180-Serum (1:000) wird im Cos-1-Zellextrakt eine 194 kDa große Bande detektiert, im Gehirnextrakt zusätzlich noch eine Bande auf Höhe von 97 kDa. Die starken Banden im Bereich von 30 - 50 kDa stammen von Protein A bzw. Immunglobulinfragmenten. 2. Ak: SC-2004; Chloronaphthol-Entwicklung.

Wie in Abb. 15 ersichtlich, konnte mit dem anti-LaXp180-Serum in einem Lysat aus Cos-1-Fibroblasten ein 194 kDa großes Protein detektiert werden. Die Laufhöhe dieses Proteins stimmt mit dem theoretischen Molekulargewicht von 183 kDa gut überein. Eine

Immunopräzipitation mit dem anti-LaXp180-Serum in einem Gehirnextrakt aus Mäusen lieferte zusätzlich zu der Bande auf Höhe von 194 kDa noch eine zweite Bande auf Höhe von 97 kDa. In den Negativkontrollen waren keine Banden auf der entsprechenden Höhe zu erkennen.

2.9 LaXp180 kolokalisiert mit *L. monocytogenes* in infizierten Zellen

Die intrazelluläre Verteilung von LaXp180 wurde über Immunfluoreszenzmikroskopie an mit *L. monocytogenes* infizierten Säugerzellen mit dem präadsorbierten anti-LaXp180-Kaninchenserum und einem mit dem roten Fluoreszenzfarbstoff Lissamin-Rhodamin-Sulfonylchlorid (LRSC)-konjugierten Ziege-anti-Kaninchen-Sekundärantikörper (Dianova) untersucht. Die Gewebekulturzellen wurden infiziert, indem Listerien in das Zellkulturmedium gegeben und anschließend 10 min bei 1200 rpm auf die Zellen zentrifugiert wurden. Eine Stunde nach der Infektion wurde das bakterienhaltige Medium abgezogen, die noch nicht in Zellen eingedrungenen Bakterien vom Zellrasen abgewaschen und Gentamycinhaltiges Medium zugegeben. Dieser Zeitpunkt wird mit 0 h p.i. („post infection“) bezeichnet. Das Antibiotikum Gentamycin tötet die restlichen, noch nicht in Zellen eingedrungenen Bakterien inklusive aller an den Zellen adhärenen Bakterien ab, gelangt jedoch nur in Spuren ins Zytoplasma der Zellen. Bereits intrazelluläre Bakterien werden dadurch nicht abgetötet. Die infizierten Zellen wurden 4 h nach Gentamycin-Zugabe (= 4 h p.i.) fixiert und mit den verschiedenen Antikörpern inkubiert.

In Vorversuchen wurden die Bedingungen für die Immunfluoreszenzfärbungen optimiert. Zur Wahl des geeigneten Zelltyps wurden Caco-2-Epithelzellen (human), HeLa-epithelzellähnliche Zellen (human), mikrovaskuläre Gehirndothelzellen (BMEC, human), Cos-1-Fibroblasten (Grüne Meerkatze) und P388D₁-Makrophagen (Maus) mit *L. monocytogenes* EGD mit einer MOI=50 („multiplicity of infection“) infiziert, mit Aceton fixiert und dem anti-LaXp180-Serum in einer Verdünnung von 1:20 und dem LRSC-konjugierten Sekundärantikörper (1:40) gefärbt. Während in Caco-2-, HeLa-, BMEC- und Cos-1-Zellen an einzelnen Stellen im Präparat das anti-LaXp180-Serum die Bakterien anfärbte, wurde in P388D₁-Makrophagen keine Kolokalisation von LaXp180 mit den Listerien beobachtet. Da in Cos-1-Fibroblasten im Vergleich zu den anderen Zelltypen mehr Stellen im Präparat gefunden wurden, in denen Bakterien vom anti-LaXp180-Serum gefärbt waren, und dieser Zelltyp als sehr gut transfizierbar gilt, wurden alle weiteren Immunfluoreszenzanalysen an Cos-1-Fibroblasten durchgeführt.

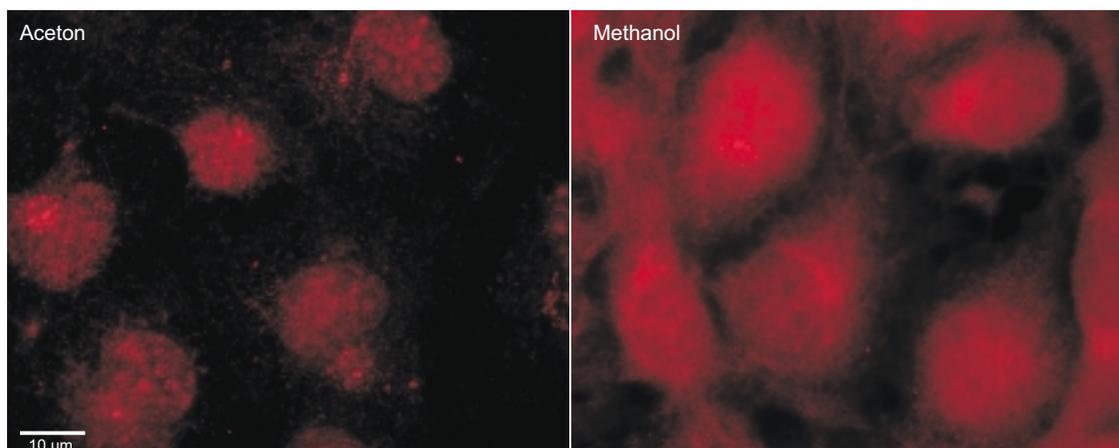


Abb. 16: Vergleich der Fixierungsmethoden.

Nicht-infizierte Cos-1-Fibroblasten wurden für die Immunfluoreszenzmikroskopie mit Aceton und vorausgehender Permeabilisierung mit 0,5% Triton-X-100 (links) bzw. Methanol (rechts) fixiert. Nach Aceton-Fixierung sind nur die Zellkerne punktiert gefärbt, während nach Methanol-Fixierung auch das Zytoplasma stark angefärbt ist.

Zum Austesten verschiedener Antikörperkonzentrationen wurden Cos-1-Zellen, die mit *L. monocytogenes* EGD mit einer MOI=50 infiziert waren, mit unterschiedlichen Verdünnungsstufen des anti-LaXp180-Serums und des Sekundärantikörpers gefärbt. Von den getesteten Konzentrationen 1:20, 1:40, 1:80 und 1:200 ergaben 1:40-Verdünnungen sowohl des anti-LaXp180-Serums als auch des Sekundärantikörpers die besten Ergebnisse.

Zur Ermittlung der geeigneten Fixierungsmethode wurden nicht-infizierte Cos1-Zellen vor der Inkubation mit dem anti-LaXp180-Serum mit Methanol oder Aceton fixiert. Für die Methanolfixierung werden die Zellen 20 min in vorgekühltem Methanol bei -20°C inkubiert und ohne vollständige Trocknung mit dem Antiserum bedeckt. Bei der Acetonfixierung werden die Zellen 1 min mit 0,5 % Triton-X-100 permeabilisiert, 3 min in vorgekühltem Aceton bei -20°C fixiert, und erst nach vollständiger Trocknung mit dem Antiserum inkubiert. Wie in Abb. 16 zu sehen, resultiert eine Fixierung mit Aceton und vorausgegangener Permeabilisierung durch Triton in einer punktierten Färbung des Zellkerns, während nach einer Fixierung mit Methanol neben einer starken Kernfärbung auch das Zytoplasma stark angefärbt ist. Durch die starke Färbung des Zytoplasmas nach Methanol-Fixierung sind eventuell angefärbte Listerien nicht zu erkennen. Daher ist eine Aceton-Fixierung mit vorausgehender Permeabilisierung durch Triton für Immunfluoreszenzanalysen mit dem anti-LaXp180-Serum die Methode der Wahl.

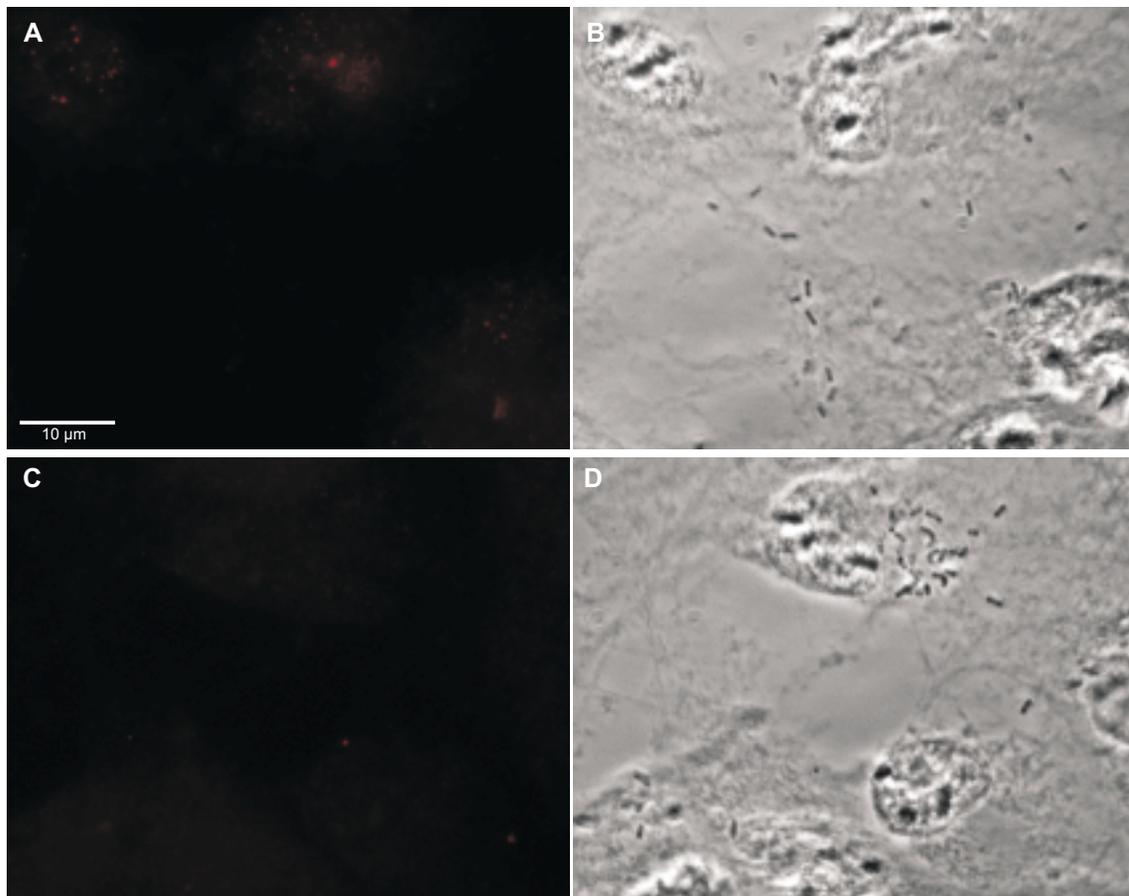


Abb. 17: Negativkontrollen.

A: Cos-1-Fibroblasten wurden mit *L. monocytogenes* EGD infiziert und mit dem Präimmunsrum gefärbt, das vor der ersten Immunisierung mit rekombinantem LaXp180 gewonnen wurde. Bei hoher Konzentration (1:20) des Präimmunsrums und relativ langer Belichtungszeit sieht man eine leichte punktierte Kernfärbung. **B:** Phasenkontrastaufnahme zu A. **C:** Färbung infizierter Cos-1-Zellen nur mit dem Sekundärantikörper (1:20). Auch in hoher Konzentration färbt der Sekundärantikörper weder zelluläre noch bakterielle Strukturen. **D:** Phasenkontrast zu C.

Die Spezifität des anti-LaXp180-Serums und des Sekundärantikörpers wurde durch eine Reihe von Negativkontrollen überprüft. Hitzefixierte *L. monocytogenes* EGD, die in BHI-Medium kultiviert und mit PBS gewaschen waren, wurden vom anti-LaXp180-Serum wie auch dem Sekundärantikörper sogar in der relativ hohen Konzentration von

1:20 nicht gefärbt. Das anti-LaXp180-Serum und der Sekundärantikörper zeigen demnach keine Kreuzreaktion mit listeriellen Proteinen.

Ferner wurden Färbungen mit dem Präimmunsrum des Kaninchens, das vor der ersten Immunisierung mit rekombinantem LaXp180 gewonnen wurde, an mit *L. monocytogenes* EGD infizierten Cos-1-Zellen durchgeführt. Das Präimmunsrum ergibt in hoher Konzentration (1:20) bei relativ langer Belichtungszeit eine ganz leichte punktierte Färbung der Zellkerne, die jedoch - bei gleicher Belichtungszeit - wesentlich schwächer als die Färbung mit dem anti-LaXp180-Serum ist (Abb. 17A). Färbungen infizierter Zellen mit dem Sekundärantikörper in hoher Konzentration (1:20) alleine blieben völlig negativ (Abb. 17C).

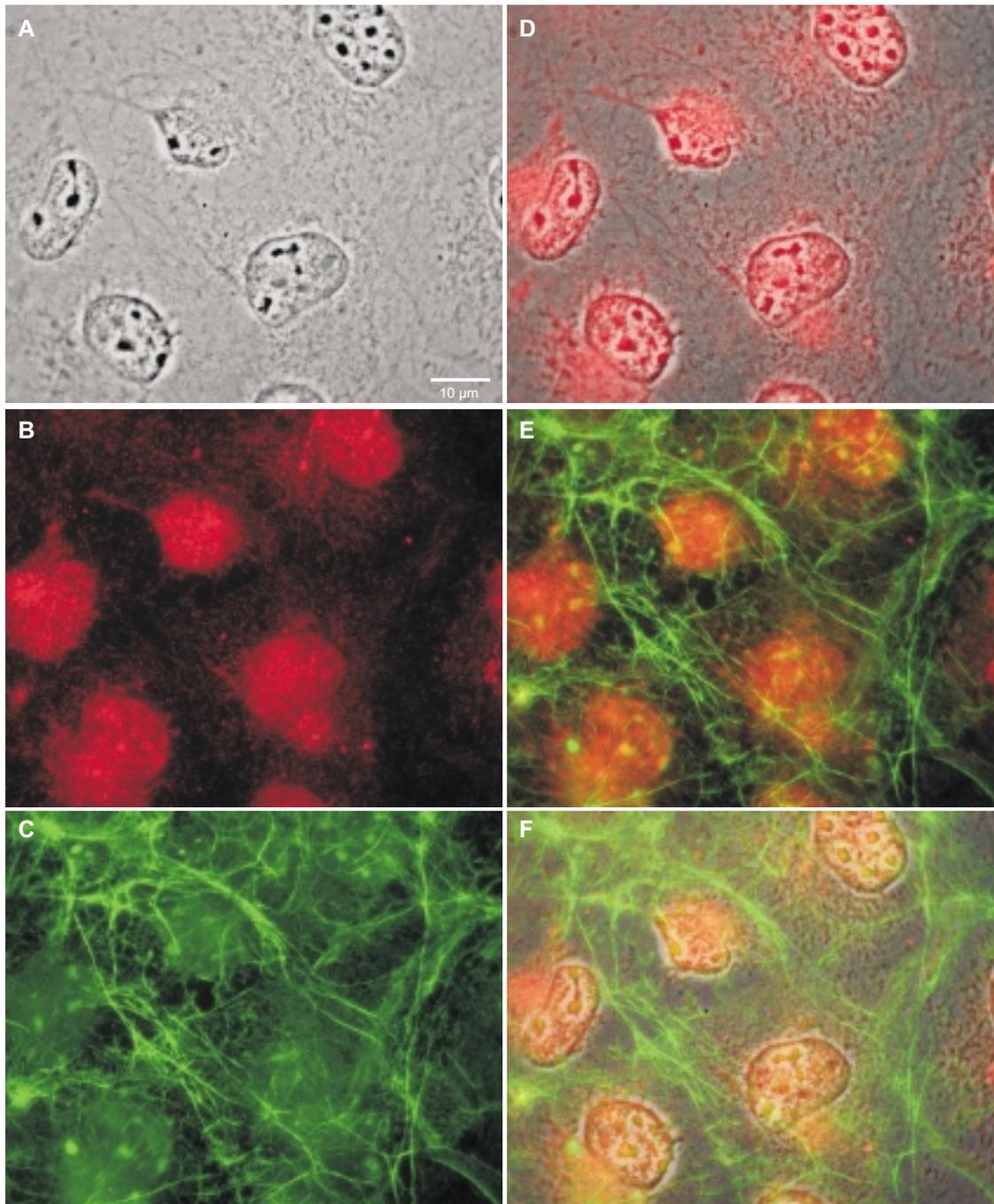


Abb. 18: Immunfluoreszenz nicht-infizierter Zellen.

A: Phasenkontrastaufnahme; **B:** Färbung des anti-LaXp180-Serums; **C:** FITC-Phalloidin-Färbung des Aktinskeletts; **D:** Überlagerung von A und B; **E:** Überlagerung von B und C; **F:** Überlagerung von A, B und C. Wie in A und D deutlich zu sehen, färbt das anti-LaXp180-Serum die Zellkerne sowie jeweils einen definierten Bereich direkt neben einem Zellkern.

Nach der Ermittlung des geeigneten Zelltyps, der optimalen Färbebedingungen und der Überprüfung der Spezifität der Färbemethode durch die vorausgegangenen „technischen“ Negativkontrollen wurde die Lokalisation von LaXp180 in nicht-infizierten oder mit verschiedenen *L. monocytogenes*-Stämmen infizierten Zellen untersucht. Alle folgenden Immunfluoreszenzfärbungen wurden an Cos-1-Fibroblasten nach Aceton-Fixierung mit dem anti-LaXp180-Serum und dem Sekundärantikörper jeweils in einer Verdünnung von 1:40 durchgeführt. Zusätzlich wurde zelluläres F-Aktin mit Fluorescein-Iso-thiocyanat (FITC)-konjugiertem Phalloidin (Sigma) gefärbt. Abb. 18 zeigt eine Immunfluoreszenzfärbung von nicht-infizierten Cos-1-Zellen. Neben einer Phasenkontrastaufnahme, der anti-LaXp180-Färbung in der Rotfluoreszenz und der Phalloidin-Färbung in der Grünfluoreszenz sind auch verschiedene Überlagerungen der einzelnen Aufnahmen dargestellt. In den Abbildungen 18B und 18D ist deutlich zu erkennen, daß das anti-LaXp180-Serum die Zellkerne sowie definierte Bereiche direkt neben den Zellkernen anfärbt. Bei diesen Bereichen könnte es sich aufgrund der Position innerhalb der Zelle um die Centrosom-Komplexe handeln.

Für Doppelimmunfluoreszenzfärbungen infizierter Zellen wurden Cos-1-Fibroblasten mit *L. monocytogenes* EGD mit einer MOI=12,5 infiziert. Die anti-LaXp180-Färbungen bestätigten die bereits in den Vorversuchen mit verschiedenen Zelltypen beobachtete Kolokalisation von LaXp180 mit der Bakterienoberfläche. Auffallend dabei war, daß in einer einzelnen Zelle nicht alle Bakterien vom anti-LaXp180-Serum angefärbt wurden und die angefärbten Listerien auch nicht gleichmäßig über das gesamte Präparat verteilt waren, sondern sich auf eher wenige Bereiche in einem Präparat konzentrierten. In allen Zellen eines Präparates waren aber die Kerne und begrenzte Bereiche direkt neben den Kernen vom anti-LaXp180-Serum gefärbt. Hieraus läßt sich schließen, daß offensichtlich alle Zellen LaXp180 exprimieren, aber LaXp180 nur in wenigen Zellen mit der Bakterienoberfläche kolokalisiert. Eine genaue Analyse der roten anti-LaXp180-Fluoreszenz zeigte, daß das anti-LaXp180-Serum meistens nur einen Pol des Bakteriums U-förmig anfärbte (Abb. 19B und D; Abb. 20; Abb. 21, linke Spalte). FITC-Phalloidin färbt neben dem Aktinskelett der Zelle auch den Aktinsaum bzw. Aktinschweif, den die Bakterien durch Polymerisation zellulären Aktins gebildet haben (Abb. 19C; Abb. 20; Abb. 21, mittlere Spalte). Eine Überlagerung der Rotfluoreszenz des anti-LaXp180-Serums und der Grünfluoreszenz der FITC-Phalloidin-Färbung zeigte überraschend, daß sich beide Färbungen wechselseitig ausschließen (Abb. 19D; Abb. 20; Abb. 21, rechte Spalte). Bei Listerien, die einen Aktinschweif ausgebildet haben, wurde nur der dem Schweif abgewandte Pol des Bakteriums vom anti-LaXp180-Serum angefärbt. Bakterien, die sich teilen, wurden in der Mitte, an der Stelle der Septumbildung, vom anti-LaXp180-Serum gefärbt, während die Pole der Bakterien durch die FITC-Phalloidin-Fluoreszenz grün aufleuchteten. Eher seltener fanden sich auch Bakterien, deren gesamte Oberfläche entweder nur vom anti-LaXp180-Serum oder nur durch Phalloidin angefärbt war (Abb. 21, 3. Reihe). Auch diese Beobachtungen bestätigten den wechselseitigen Ausschluß beider Färbungen.

Um herauszufinden, ob die Kolokalisation von LaXp180 von der Anwesenheit von ActA auf der Bakterienoberfläche abhängt, wurden Doppelimmunfluoreszenzfärbungen von Zellen untersucht, die mit *L. monocytogenes* $\Delta 2$ (Hauf *et al.*, 1997) mit einer MOI=50 infiziert wurden. Im Stamm *L. monocytogenes* $\Delta 2$ fehlen die Gene *actA*, *mpl* und *plcB* vollständig (vgl. Abb. 1). Wie in Abb. 22 zu sehen, ist *L. monocytogenes* $\Delta 2$ nicht mehr in der Lage, Aktin zu polymerisieren und sich fortzubewegen. Da die Teilungen aber normal ablaufen, bilden diese Listerien Mikrokolonien aus (Hauf *et al.*, 1997). *L. monocytogenes* $\Delta 2$ kann sich nicht in die Nachbarzellen ausbreiten, weshalb die Mikrokolonien nur in wenigen einzelnen Zellen zu finden sind, die vor Zugabe von Gentamycin infiziert wurden. In keinem der mit *L. monocytogenes* $\Delta 2$ infizierten Präparate waren die Listerien vom anti-LaXp180-Serum angefärbt (Abb. 22B, D, E). Daher ist die beim Wildtyp *L. monocytogenes* EGD beobachtete Kolokalisation von LaXp180 mit der Bakterienoberfläche abhängig von der Anwesenheit von ActA und ein weiterer Hinweis, daß LaXp180 an ActA bindet.

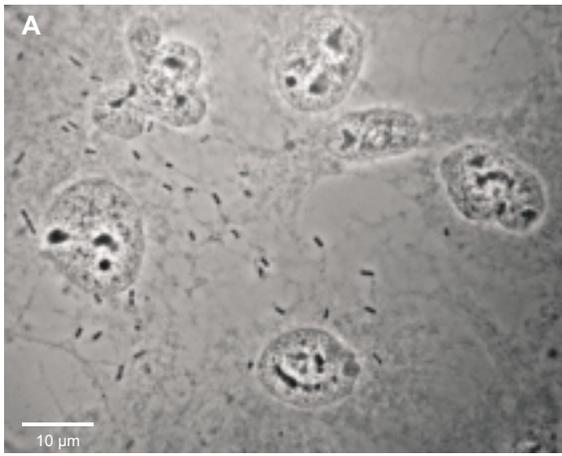
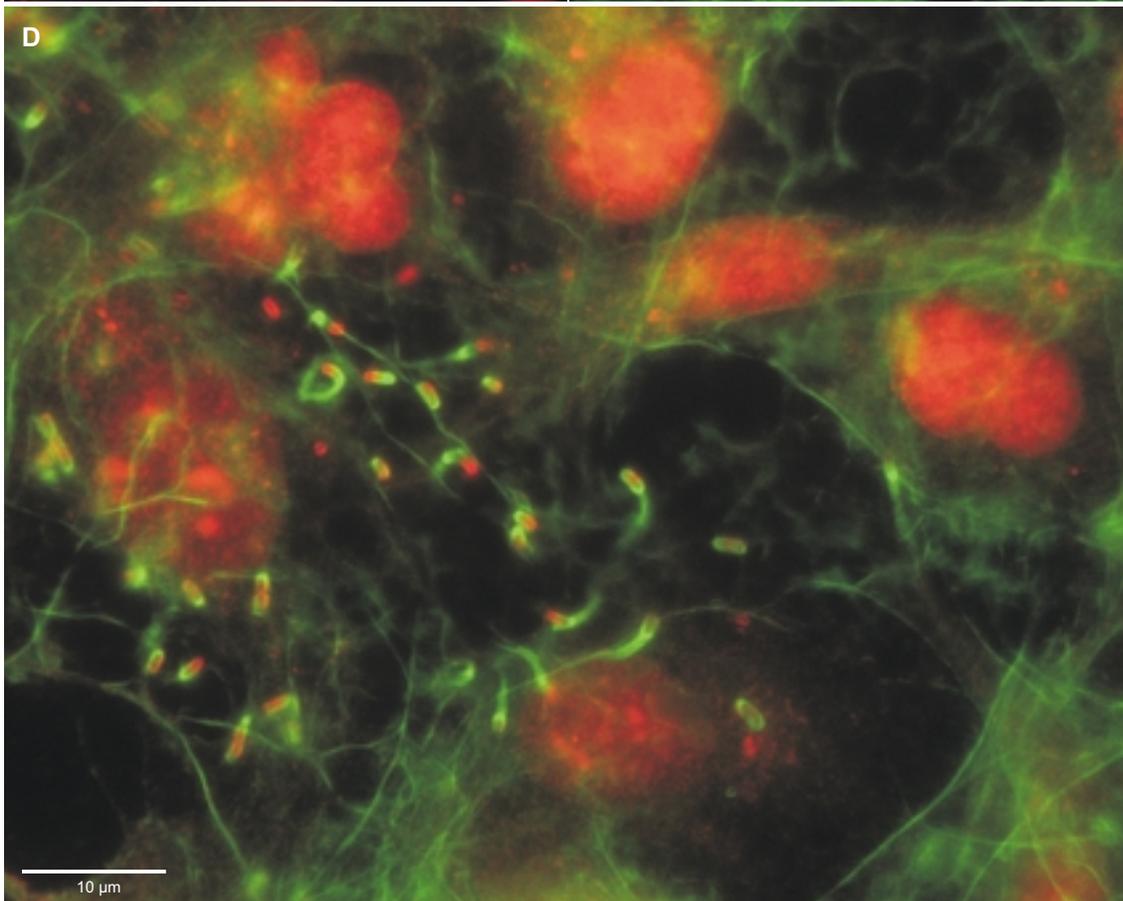
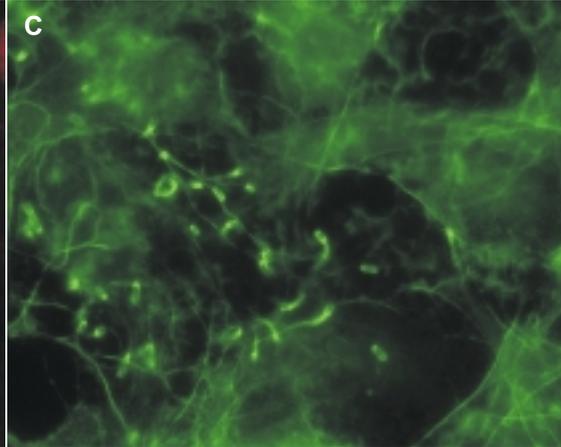
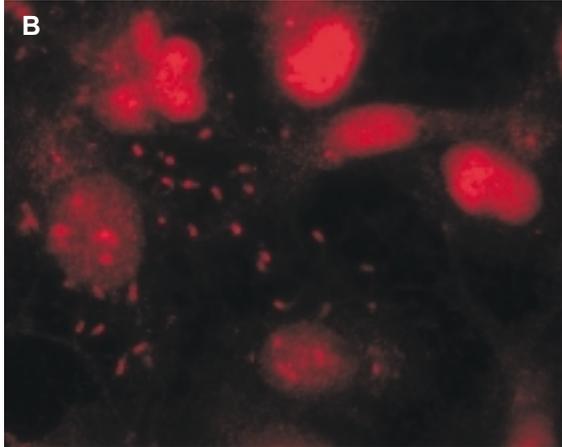


Abb. 19: Immunfluoreszenzanalyse der intrazellulären Lokalisation von LaXp180 in mit *L. monocytogenes* EGD infizierten Cos-1-Zellen.

A: Phasenkontrastaufnahme; **B:** Rotfluoreszenz des anti-LaXp180-Serums; **C:** FITC-Phalloidin-Färbung; **D:** Überlagerung von B und C.



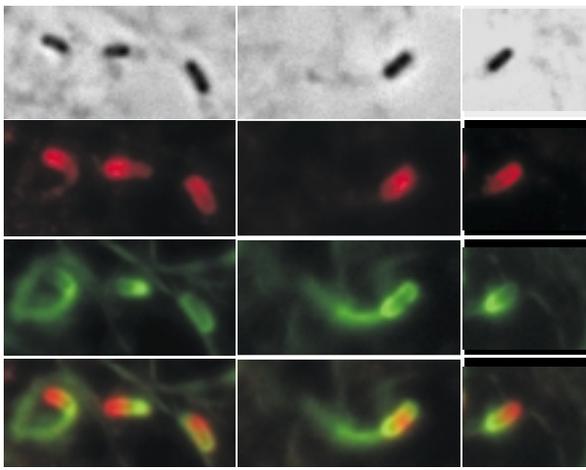


Abb. 20: Details aus Abb. 19.

In den Detailvergrößerungen ist der wechselseitige Ausschluß des Vorhandenseins von LaXp180 und F-Aktin auf der Oberfläche von *L. monocytogenes* deutlich sichtbar. Oberste Reihe: Phasenkontrast; Zweite Reihe: anti-LaXp180-Färbung; dritte Reihe: FITC-Phalloidin-Fluoreszenz; unterste Reihe: Überlagerungen.

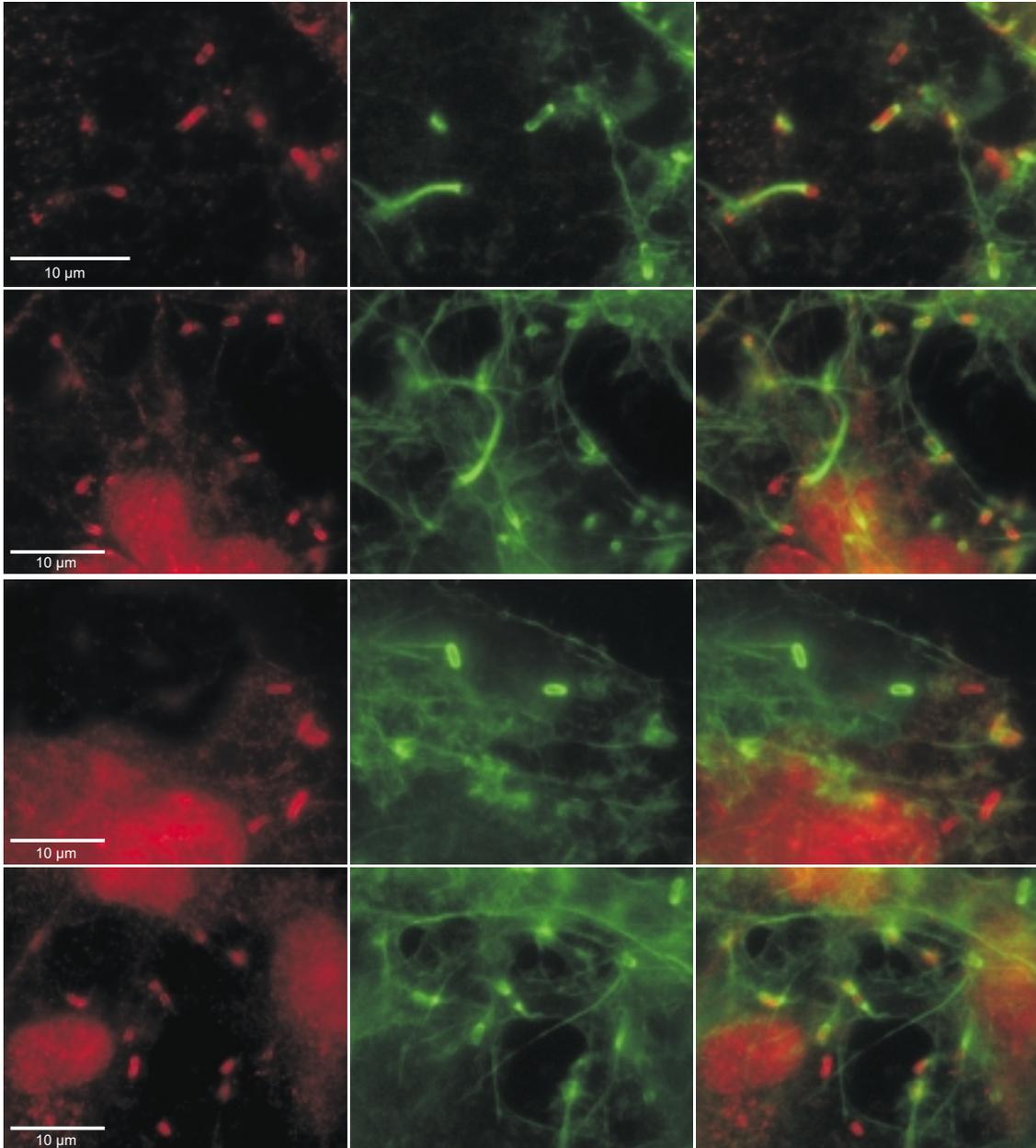


Abb. 21: Immunfluoreszenzanalyse der intrazellulären Lokalisation von LaXp180 in mit *L. monocytogenes* EGD infizierten Cos-1-Zellen.

Alle Aufnahmen einer Reihe zeigen den gleichen Bildausschnitt, Bilder in unterschiedlichen Reihen stammen von unterschiedlichen Präparaten. Linke Spalte: anti-LaXp180-Färbung; mittlere Spalte: FITC-Phalloidin-Färbung; rechte Spalte: Überlagerung der jeweils linken und mittleren Aufnahmen. Neben Listerien, die am einen Pol vom anti-LaXp180-Serum und am entgegengesetzten Pol durch Phalloidin gefärbt sind, findet man auch Bakterien, die nur vom anti-LaXp180-Serum oder nur von Phalloidin angefärbt sind.

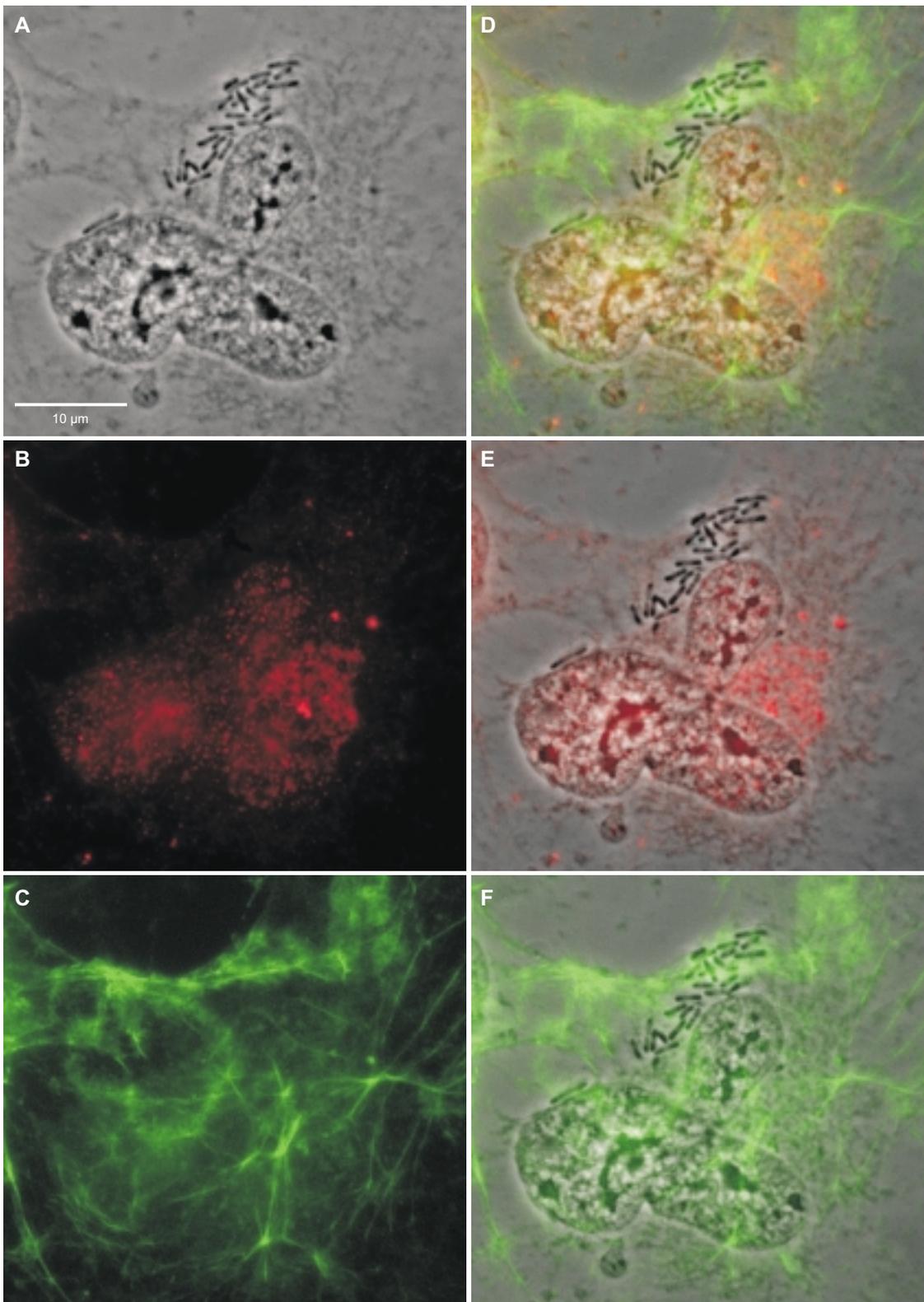


Abb. 22: Immunfluoreszenzanalyse der Verteilung von LaXp180 in mit *L. monocytogenes* $\Delta 2$ infizierten Cos-1-Zellen. **A:** Phasenkontrastaufnahme; **B:** anti-LaXp180-Fluoreszenz; **C:** FITC-Phalloidin-Färbung; **D:** Überlagerung von A, B und C; **E:** Überlagerung von A und B; **F:** Überlagerung von A und C. Im Stamm *L. monocytogenes* $\Delta 2$ sind die Gene *actA*, *mpl* und *plcB* vollständig deletiert. *L. monocytogenes* $\Delta 2$ ist daher nicht mehr in der Lage, Aktin zu polymerisieren und sich fortzubewegen und bildet deshalb typische Mikrokolonien in der Nähe des Zellkerns aus (A). In der grünen Phalloidin-Färbung ist kein polymerisiertes Aktin auf der Bakterienoberfläche zu erkennen (C, D, F). LaXp180 kolokalisiert nicht mit der Oberfläche von *L. monocytogenes* $\Delta 2$ (B, E, F), was eindrucksvoll zeigt, daß die Kolokalisation von LaXp180 mit intrazellulären *L. monocytogenes* EGD auf die Anwesenheit von ActA zurückzuführen ist.

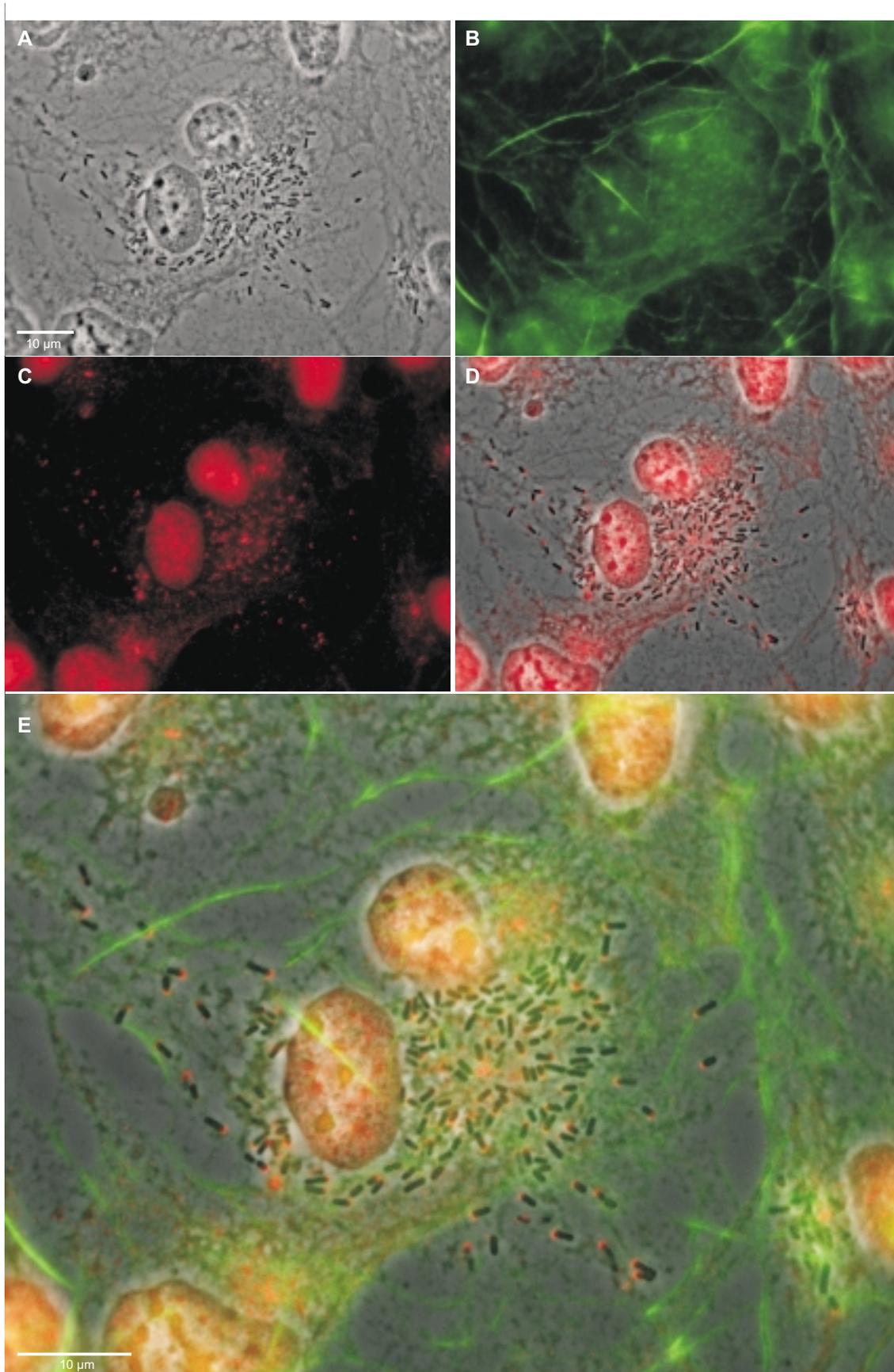


Abb. 23: Immunfluoreszenzanalyse der intrazellulären Verteilung von LaXp180 in mit *L. monocytogenes* EGD infizierten Zellen nach Behandlung mit 0,1 $\mu\text{g/ml}$ Cytochalasin D.

A: Phasenkontrast; **B:** FITC-Phalloidin-Färbung; **C:** anti-LaXp180-Fluoreszenz; **D:** Überlagerung von A und C; **E:** Überlagerung von A, B und C. Cytochalasin D depolymerisiert F-Aktin, weshalb sich kein Aktinsaum oder -schweif an der Oberfläche der Listerien ausbildet (B, E). Da LaXp180 dennoch nur an jeweils einem Pol des Bakteriums lokalisiert ist, wird ausgeschlossen, daß die polare Verteilung von LaXp180 auf der Bakterienoberfläche auf eine sterische Hinderung durch den Aktinsaum oder -schweif zurückzuführen ist (C, D, E).

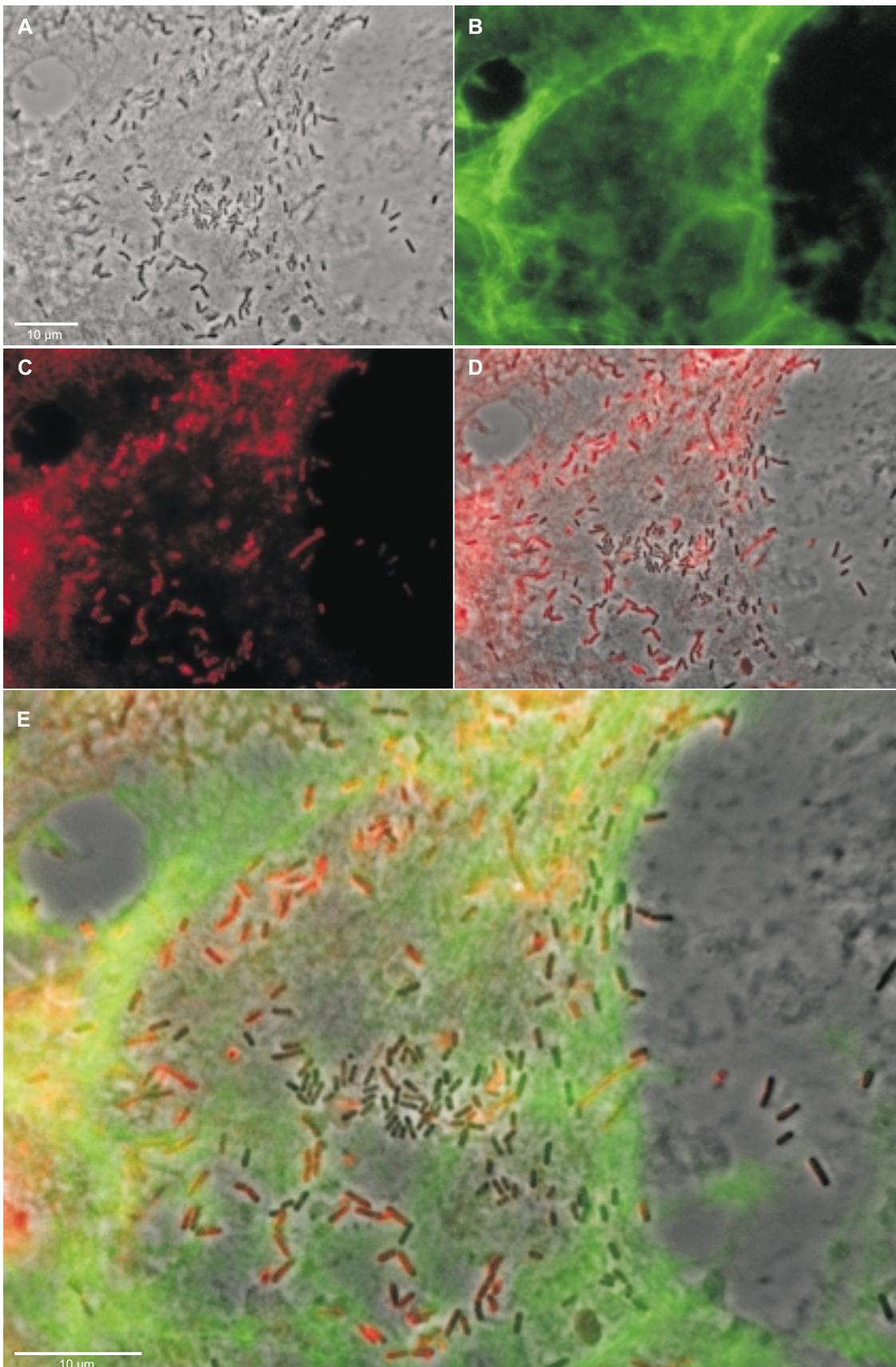


Abb. 24: Immunfluoreszenzanalyse der intrazellulären Verteilung von LaXp180 in mit *L. monocytogenes* A49 infizierten Zellen. **A:** Phasenkontrast; **B:** FITC-Phalloidin-Fluoreszenz; **C:** anti-LaXp180-Färbung; **D:** Überlagerung von A und C; **E:** Überlagerung von A, B und C. *L. monocytogenes* A49 produziert ein ActA-Protein, dem der zentrale prolinreiche Bereich fehlt und kann kein Aktin mehr polymerisieren (B). Das anti-LaXp180-Serum färbt im Gegensatz zur polaren Färbung des Wildtyps die gesamte Bakterienoberfläche der Mutante A49, wobei nicht alle Bakterien gefärbt sind (C, D, E).

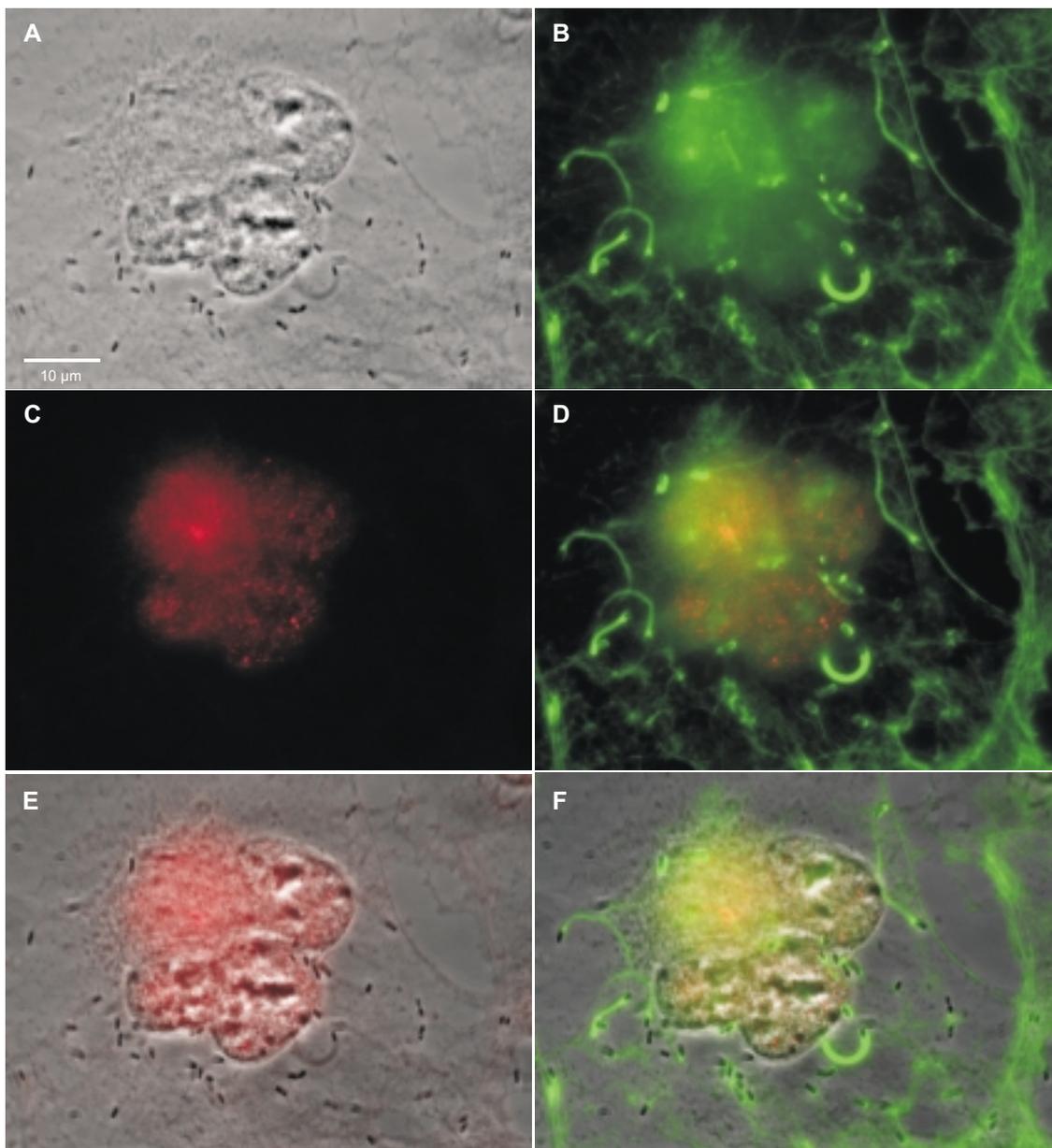


Abb. 25: Immunfluoreszenzfärbung *L. monocytogenes* EGD-infizierter Cos-1-Zellen mit dem monoklonalen Antikörper 4B6. **A:** Phasenkontrast; **B:** FITC-Phalloidin-Fluoreszenz; **C:** 4B6-Färbung; **D:** Überlagerung von B und C; **E:** Überlagerung von A und D; **F:** Überlagerung von A, B und C. Immunfluoreszenz mit dem monoklonalen Antikörper 4B6 resultiert in einer punktierten Kernfärbung, die Listerien werden nicht angefärbt.

Ob die polare Verteilung von LaXp180 auf der Oberfläche intrazellulärer *L. monocytogenes* EGD auf eine sterische Hinderung durch den Aktinsaum oder Aktinschweif zurückzuführen ist, wurde durch Behandlung infizierter Zellen (MOI=12,5) mit Cytochalasin D analysiert (Abb. 23). Cytochalasin D depolymerisiert F-Aktin, wodurch die Ausbildung des Aktinsauges oder -schweifes auf der Bakterienoberfläche unterdrückt wird (Mounier *et al.*, 1990). Cytochalasin D wurde hierfür in einer Konzentration von 0,1 µg/ml zusammen mit Gentamycin zum Zeitpunkt t=0 h p.i. beim Wechseln des Mediums zugesetzt. Bei dieser relativ niedrigen Konzentration an Cytochalasin D überleben die Cos-1-Fibroblasten, die Bildung der Aktinschweife durch die Listerien wird jedoch unterdrückt (Abb. 23B). Eine Endkonzentration an Cytochalasin D von 0,5 µg/ml führte bereits zur Zerstörung der Zellen. Die Bakterien können sich in Anwesenheit von Cytochalasin D nicht fortbewegen, keine benachbarten Zellen infizieren und bilden daher Mikrokolonien in der Nähe der Zellkerne aus (Abb. 23A). Trotz Fehlens von F-Aktin auf der Bakterienoberfläche färbt das anti-LaXp180-Serum nur jeweils einen Pol der Listerien an (Abb. 23C, D, E). Somit ist die polare Lokalisation von LaXp180 auf der Oberfläche intrazellulärer

L. monocytogenes EGD nicht auf eine sterische Hinderung durch den Aktinschweif am entgegengesetzten Pol zurückzuführen.

Immunfluoreszenzanalysen der intrazellulären Verteilung von LaXp180 an mit *L. monocytogenes* A49 (Hauf *et al.*, 1997) infizierten Cos-1-Zellen (MOI=50) zeigten ebenfalls eine Kolokalisation von LaXp180 mit der Bakterienoberfläche (Abb. 24). *L. monocytogenes* A49 synthetisiert aufgrund einer Deletion innerhalb des *actA*-Gens ein ActA-Protein, dem der zentrale prolinreiche Bereich fehlt (vgl. Abb. 7 unten) und ist daher nicht mehr in der Lage, Aktin zu polymerisieren (Abb. 24B). Eine genaue Analyse der anti-LaXp180-Fluoreszenz zeigt jedoch, daß das anti-LaXp180-Serum im Gegensatz zur polaren Färbung der Bakterienoberfläche von *L. monocytogenes* EGD und *L. monocytogenes* $\Delta 2$ die Oberfläche von *L. monocytogenes* A49 gleichmäßig anfärbt. Bei der Immunfluoreszenzfärbung mit dem anti-LaXp180-Serum nach Infektion mit *L. monocytogenes* A49 kann auch das bereits beschriebene Phänomen beobachtet werden, daß nur in bestimmten Bereichen eines Präparates Listerien gefärbt und in Zellen, die gefärbte Listerien enthalten, nicht alle Listerien angefärbt sind (Abb. 24D, E). Die Kolokalisation von LaXp180 mit intrazellulären *L. monocytogenes* A49 bestätigt auch die in den „Yeast Two-Hybrid“-Tests (vgl. 2.3, S. 23) beobachtete Interaktion der beiden Proteinfragmente Δ PActA aus *L. monocytogenes* A49 und dem C-Terminus von LaXp180 (AS 1363-1591).

Für Immunfluoreszenzfärbungen mit dem monoklonalen Antikörper 4B6 (Tröster *et al.*, 1994) wurden mit *L. monocytogenes* EGD infizierte Cos-1-Zellen (MOI=12,5) mit Aceton fixiert und mit dem unverdünnten monoklonalen Antikörper und einem 1:40 verdünnten LRSC-konjugierten Ziege-anti-Maus-Sekundärantikörper (Dianova) inkubiert. Der monoklonale Antikörper 4B6 wurde gegen das Kernprotein La generiert, kreuzreagierte aber beim Testen einer Maus-cDNA-Expressionsgenbank mit dem C-terminalen Drittel von LaXp180 (AS 1036-1591, vgl. Abb. 4B). Alle Immunfluoreszenzfärbungen mit dem monoklonalen Antikörper 4B6 resultierten in einer punktierten Färbung der Zellkerne, intrazelluläre Listerien wurden dagegen nie angefärbt (Abb. 25). Eine solche punktierte Kernfärbung mit dem monoklonalen Antikörper 4B6 wurde auch von Tröster *et al.*, 1995 beschrieben.

2.10 Immunfluoreszenzanalysen nach Transfektion von Zellen mit LaXp180

Cos-1-Zellen wurden mit den Plasmiden pCIV bzw. pCIC (J. Laubinger, Institut für Physiologie, Universität Mainz) transient mit Lipofectamine Plus (Gibco) nach Herstellerangaben transfiziert. Das Plasmid pCIV kodiert das vollständige LaXp180, pCIC das C-terminale Drittel von LaXp180 (AS 1036-1591, vgl. Abb. 4B). Die beiden Transfektionsplasmide entstanden durch Klonierung der entsprechenden cDNA-Bereiche in den Vektor pCI (Promega), wobei pCIC über die Schnittstellen *AccI* und *NotI* und pCIV über *EcoRI* und *NotI* kloniert wurde.

Für Immunfluoreszenzanalysen der intrazellulären Lokalisation von LaXp180 in mit pCIC bzw. pCIV transient transfizierten und nicht-infizierten Cos-1-Fibroblasten wurden die Präparate mit Aceton fixiert und mit dem anti-LaXp180-Serum in der Verdünnung 1:200 und dem LRSC-konjugierten Ziege-anti-Kaninchen-Antiserum in der Verdünnung 1:40 gefärbt. Nach Transfektion der Zellen mit dem C-Terminus von LaXp180, der von pCIC kodiert wird, war kein Unterschied im Färbemuster zu nicht-transfizierten Zellen zu erkennen. Das anti-LaXp180-Serum färbt den Zellkern stark punktiert an, während das Zytoplasma nur ganz schwach gefärbt wird (Abb. 26A und B).

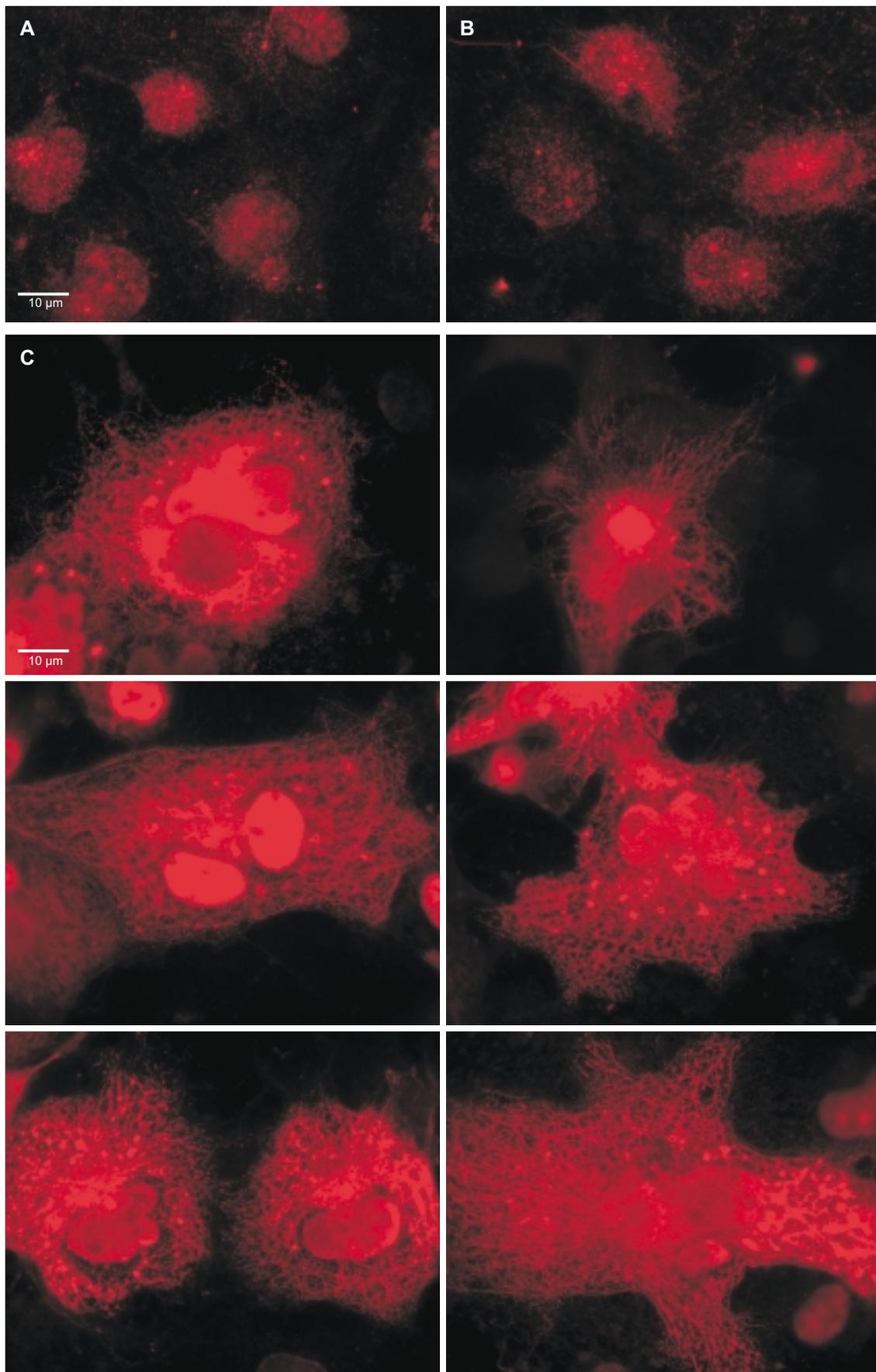


Abb. 26: Immunfluoreszenzanalyse der Lokalisation von LaXp180 in transfizierten Cos-1-Zellen.

A: Nicht-transfizierte Zellen; anti-LaXp180-Serum 1:200; Sekundärantikörper 1:40; Belichtungszeit: 4 s. **B:** Transfektion mit pCIC, das das C-terminale Drittel (AS 1036-1591) von LaXp180 kodiert; Antikörperkonzentrationen und Belichtungszeit wie A. **C:** Transfektion mit pCIV, das das vollständige LaXp180 kodiert; anti-LaXp180-Serum: 1:200; Sekundärantikörper: 1:40; Belichtungszeit: 0,1 s.

Bei Transfektion der Zellen mit dem Plasmid pCIV, welches das vollständige LaXp180 kodiert, heben sich die transfizierten Zellen nach Anfärbung mit dem anti-LaXp180-Serum deutlich von nicht-transfizierten Zellen ab. Der Zellkern und das ganze Zytoplasma leuchten sehr intensiv und im Zytoplasma sind große Blasen und netzartige, fadenförmige Strukturen zu erkennen (Abb. 26C). Da die mit pCIV transfizierten Zellen so stark leuchteten, wurden die Fotos in Abb. 26C mit sehr kurzer Belichtungszeit (0,1 s) aufgenommen, da bei der sonst für Fluoreszenzaufnahmen verwendeten Belichtungszeit von 4 s keine Strukturen sichtbar sind. Bei dieser kurzen Belichtungszeit sind daher auch die umliegenden nicht-transfizierten Zellen, die wie in Abb. 26A aussehen, nicht mehr zu sehen.

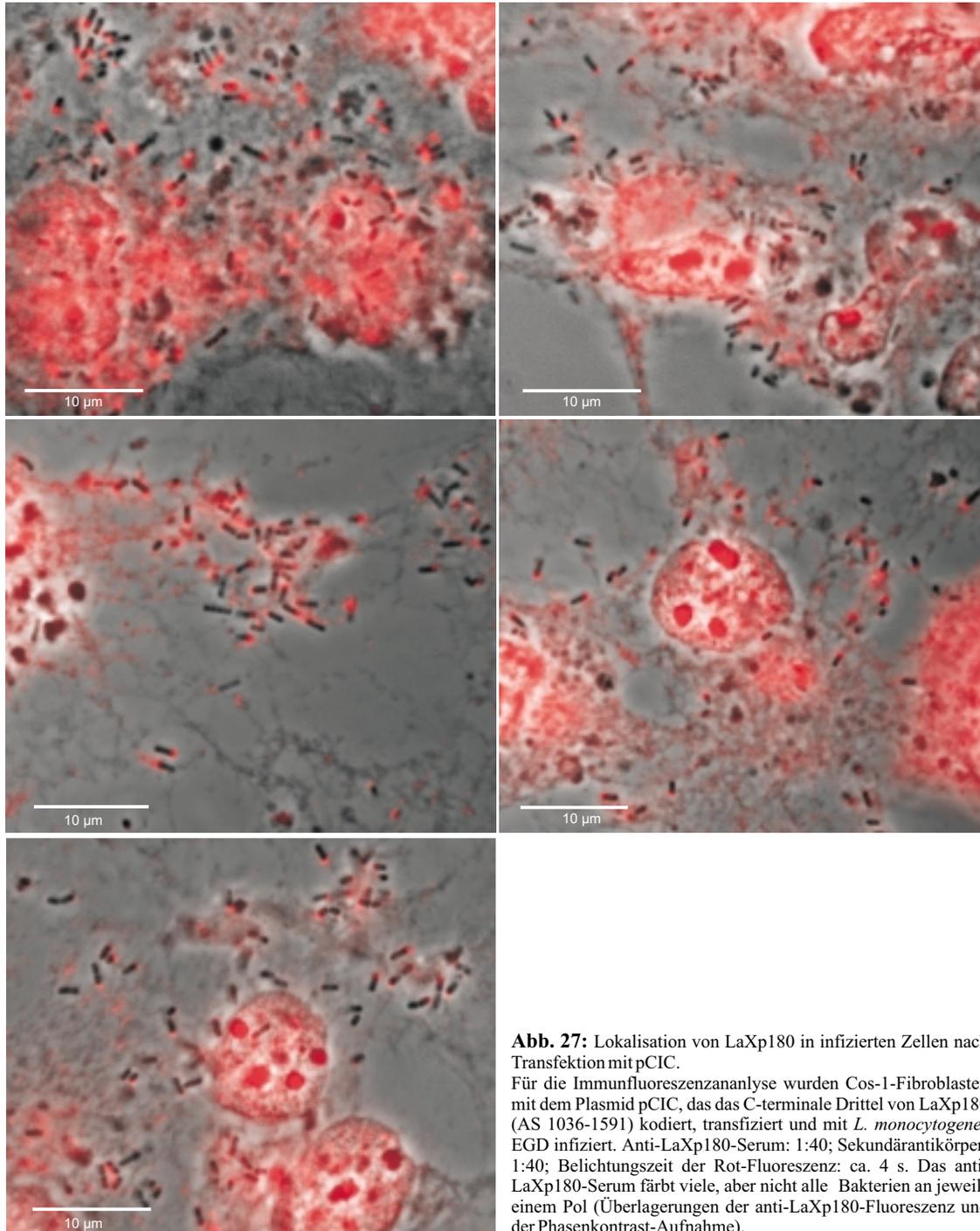


Abb. 27: Lokalisation von LaXp180 in infizierten Zellen nach Transfektion mit pCIV.

Für die Immunfluoreszenzanalyse wurden Cos-1-Fibroblasten mit dem Plasmid pCIV, das das C-terminale Drittel von LaXp180 (AS 1036-1591) kodiert, transfiziert und mit *L. monocytogenes* EGD infiziert. Anti-LaXp180-Serum: 1:40; Sekundärantikörper: 1:40; Belichtungszeit der Rot-Fluoreszenz: ca. 4 s. Das anti-LaXp180-Serum färbt viele, aber nicht alle Bakterien an jeweils einem Pol (Überlagerungen der anti-LaXp180-Fluoreszenz und der Phasenkontrast-Aufnahme).

Bei Immunfluoreszenzfärbung mit *L. monocytogenes* EGD infizierten Cos-1-Zellen (MOI=12,5), die mit pCIC transfiziert waren, färbte das anti-LaXp180-Serum jeweils einen Pol der Bakterien sehr stark an (Abb. 27). Das Färbemuster ist nicht U-förmig wie in nicht-transfizierten, mit *L. monocytogenes* EGD infizierten Zellen (Abb. 19, 20, 21), und vergleichbar mit dem nach Behandlung mit Cytochalasin D (Abb. 23). Da sich nicht-transfizierte von mit pCIC-transfizierten Zellen in der Färbung des Zytoplasmas nicht unterscheiden, aber in manchen Zellen die Pole der Listerien sehr viel stärker gefärbt sind als in den übrigen Zellen, wurde angenommen, daß es sich bei den Zellen, in denen die Pole der Listerien stärker leuchten, um transfizierte Zellen handelt. Abb. 27 zeigt die Ausschnitte aus verschiedenen Präparaten, in denen die Pole der Listerien vom anti-LaXp180-Serum sehr stark angefärbt sind.

Bei der Immunfluoreszenzanalyse von mit *L. monocytogenes* EGD infizierten Cos-1-Zellen (MOI=12,5), die mit pCIV transfiziert waren, ist eine Kolokalisation von LaXp180 mit der Oberfläche von Listerien nur sehr schwer zu erkennen, da das stark gefärbte Zytoplasma alles andere überstrahlt. An einigen wenigen Stellen wurden jedoch auch Bakterien gefunden, die an einem Pol vom anti-LaXp180-Serum angefärbt sind (Abb. 28). Weiter war auffällig, daß in den transfizierten Zellen im Phasenkontrast wiederholt weniger intrazelluläre Listerien zu sehen waren als in nicht-transfizierten.

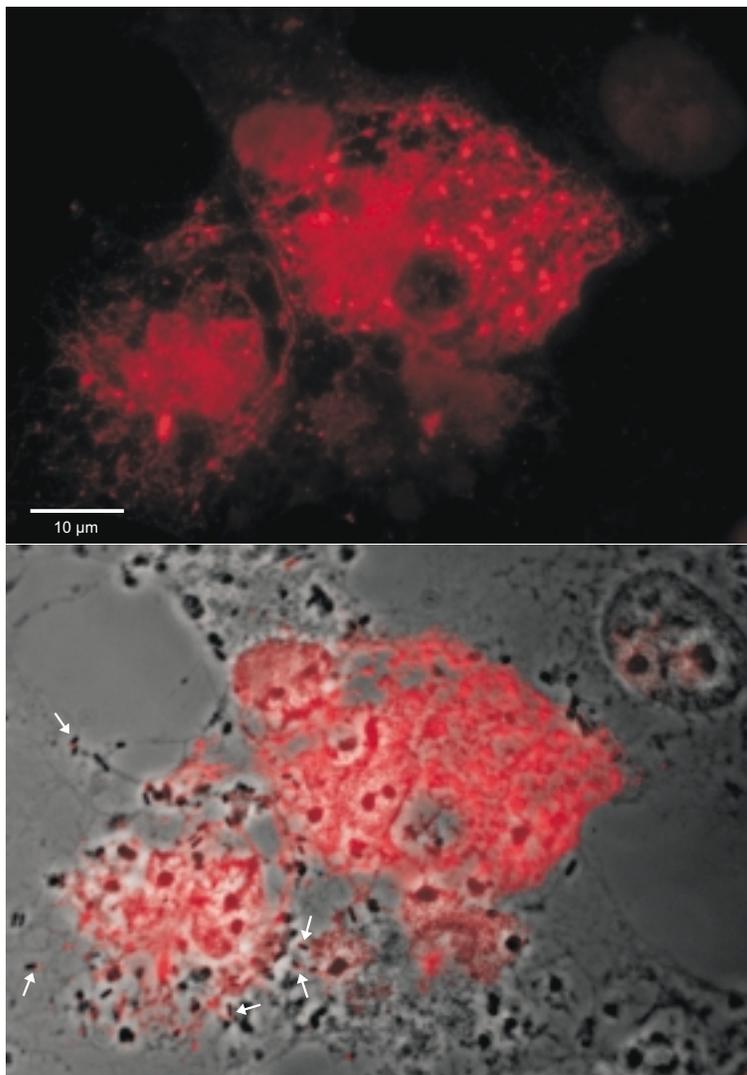


Abb. 28: Lokalisation von LaXp180 in infizierten Zellen nach Transfektion mit pCIV.

Für die Immunfluoreszenzfärbungen wurden Cos-1-Zellen mit dem Plasmid pCIV transfiziert und mit *L. monocytogenes* EGD infiziert. Das Plasmid pCIV kodiert LaXp180 in voller Länge. Oben: anti-LaXp180-Fluoreszenz; unten: Überlagerung der anti-LaXp180-Fluoreszenz mit der Phasenkontrastaufnahme. Aufgrund der sehr starken Färbung des Zytoplasmas durch das anti-LaXp180-Serum ist eine Kolokalisation von LaXp180 mit der Oberfläche der Listerien nur sehr selten zu beobachten (Pfeile). Beim Vergleich der transfizierten Zelle in der Bildmitte mit einer nicht-transfizierten (oben rechts) sind die Intensitätsunterschiede der anti-LaXp180-Färbung deutlich zu sehen.

2.11 Stathmin kolokalisiert mit *L. monocytogenes* in infizierten Zellen

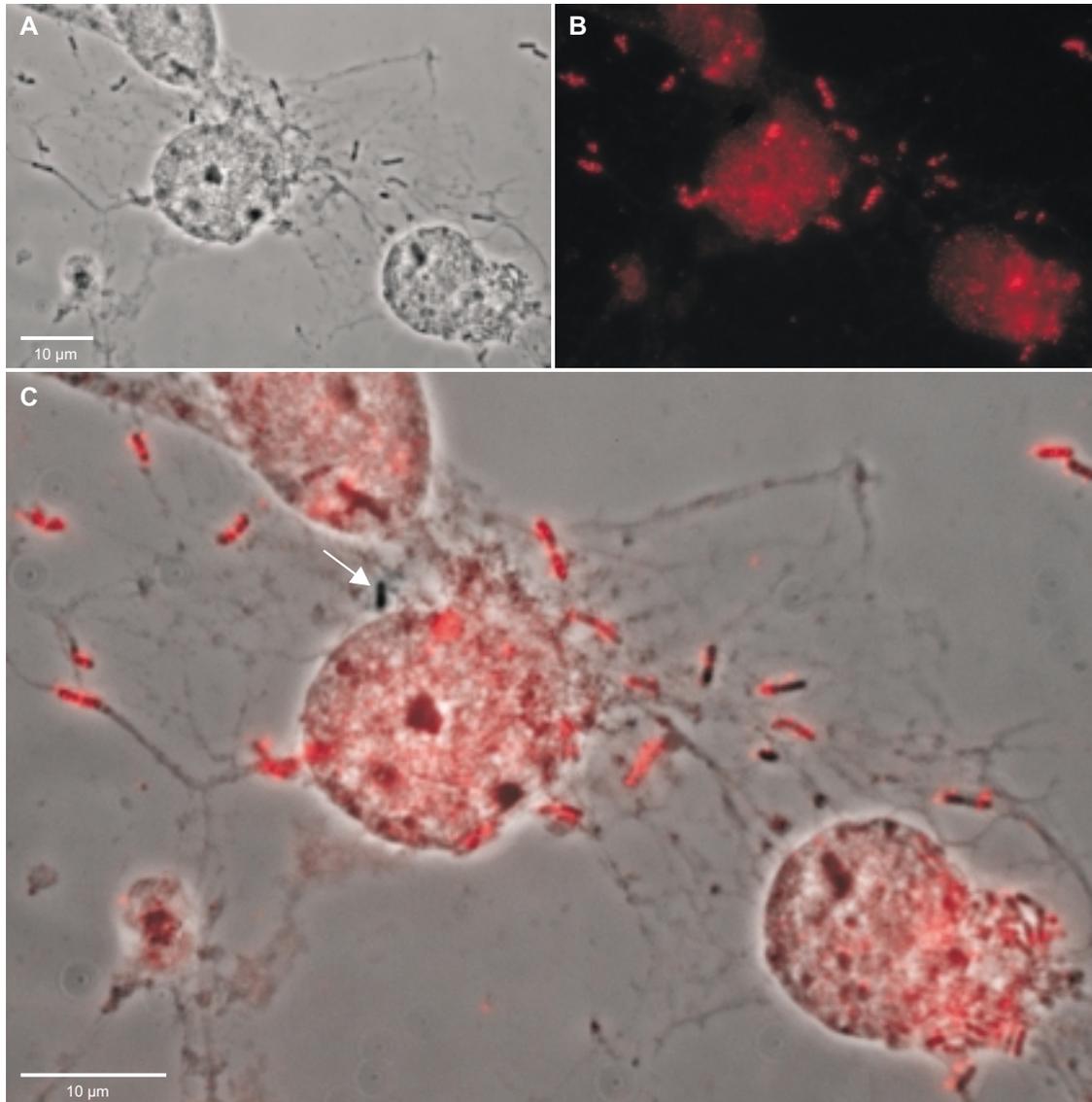


Abb. 29: Immunfluoreszenzanalyse der intrazellulären Verteilung von Stathmin in mit *L. monocytogenes* EGD infizierten Cos-1-Zellen (4 h p.i.).

A: Phasenkontrast. **B:** Anti-Stathmin-Färbung mit dem anti-Peptid-C-Serum. **C:** Überlagerung von A und B. Stathmin kolokalisiert mit der Oberfläche der meisten intrazellulären Listerien, wobei vereinzelt auch Listerien zu finden sind, die nicht vom anti-Peptid-C-Serum angefärbt werden (Pfeil).

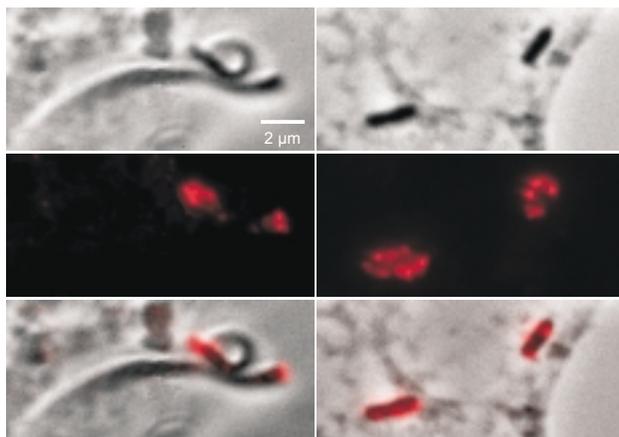


Abb. 30: Detailvergrößerungen aus Immunfluoreszenzfärbungen mit dem anti-Stathmin-Serum (anti-Peptid-C-Serum) von mit *L. monocytogenes* EGD infizierten Cos-1-Zellen.

Oben: Phasenkontrastaufnahme. Mitte: anti-Stathmin-Fluoreszenz. Unten: Überlagerung.

Ein Teil von LaXp180 (AS 1085-1226, vgl. Abb. 4B) wurde über einen „Yeast Two-Hybrid Screen“ als Interaktionspartner von Stathmin isoliert, einem 19 kDa Phosphoprotein, welches das Mikrotubuli-Zytoskelett reguliert (Maucuer *et al.*, 1995). Über Immunfluoreszenzanalyse mit einem anti-Stathmin-Serum in mit *L. monocytogenes* EGD infizierten Cos-1-Zellen wurde überprüft, ob Stathmin auch *in vivo* an LaXp180 und somit indirekt an ActA auf der Oberfläche intrazellulärer Listerien bindet.

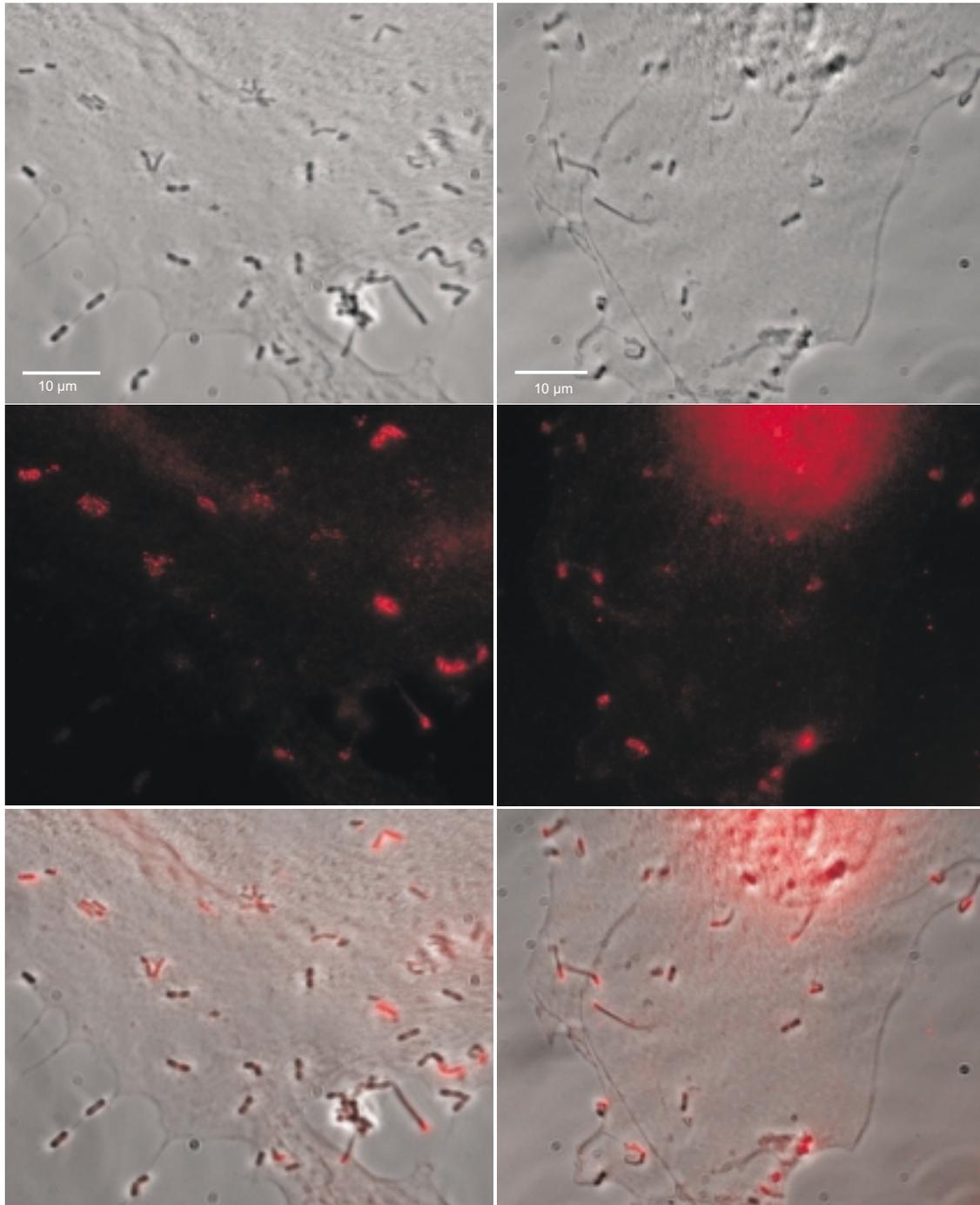


Abb. 31: Immunfluoreszenzfärbungen mit dem anti-Stathmin-Serum (anti-Peptid-C-Serum) von mit *L. monocytogenes* EGD infizierten Cos-1-Zellen. Alle Bilder einer Spalte zeigen den gleichen Ausschnitt eines Präparates. Oben: Phasenkontrast. Mitte: anti-Stathmin-Fluoreszenz. Unten: Überlagerung.

Als anti-Stathmin-Serum wurde das polyklonale anti-Peptid-C-Serum verwendet (A. Sobel, INSERM, Paris), das gegen ein synthetisches Peptid aus den 16 C-terminalen Aminosäuren von Stathmin in einem Kaninchen generiert wurde (Koppel *et al.*, 1990). Da das Färbungsmuster stark von der Fixierungsmethode abhängt, wurden die Präparate nach

Gavet *et al.*, 1998, 6 min mit Methanol bei -20°C ohne vorherige Triton-Extraktion fixiert, 1 h mit 3% BSA (Rinderserumalbumin) abgesättigt und über Nacht mit dem ersten und nach dreimaligem Waschen 2 h mit dem zweiten Antikörper inkubiert, um die Ergebnisse mit den publizierten vergleichen zu können. Jedoch wurde mit der von Gavet *et al.*, 1998, verwendeten Verdünnung des anti-Peptid-C-Serums von 1:5000 überhaupt nichts angefärbt. Nach Austesten mehrerer Verdünnungsstufen des anti-Peptid-C-Serums erwies sich eine Konzentration von 1:200 als geeignet. Bei dieser Konzentration werden die Zellkerne punktiert gefärbt. Eine punktierte Kernfärbung wurde auch von Gavet *et al.*, 1998, beschrieben.

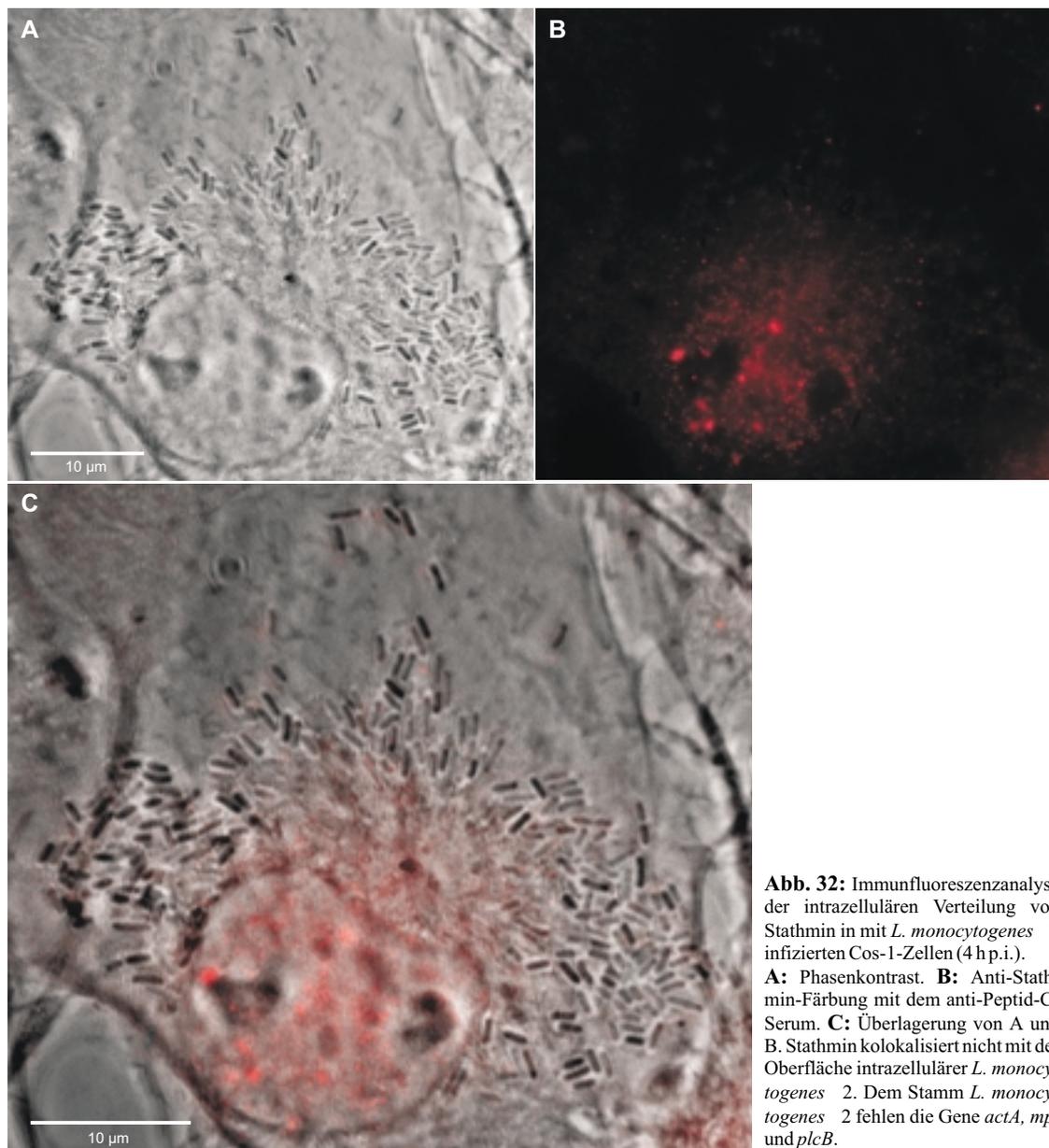


Abb. 32: Immunfluoreszenzanalyse der intrazellulären Verteilung von Stathmin in mit *L. monocytogenes* 2 infizierten Cos-1-Zellen (4 h p.i.). **A:** Phasenkontrast. **B:** Anti-Stathmin-Färbung mit dem anti-Peptid-C-Serum. **C:** Überlagerung von A und B. Stathmin kolokalisiert nicht mit der Oberfläche intrazellulärer *L. monocytogenes* 2. Dem Stamm *L. monocytogenes* 2 fehlen die Gene *actA*, *mpl* und *plcB*.

Bei Immunfluoreszenzfärbungen an mit *L. monocytogenes* EGD infizierten Cos-1-Fibroblasten (MOI=12,5) konnte mit dem anti-Peptid-C-Serum in einer Verdünnung von 1:200 und einem LRSC-konjugierten Ziege-anti-Kaninchen Sekundärantikörper (Dianova) in einer Verdünnung von 1:100 eine Kolokalisation von Stathmin mit der Oberfläche intrazellulärer Listerien beobachtet werden (Abb. 29, 30, 31). Die Färbung des anti-Peptid-C-Serums resultiert meistens in mehreren großen Punkten, die über die gesamte Oberfläche der Bakterien verteilt sind (Abb. 29, Abb. 30, rechte Spalte, Abb. 31). Wie bereits für die anti-LaXp180-Färbung beschrieben, sind nur Bakterien in einigen Bereichen

eines Präparates durch das anti-Peptid-C-Serum angefärbt. Ferner sind in Zellen, in denen Bakterien angefärbt sind, nicht alle Bakterien angefärbt (Abb. 29, Pfeil). Bei Listerien, die bereits einen Aktinschweif ausgebildet haben, färbt das anti-Peptid-C-Serum meistens nur den Pol des Bakteriums, der dem Aktinschweif gegenüber liegt (Abb. 30, linke Spalte, Abb. 31). Eine Doppelfärbung mit FITC-Phalloidin ergab bei dieser Fixierungsmethode keine brauchbaren Resultate.

Um zu überprüfen, ob die Kolo-kalisation von Stathmin mit der Oberfläche von *L. monocytogenes* EGD auf die Anwesenheit von ActA zurückzuführen ist, wurden Cos-1-Zellen mit *L. monocytogenes* $\Delta 2$ infiziert (MOI=50), dem die Gene *actA*, *mpl* und *plcB* fehlen (Hauf *et al.*, 1997). In Abb. 32 sieht man deutlich, daß *L. monocytogenes* $\Delta 2$ Mikrokolonien in der Nähe des Zellkerns ausbildet, da sich die Bakterien fortlaufend im Zytoplasma teilen, aber nicht mehr fortbewegen können. Eine Immunfluoreszenzfärbung mit dem anti-Peptid-C-Serum färbte die Oberfläche von *L. monocytogenes* $\Delta 2$ jedoch nicht an, was bestätigt, daß die beobachtete Kolo-kalisation von Stathmin mit der Oberfläche von *L. monocytogenes* EGD die Anwesenheit von ActA benötigt.

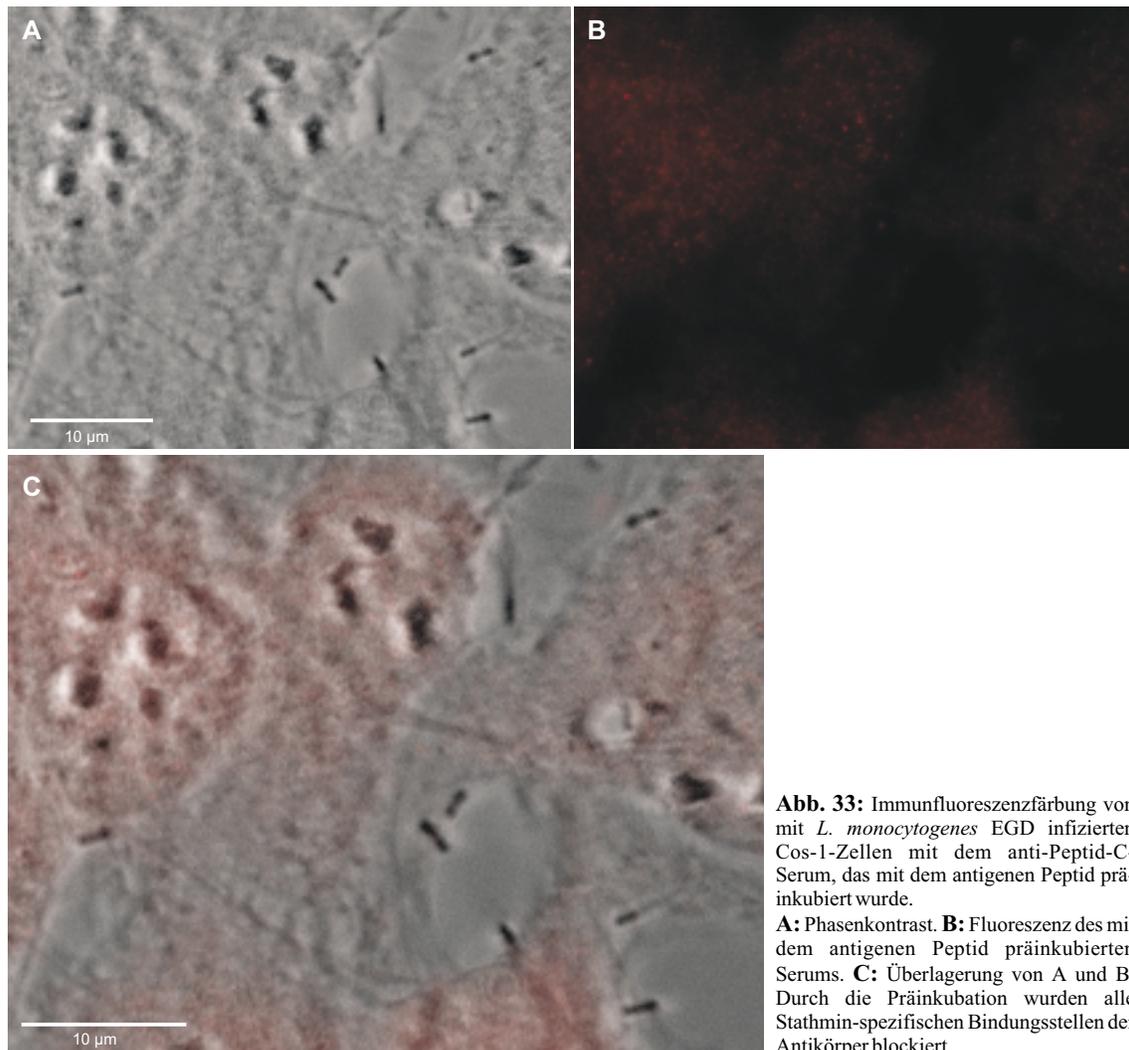


Abb. 33: Immunfluoreszenzfärbung von mit *L. monocytogenes* EGD infizierten Cos-1-Zellen mit dem anti-Peptid-C-Serum, das mit dem antigenen Peptid präinkubiert wurde.

A: Phasenkontrast. **B:** Fluoreszenz des mit dem antigenen Peptid präinkubierten Serums. **C:** Überlagerung von A und B. Durch die Präinkubation wurden alle Stathmin-spezifischen Bindungsstellen der Antikörper blockiert.

Zur Überprüfung der Spezifität des verwendeten anti-Peptid-C-Serums wurden Immunfluoreszenzanalysen mit dem anti-Peptid-C-Serum durchgeführt, das mit dem antigenen Peptid präinkubiert worden war (Gavet *et al.*, 1998). Das präinkubierte Serum wurde freundlicherweise von A. Sobel (INSERM, Paris) zur Verfügung gestellt. Durch die Präinkubation werden alle Peptid-C-spezifischen Bindungsstellen der Antikörper blockiert. Eine Färbung mit diesem Serum resultierte dann nur noch in einem unspezifischen Färbemuster. Die Immunfluoreszenzfärbung wurde mit dem präinkubierten Serum in

der relativ niedrigen Verdünnung von 1:40 unter sonst gleichen Bedingungen wie bei der Färbung mit dem anti-Peptid-C-Serum durchgeführt. Wie in Abb. 33 ersichtlich, färbte das präinkubierte Serum nur die Zellkerne ganz schwach punktiert. Listerien wurden vom präinkubierten Serum nicht angefärbt, was die Spezifität der Färbung der Listerien mit dem anti-Peptid-C-Serum bestätigt.

3 Diskussion

Interaktionen zwischen bakteriellen Proteinen und Proteinen der Wirtszelle spielen Schlüsselrollen im Lebenszyklus pathogener Mikroorganismen. Das Wechselspiel zwischen dem Pathogen und der Wirtszelle kann sich dabei in seiner Komplexität vom einfachen Andocken über Oberflächenproteine zum Zweck der Adhäsion bis zum komplexen Dialog erstrecken, bei dem das Bakterium über sezernierte Proteine in die Signaltransduktion der Zelle eingreift, dort Mechanismen zum eigenen Vorteil in Gang setzt, Veränderungen registriert und darauf wieder reagiert.

Beispiele für bakterielle Proteine, die zur Adhäsion an Oberflächenproteine der Wirtszelle binden und daraufhin eine Internalisierung auslösen, sind das Internalin von *Listeria monocytogenes* oder auch die Invasine von Yersinien. *L. monocytogenes* induziert seine Internalisierung in normalerweise nicht-phagozytische Epithelzellen über eine hochspezifische Bindung des Oberflächenproteins Internalin (InlA) an humanes E-Cadherin (Mengaud *et al.*, 1996). E-Cadherin ist ein Ca^{2+} -abhängiges Zell-Adhäsionsmolekül, das die starke Adhäsion zwischen Epithelzellen in den „Adherens Junctions“ durch homophile Interaktion vermittelt, wobei die zytoplasmatische Domäne über Catenine am Aktin-Zytoskelett verankert ist. Diese Interaktion von Internalin mit E-Cadherin ist gleichzeitig für die Wirtsspezifität verantwortlich, da Maus-E-Cadherin aufgrund eines einzigen Aminosäure-Austausches nicht mehr als Rezeptor fungieren kann (Lecuit *et al.*, 1999). Für die Adhäsion und darauf folgende Internalisierung von *Yersinia pseudotuberculosis* ist die Bindung des Äußeren-Membran-Proteins Invasin an β_1 -Integrine auf der Oberfläche von Säugerzellen verantwortlich (Isberg und Leong, 1990). Integrine sind $\alpha\beta$ -Heterodimere, kommen auf der Oberfläche der meisten Säugerzellen vor und erfüllen Funktionen bei der Zell-Zell-Interaktion, Zellwanderung, Adhäsion sowie der Kommunikation zwischen der extrazellulären Umgebung und dem Zytoskelett. Natürliche Liganden der Integrine sind Proteine der Extrazellulären Matrix und des Zytoskeletts.

Eindrucksvolle Beispiele für bakterielle Proteine, die in die Signaltransduktion der Wirtszelle eingreifen, sind Proteine, die über TypIII-Sekretionssysteme sezerniert werden. Diese Kontakt-abhängigen Systeme ermöglichen extrazellulären Bakterien eine effiziente Kommunikation mit dem Zytosol der Wirtszelle durch Injektion von Effektorproteinen. Ein Modellsystem ist hierfür das auf einem Plasmid kodierte Yop („Yersinia outer proteins“-Regulon von *Yersinia spp.*, das einen Sekretionsapparat aus ca. 30 Proteinen, einen Translokationsapparat aus sechs Proteinen und sechs Effektorproteine kodiert. Der Sekretionsapparat transportiert die Proteine des Translokationsapparates und die Effektorproteine über die beiden bakteriellen Membranen, der Translokationsapparat befördert die Effektorproteine ins Zytoplasma der eukaryotischen Zelle. Die Effektorproteine unterdrücken dann wichtige Funktionen von Immunzellen wie Phagozytose, die Produktion von Superoxid-Anionen und von Tumor-Nekrose-Faktor α . Das Effektorprotein YopH ist eine Protein-Tyrosin-Phosphatase, die p130^{Cas} und FAK („focal adhesion kinase“) dephosphoryliert, was zu einer Zerstörung der peripheren Fokalkomplexe führt (Cornelis und Wolf-Watz, 1997; Persson *et al.*, 1997). YopP (in *Y. pseudotuberculosis* mit YopJ bezeichnet) ist wesentlich an der Induktion von Apoptose in Makrophagen beteiligt, wahrscheinlich durch Verhinderung der Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF κ B in Kombination

mit Inhibition der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (Palmer *et al.*, 1998). YpkA (YopO) besitzt große Homologie zu Serin/Threonin-Kinasen aus Säugerzellen und YopE und YopT sind Zytotoxine, die über eine Modifikation der kleinen GTPase RhoA, einem zentralen Regulator der Aktinpolymerisation, das Aktinskelett der Zelle zerstören. Für YopM ist noch kein zellulärer Phänotyp bekannt (Zumbihl *et al.*, 1999).

Auch für ActA von *L. monocytogenes* wurde bereits eine direkte Bindung der Wirtszellproteine VASP, Aktin und des Arp2/3-Komplexes aufgezeigt (Lasa *et al.*, 1997; Niebuhr *et al.*, 1997; Welch *et al.*, 1998). Diese Wirtszellproteine sind direkt (Arp2/3-Komplex) oder indirekt (VASP) an der Hauptaufgabe von ActA beteiligt, der Polymerisation zellulären Aktins zum Zweck der Fortbewegung. Da ActA als Oberflächenprotein in direktem Kontakt mit unzähligen Proteinen der Wirtszelle steht, ist denkbar, daß es noch mit weiteren, bislang unbekanntem Wirtszellproteinen interagiert. Sei es, daß die Bindung an diese Proteine für die Aktinpolymerisation benötigt wird oder gar für völlig andere, bislang nicht bekannte weitere Funktionen von ActA. Vorstellbar wäre hier zum Beispiel, daß Listerien über das exponierte ActA auch in Signaltransduktionskaskaden der Wirtszelle eingreifen.

Ein vielversprechender Weg, unbekannte Bindungspartner eines bekannten Proteins zu identifizieren, ist das „Yeast Two-Hybrid“-System, ein genetisches System zum Nachweis von Protein-Protein Interaktionen *in vivo* (Fields und Song, 1989). Mit dem „Yeast Two-Hybrid“-System wurden bereits mehrfach Interaktionen zwischen eukaryotischen Proteinen aufgezeigt, es wurde aber bisher nur ein einziges Mal erfolgreich zur Suche nach einem eukaryotischen Bindungspartner für ein bakterielles Protein, dem Protein OpaP von *Neisseria gonorrhoeae* eingesetzt. Opa-Proteine („opacity associated“) sind eine Familie von Proteinen der äußeren Membran, die an der Adhärenz an und Invasion in humane Zellen beteiligt sind. Beim Testen von Proteinen, die von einer cDNA-Genbank aus HeLa-Zellen kodiert werden, konnten fünf Proteinfragmente isoliert werden, die mit OpaP interagieren, darunter eine Pyruvat-Kinase. Über diesen „Yeast Two-Hybrid“-Test wurde gleichzeitig auch ein neuer Pathogenitätsmechanismus entdeckt, nämlich die direkte molekulare Interaktion des Bakteriums mit einem metabolischen Enzym der Wirtszelle zur Verwertung der intrazellulären Kohlenstoffquelle Pyruvat (Williams *et al.*, 1998).

In einer früheren Arbeit (Pfeuffer, 1996) wurde das „Yeast Two-Hybrid“-System eingesetzt, um weitere eukaryotische Proteine zu identifizieren, die mit ActA von *L. monocytogenes* interagieren. Hierbei konnten drei Fragmente bislang unbekannter eukaryotischer Proteine identifiziert werden, die offensichtlich an ActA binden. Während für zwei Fragmente keine Homologie zu bereits veröffentlichten Sequenzen gefunden wurde, war ein cDNA-Insert eines der beim „Yeast Two-Hybrid“-Test isolierten Plasmide (pPC67-15) nahezu identisch mit Teilbereichen zweier humaner cDNA-Sequenzen. Die eine cDNA wurde im Rahmen des humanen Genom-Projektes sequenziert (Nagase *et al.*, 1996), die andere wurde isoliert, da sie offensichtlich ein „unbekanntes humanes Autoantigen“ kodiert, das sowohl mit dem Serum eines Patienten mit Sjögren-Syndrom als auch mit einem monoklonalen Antikörper reagiert, der gegen das Kernprotein La gerichtet ist (Tröster *et al.*, 1994). Sequenzvergleiche zeigten, daß die cDNA, die das „unbekannte humane Autoantigen“ kodiert, Teil der im Rahmen des menschlichen Genom-Projektes sequenzierten cDNA ist. Deren offenes Leseraster kodiert ein ca. 180 kDa großes Protein, das aufgrund der Kreuzreaktivität mit dem monoklonalen anti-La-Antikörper LaXp180 genannt wurde. Das mit ActA-interagierende Proteinfragment, das vom Plasmid pPC67-15 kodiert wird, entspricht den 227 C-terminalen Aminosäuren von LaXp180. Ein weiterer Teilbereich aus LaXp180, ursprünglich mit „CC1“ („coiled-coil forming protein 1“) bezeichnet, wurde ebenfalls über einen „Yeast Two-Hybrid“-Test als Bindungspartner von Stathmin isoliert, einem 19 kDa Phosphoprotein, das die Mikrotubuli-Dynamik reguliert (Maucuer *et al.*, 1995). Obwohl noch völlig unklar ist, ob die drei identifizierten, mit ActA interagierenden Proteine (AIPs) beim natürlichen Verlauf einer *L. monocytogenes*-Infektion eine Rolle spielen, konnten in

dieser Arbeit Nachweise für eine Interaktion von ActA mit LaXp180, einem der AIPs, *in vitro* und *in vivo* erbracht werden.

Das Ansequenzieren der falsch-positiven Plasmide, die aus den Klonen isoliert wurden, welche beim „Yeast Two-Hybrid“-Test nach Transformation der Genbank beide Reportergene aktiviert hatten, aber nach der Passage in *E. coli* und Rücktransformation in die Hefestämme das *lacZ* Gen nicht mehr exprimierten, ergab, daß sich die cDNA-Inserts entweder im falschen Leseraster befinden, in falscher Orientierung, oder nur sehr kurz sind. In den meisten Fällen befindet sich bereits kurz nach der GAL4-TA-Domäne ein Stop-Codon. Das Auftreten solcher falsch positiver Klone nach dem Testen einer Genbank unterstreicht die Notwendigkeit mehrfacher Negativkontrollen und demonstriert gleichzeitig einen Schwachpunkt des Testsystems. Auch die Tatsache, daß die bereits nachweislich mit ActA-interagierenden Proteine des Arp2/3-Komplexes (Welch *et al.*, 1998) und VASP (Niebuhr *et al.*, 1997) im „Yeast Two-Hybrid“-Test nicht isoliert wurden, zeigt eine Limitierung des Systems. Entweder waren die cDNAs dieser Proteine in der Gesamtmenge der cDNAs bei der Herstellung der Genbank unterrepräsentiert oder wurden durch ungünstig liegende Schnittstellen im falschen Leseraster oder nur als sehr kurze Fragmente in die entsprechenden Vektoren ligiert.

Im ersten Teil dieser Arbeit konnte die Bindung von LaXp180 an ActA *in vitro* bestätigt und die Expression von LaXp180-spezifischer mRNA in Säugerzellen nachgewiesen werden. Im zweiten Teil konnte über Immunfluoreszenzmikroskopie eine Kollokalisierung von LaXp180 mit intrazellulären *L. monocytogenes* und darüberhinaus auch eine Kollokalisierung von Stathmin mit intrazellulären Listerien gezeigt werden.

Einen ersten Anhaltspunkt über die Struktur und Funktion von LaXp180 lieferte die computergestützte Analyse der Primärstruktur. LaXp180 hat ein theoretisches Molekulargewicht von 182,8 kDa, einen theoretischen pI von 5,31 und enthält 59 Phosphorylierungsstellen für verschiedene Kinasen, wobei der Großteil aller Phosphorylierungsstellen in der N-terminalen Hälfte von LaXp180 liegt. Aufgrund einer Kernlokalisationssequenz und eines Leucin-Zipper DNA-Bindungsmotivs wurde errechnet, daß LaXp180 mit einer Wahrscheinlichkeit von 69.6% ein Kernprotein ist. Fast die komplette C-terminale Hälfte von LaXp180 kann „coiled-coil“-Strukturen ausbilden. Aufgrund dieser computergestützten Vorhersagen handelt es sich bei LaXp180 offensichtlich um ein ca. 180 kDa großes Kernprotein, das über ein Leucin-Zipper-Motiv an DNA binden kann. Es besteht vermutlich aus einer N-terminalen regulatorischen Domäne, die an vielen Stellen von unterschiedlichen Kinasen phosphoryliert werden kann, und einer C-terminalen Interaktionsdomäne, die über „coiled-coil“-Strukturen an andere Proteine binden kann.

Zur Bestätigung der Interaktion von LaXp180 mit ActA über einen biochemischen Ansatz *in vitro*, wurden die 467 C-terminalen Aminosäuren von LaXp180 in *E. coli* als His₆-Tag-Fusionsprotein kloniert. *E. coli*-Lysate, die rekombinantes ActA enthielten, wurden über Ni-Agarose-Säulen gepumpt, die vorher mit dem His₆-LaXp180 oder einem anderen His₆-Protein beladen oder unbehandelt waren. Die Tatsache, daß ActA nur an einer Ni-Agarose-Säule gebunden wurde, wenn diese vorher mit dem rekombinanten His₆-LaXp180 beladen war, bestätigte die im „Yeast Two-Hybrid“-Test gefundene Interaktion von ActA mit LaXp180 auch *in vitro*. Alle Versuche, die Interaktion von ActA mit LaXp180 über modifizierte Western-Blots nachzuweisen, scheiterten. Hierbei wurden *L. monocytogenes*-Gesamtlysate über ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt, auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert, mit gereinigtem, rekombinantem LaXp180 inkubiert und mit einem polyklonalen anti-LaXp180-Serum und einem entsprechenden Sekundärantikörper entwickelt. Das Scheitern dieser Versuche ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, daß ActA, LaXp180 oder beide durch die Denaturierung trotz anschließender Renaturierung ihre Bindungseigenschaften verloren hatten.

Zur Eingrenzung der LaXp180-Bindungsstelle von ActA wurden verschiedene N-, P- und C-ActA-Fragmente im „Yeast Two-Hybrid“-System auf Interaktion mit LaXp180 ge-

testet. Offensichtlich ist der prolinreiche Bereich von ActA notwendig für eine effiziente ActA-LaXp180 Interaktion. Jedoch sind flankierende Regionen auf beiden Seiten des prolinreichen Bereichs für die Spezifität der Interaktion unabdingbar, da der prolinreiche Bereich als Gal4-DB-Fusion alleine bereits falsch positive Ergebnisse erzeugt, was auch von anderen Arbeitsgruppen beschrieben wurde (Mourrain *et al.*, 1997). Die Interaktionsstudien könnten so interpretiert werden, daß die Interaktion von ActA mit LaXp180 über den prolinreichen Bereich erfolgt und die flankierenden Bereiche den „klebrigen“ prolinreichen Bereich so maskieren, daß eine Interaktion ausschließlich mit LaXp180 erfolgen kann. Die Beobachtung, daß auch ein deletiertes ActA ohne den prolinreichen Bereich eine schwache Interaktion mit LaXp180 zeigt, steht jedoch im Widerspruch zu diesen Ergebnissen und könnte dadurch erklärt werden, daß die durch Deletion des zentralen prolinreichen Bereichs entstandene künstliche Aminosäuresequenz an der Deletionsstelle eine Interaktion hervorruft, denn sowohl der N- als auch der C-terminale Bereich alleine zeigen keine Interaktion mit LaXp180.

Als alternative Methode könnte man versuchen, die Bindungsstellen der beiden Proteine ActA und LaXp180 über „Peptide Spots“ oder „Phage-Display“ zu charakterisieren. Bei Verwendung dieser zwar sehr kostspieligen Testsysteme könnte man zum einen die falsch positiven Ergebnisse bei Verwendung des prolinreichen Bereichs im „Yeast Two-Hybrid“-System umgehen, zum anderen die Bindungsstellen wesentlich genauer eingrenzen.

Da bisher noch völlig unbekannt war, ob das Gen für LaXp180 tatsächlich transkribiert und LaXp180 überhaupt exprimiert wird, wurde die Expression LaXp180-spezifischer mRNA über RT-PCR analysiert. In verschiedenen Zelltypen konnte zum ersten Mal die Expression LaXp180-spezifischer mRNA nachgewiesen werden, wobei zwischen mit *L. monocytogenes* infizierten und nicht-infizierten Zellen kein Unterschied in der LaXp180-mRNA-Konzentration feststellbar war. Durch Herstellung eines polyklonalen anti-LaXp180-Serums konnte über Immunopräzipitation erstmalig ein 194 kDa großes Protein detektiert werden, das spezifisch mit dem anti-LaXp180-Serum reagiert. Über Western-Blots mit Gesamtlysat aus Säugerzellen war keine LaXp180-spezifische Bande auf dieser Höhe zu erkennen, was wahrscheinlich auf eine zu geringe Konzentration an LaXp180 im Gesamtlysat zurückzuführen ist.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde über Immunfluoreszenzmikroskopie mit dem polyklonalen anti-LaXp180-Serum die intrazelluläre Verteilung von LaXp180 in nicht-infizierten und mit verschiedenen *L. monocytogenes*-Stämmen infizierten Cos-1-Fibroblasten analysiert. Zusätzlich wurden die Cos-1-Zellen auch mit unterschiedlichen LaXp180-Fragmenten transfiziert und die Lokalisation von LaXp180 ohne oder nach anschließender Infektion mit *L. monocytogenes* untersucht. Darüberhinaus wurde auch die intrazelluläre Verteilung von Stathmin in Cos-1-Fibroblasten nach Infektion mit verschiedenen *L. monocytogenes*-Stämmen analysiert.

In nicht-infizierten Cos-1-Fibroblasten färbt das anti-LaXp180-Serum die Zellkerne und definierte Bereiche direkt neben den Zellkernen stark an, was nicht überraschend war, da LaXp180 eine Kernlokalisationssequenz im N-terminalen und ein DNA-bindendes Leucin-Zipper-Motiv im C-terminalen Bereich enthält. Eine Änderung der intrazellulären Verteilung von LaXp180 bei Infektion mit *L. monocytogenes* konnte nicht beobachtet werden.

Durch Immunfluoreszenzanalysen an infizierten Zellen wurde gezeigt, daß das anti-LaXp180-Serum intrazelluläre *L. monocytogenes* anfärbt, in BHI-Medium gewachsene Listerien dagegen nicht. In allen Präparaten waren Listerien nur in einigen Bereichen des Zellrasens angefärbt, und in solchen Zellen, die gefärbte Bakterien enthalten, waren selten alle Bakterien gefärbt. Die Ursache hierfür ist unbekannt und könnte mit einer Modifikation des ActA, der limitierten Verfügbarkeit an freiem LaXp180 im Zytoplasma, oder beidem erklärt werden. Für ActA wurde bereits gezeigt, daß es in der Wirtszelle phosphoryliert vorliegt (Brundage *et al.*, 1993). Die Funktion dieser Phosphorylierung ist

jedoch unbekannt. Es ist aber nicht auszuschließen, daß LaXp180 nur an phosphoryliertes oder nur an nicht-phosphoryliertes ActA bindet. Falls der Phosphorylierungszustand von ActA über Proteine der Wirtszelle gesteuert wird, hängt die Bindung von LaXp180 an ActA vom Zustand der Wirtszelle ab. Wenn sich nur wenige Zellen einer Population in genau dem Zustand befinden und ActA so modifizieren, daß LaXp180 binden kann, wäre dies eine Erklärung für das beobachtete Phänomen. Ein Hinweis auf eine limitierte Verfügbarkeit von LaXp180 im Zytoplasma ist die Tatsache, daß LaXp180 überwiegend im Zellkern lokalisiert ist, was die starke Kernfärbung belegt.

Um die Spezifität der Färbung mit dem polyklonalen anti-LaXp180-Serum zu überprüfen, wurden die Zellen mit dem *L. monocytogenes*-Stamm $\Delta 2$ infiziert, dem das *actA*-Gen vollständig fehlt. Dieser Stamm wurde vom anti-LaXp180-Serum nie gefärbt. Die Kolo-kalisation von LaXp180 mit intrazellulären *L. monocytogenes* ist daher auf das Vorhandensein von ActA auf der Bakterienoberfläche zurückzuführen.

Überraschenderweise waren die meisten Bakterien nicht gleichmäßig gefärbt, sondern asymmetrisch, wobei jeweils nur der dem Aktinschweif gegenüberliegende Pol gefärbt war und bei sich teilenden Bakterien der Bereich der Septumbildung. Die F-Aktin-spezifische Färbung des Aktinschweifes durch Phalloidin und die anti-LaXp180-Färbung schlossen sich immer wechselseitig aus. In den meisten Fällen ist der eine, ältere Pol, mit polymerisiertem Aktin bedeckt, am anderen, jüngeren, befindet sich LaXp180. Die Gründe für diese asymmetrische Verteilung sind nicht bekannt. Ein Grund könnte eine sterische Hinderung durch F-Aktin sein, ein anderer eine bereits polare Verteilung von ActA auf der Bakterienoberfläche. Daß LaXp180 nur aufgrund einer sterischen Hinderung durch F-Aktin nicht an dem Pol binden kann, an dem der Aktinschweif ausgebildet wird, kann ausgeschlossen werden, da auch nach einer Behandlung mit Cytochalasin D, das F-Aktin depolymerisiert, LaXp180 stark asymmetrisch auf der Bakterienoberfläche verteilt ist. Eine andere Erklärung wäre, daß bereits ActA asymmetrisch auf der Bakterienoberfläche verteilt ist. In diesem Punkt divergieren jedoch die Forschungsergebnisse. Die Gruppe um Pascale Cossart veröffentlichte Daten, die nahelegen, daß ActA polar auf der Bakterienoberfläche verteilt ist, mit einer höheren Konzentration an einem Pol des Bakteriums. An diesem Pol findet dann verstärkt Aktinpolymerisation statt und der Schweif entsteht. Demnach wäre allein durch diese polare Verteilung die Stelle vorbestimmt, an der der Schweif entsteht, und somit auch die Richtung der Fortbewegung (Kocks *et al.*, 1993; Cossart und Kocks, 1994; Cossart und Lecuit, 1998). Die Gruppe um Jürgen Wehland findet dagegen keine Anzeichen für eine polare Verteilung von ActA auf der Oberfläche und vermutet daher, daß ActA gleichmäßig auf der Oberfläche verteilt ist (Niebuhr *et al.*, 1993). Zahlreiche *in vitro*-Experimente, die in einem zytoplasmatischen Extrakt aus *Xenopus* durchgeführt wurden, sollten zur Klärung der bis heute umstrittenen Frage beitragen. Die Adsorption eines rekombinanten ActA-LytA-Fusionsproteins an die Oberfläche von *Streptococcus pneumoniae* löste an der gesamten Oberfläche Aktinpolymerisation aus, die aber zu keiner Fortbewegung führte. Erst wenn durch Teilung und anschließendes Auseinanderbrechen der Tochterzellen Pneumokokken entstanden sind, deren Oberfläche nur am jeweils alten Zellpol mit dem Fusionsprotein bedeckt war, trat Fortbewegung ein (Smith *et al.*, 1995a). In infizierten Gewebekulturzellen wird eine Fortbewegung von *L. monocytogenes* auch erst nach einer Teilung der Bakterien beobachtet, was die Vermutung nahe legt, daß durch die Teilung aus der symmetrischen Aktinwolke ein unsymmetrisches Gebilde entsteht, was schließlich eine gerichtete Fortbewegung ermöglichen könnte (Robbins *et al.*, 1999). Durch Benetzen von kleinen Polystyrol-Kügelchen mit ActA stellte sich heraus, daß bei sehr kleinen Kügelchen ($\varnothing \leq 0,5 \mu\text{m}$) auch eine gleichmäßige Bedeckung der Oberfläche mit ActA zu einer gerichteten Bewegung führen kann, was durch zufällige Unregelmäßigkeiten in der Dichte der Aktinfilamente oder thermische Bewegung erklärt wird. Ab einem Durchmesser von $2 \mu\text{m}$ entsteht gerichtete Bewegung jedoch nur bei asymmetrisch benetzten Kügelchen. Diese Beobachtung postuliert für die Fortbewegung der relativ großen Listerien eine polare

Verteilung von ActA auf der Oberfläche (Cameron *et al.*, 1999). Wie bereits erwähnt, wird ActA in Säugerzellen phosphoryliert (Brundage *et al.*, 1993), wobei die Phosphorylierung aber keine Voraussetzung für die Aktinpolymerisation zu sein scheint (Lasa *et al.*, 1995). Die in dieser Arbeit gefundenen Ergebnisse könnten durch die Hypothese erklärt werden, daß ActA auf der gesamten Bakterienoberfläche vorkommt und sich an den beiden Polen durch Modifikation, z.B. Phosphorylierung, funktionell unterscheidet, wobei die eine Variante spezifisch mit LaXp180 interagiert, während die andere die zur Aktinpolymerisation notwendigen zellulären Faktoren rekrutiert. Ob LaXp180 selbst der zelluläre Faktor ist, der ActA modifiziert, ist jedoch nicht auszuschließen.

Ein überraschendes Ergebnis lieferte die anti-LaXp180-Färbung von Cos-1-Fibroblasten nach Infektion mit der Mutante *L. monocytogenes* A49. Dieser Stamm synthetisiert ein ActA-Protein, dem der prolinreiche Bereich fehlt. Das anti-LaXp180-Serum färbt hier gleichmäßig die gesamte Bakterienoberfläche an. Diese Beobachtung stimmt mit vorausgegangenen „Yeast Two-Hybrid“-Tests überein, bei denen ebenfalls eine schwache Interaktion dieses deletierten ActA mit LaXp180 festgestellt wurde.

Eine Hypothese, mit der alle Färbungsmuster erklärt werden könnten, wäre eine sterische Hinderung von LaXp180 durch ein zelluläres Protein, das nur an dem Pol an den prolinreichen Bereich von ActA bindet, an dem die Aktinpolymerisation stattfindet. In Frage kämen die Proteine der Ena/VASP-Familie, VASP und Mena, die über die N-terminale EVH-1 (Ena-VASP-homologe)-Domäne an die Konsensussequenz (E/D)FPPPPX(D/E) binden, welche insgesamt viermal im prolinreichen Bereich von ActA vorkommt (Niebuhr *et al.*, 1997). Für VASP wurde bereits eine polare Verteilung auf der Bakterienoberfläche gezeigt: VASP befindet sich nur an dem Pol, an dem die Aktinpolymerisation stattfindet (Chakraborty *et al.*, 1995). Da VASP als Homotetramer vorkommt (Bachmann *et al.*, 1999) und demnach bis zu acht VASP-Homotetramere an einem ActA-Dimer binden können, ist eine sterische Hinderung sehr plausibel. Nach Deletion des prolinreichen Bereiches kann VASP nicht mehr binden, eine sterische Hinderung findet nicht mehr statt und LaXp180 bindet somit auf der gesamten Bakterienoberfläche. Zusammenfassend könnte man sich folgendes Modell vorstellen: ActA kommt auf der gesamten Bakterienoberfläche vor, ist jedoch an nur einem Pol phosphoryliert. VASP bindet nur an phosphoryliertes oder nicht-phosphoryliertes ActA und somit nur an einem Pol. An diesem Pol findet die Aktinpolymerisation statt. Am anderen Pol ist der prolinreiche Bereich von ActA nicht mit VASP besetzt und LaXp180 kann binden.

Da LaXp180 aufgrund einer Kreuzreaktion mit dem monoklonalen anti-La-Antikörper 4B6 isoliert wurde, wurde in dieser Arbeit auch überprüft, ob der Antikörper 4B6 in Immunfluoreszenzfärbungen LaXp180 auf der Oberfläche intrazellulärer Listerien erkennt. Jedoch war die Konzentration der zur Verfügung stehenden Antikörperlösung zu gering, um ein Färbemuster zu erkennen. Da nur eine geringe Menge zur Verfügung stand, war auch eine Aufkonzentrierung nicht möglich. Wie bereits erwähnt, färbt das polyklonale anti-LaXp180-Serum die Zellkerne und definierte Bereiche direkt neben den Zellkernen stark an, das restliche Zytoplasma ist schwach gefärbt. Eine Änderung der intrazellulären Verteilung von LaXp180 nach einer Infektion mit *L. monocytogenes* konnte nicht beobachtet werden. Das Kernprotein La kommt ebenfalls hauptsächlich im Zellkern vor, befindet sich aber auch im Zytoplasma. Im Gegensatz zu LaXp180 wandert La jedoch nach Induktion durch Stressfaktoren wie UV-Strahlung, *Herpes*-Infektion und Gabe von Transkriptioninhibitoren vom Nukleus in das Zytoplasma und kommt daraufhin sogar auf der äußeren Zellmembran vor (Bachmann *et al.*, 1990b). Das für den monoklonalen Antikörper 4B6 beschriebene Färbemuster, eine punktierte Kernfärbung (Tröster *et al.*, 1995), stimmt jedenfalls auch mit dem Färbemuster des polyklonalen anti-LaXp180-Serums überein. Ob LaXp180 neben der Kreuzreaktion mit 4B6 und einer ähnlichen intrazellulären Verteilung weitere Gemeinsamkeiten mit La hat und eventuell auch ein Autoantigen darstellt, ist zum jetzigen Zeitpunkt reine Spekulation und bedarf noch weiterer Untersuchungen.

Um herauszufinden, ob die nur in relativ wenigen Zellen eines Präparates beobachtete Kolokalisation von LaXp180 mit intrazellulären *L. monocytogenes* auf eine zu niedrige Konzentration an LaXp180 zurückzuführen ist, wurden Cos-1-Fibroblasten vor der Infektion mit dem vollständigen LaXp180 oder dem C-terminalen Drittel (AS 1036-1591, vgl. Abb. 4B) transient transfiziert. Nicht-infizierte, mit dem C-terminalen Drittel von LaXp180 transfizierte Zellen, unterscheiden sich im Färbemuster des anti-LaXp180-Serums nicht von nicht-transfizierten Zellen. Im Gegensatz dazu ist das gesamte Zytoplasma von Zellen nach Transfektion mit dem vollständigen LaXp180 sehr stark gefärbt. In Aufnahmen mit sehr kurzer Belichtungszeit sind neben dem Zellkern auch fädige, netzartige Strukturen im Zytoplasma zu erkennen, die sich über die gesamte Zelle erstrecken. Bei diesen Strukturen handelt es sich vermutlich um Komponenten des Zytoskeletts. Für eine genauere Zuordnung dieser Strukturen sind jedoch weitere Untersuchungen nötig. Bei Immunfluoreszenzanalysen von Zellen, die mit dem C-terminalen Drittel von LaXp180 oder dem vollständigen Protein transfiziert und anschließend mit *L. monocytogenes* EGD infiziert wurden, färbte das anti-LaXp180-Serum nur jeweils einen Pol der Bakterien sehr stark an. Diese Ergebnisse decken sich mit den Daten von nicht-transfizierten, infizierten Zellen. Die bei den wenigen Versuchen mit transfizierten Zellen gemachte Beobachtung, daß sich in Zellen nach Transfektion mit dem vollständigen LaXp180 weniger Listerien als in benachbarten, nicht-transfizierten Zellen befinden, sollte weiter verfolgt werden, da sie eventuell Hinweise auf die Rolle der LaXp180-Rekrutierung liefern könnte.

Wie bereits oben erwähnt, wurde ein Teilbereich von LaXp180 als Interaktionspartner von Stathmin isoliert (Maucuer *et al.*, 1995). In der vorliegenden Arbeit konnte über Immunfluoreszenzmikroskopie gezeigt werden, daß auch Stathmin mit intrazellulären *L. monocytogenes* kolokalisiert und diese Kolokalisation strikt vom Vorhandensein von ActA abhängt. Die Verteilung von Stathmin auf der Bakterienoberfläche korreliert mit der von LaXp180. Bei Listerien, die einen Aktinschweif ausgebildet haben, befindet sich Stathmin am Schweif gegenüberliegenden Pol, d.h. am vorderen Pol in Bezug zur Fortbewegungsrichtung. Das 19 kDa Phosphoprotein Stathmin kann an vier Serinresten durch unterschiedliche Kinasen in verschiedene Phosphorylierungszustände versetzt werden und dadurch die Dynamik der Mikrotubuli regulieren. Stathmin ist somit eine zentrale Schaltstelle für das Rearrangement des Mikrotubuli-Zytoskeletts als Antwort auf viele verschiedene Signaltransduktionswege (Walczak, 2000). Daß ActA offensichtlich indirekt über LaXp180 mit Stathmin interagiert, gibt Anlaß für die Vermutung, daß Listerien aktiv in das Rearrangement der Mikrotubuli eingreifen. Über die Rolle der Mikrotubuli im intrazellulären Lebenszyklus von *L. monocytogenes* gibt es bislang keine detaillierten Untersuchungen. Es ist aber bekannt, daß Mikrotubuli-depolymerisierende Agenzien wie Nocodazol die Invasion von *L. monocytogenes* in Endothelzellen (Greiffenberg *et al.*, 1998), Makrophagen (Kuhn, 1998) und Dendritischen Zellen (Guzman *et al.*, 1995) inhibieren. Desweiteren wurde Tubulin in Aktinschweifigen intrazellulär bewegender Listerien nachgewiesen (Buchwalow *et al.*, 1997). Ob Stathmin jedoch in irgendeiner Form an solchen Prozessen beteiligt ist, ist noch völlig unbekannt.

Die Rolle der Mikrotubuli bei der Infektion erklärt sich vielleicht dadurch, daß sich das Aktinskelett und die Mikrotubuli gegenseitig beeinflussen. *L. monocytogenes* verändert durch die massive Aktinpolymerisation die Konzentration von freiem G-Aktin und beeinflusst somit auch das Aktinskelett. So ist das gegenseitige Wechselspiel zwischen Mikrotubuli und dem Aktinskelett z.B. notwendig für die Wanderung von Zellen. Für die Zellbewegung von großen komplexen Zellen wie Epithelzellen und Fibroblasten sind an der Vorderfront, dem „leading edge“ der wandernden Zelle, neben der Polymerisation von Aktin, der Aktivität von Myosin und der Ausbildung von adhäsiven Fokalkontakten auch Mikrotubuli nötig. Bei kleinen, spezialisierten Zellen wie Keratozyten und Leukozyten sind die Mikrotubuli nicht an der Fortbewegung beteiligt (Waterman-Storer und Salmon, 1999). Die Depolymerisation der Mikrotubuli stoppt die Zellwanderung und die Zelle ver-

liert die Polarität, indem die charakteristische Vorderfront verschwindet (Vasiliev, 1991). Erst in jüngster Zeit wurde eine direkte Interaktion zwischen Mikrotubuli und F-Aktin in Zellextrakten nachgewiesen (Sider *et al.*, 1999). Die beiden Proteine MIP-90 und Calponin binden F-Aktin und Mikrotubuli *in vitro* und sind somit mögliche Kandidaten für die Quervernetzung von Mikrotubuli und Aktinfilamenten (Fujii *et al.*, 1997; Gonzalez *et al.*, 1998). Mikrotubuli und Aktinfilamente können auch indirekt über Plektin verbunden werden, da Plektin sowohl Mikrotubuli als auch Aktinfilamente an die Intermediärfilamente binden kann (Foisner und Wiche, 1991). Alternativ können auch Motorproteine an der Mikrotubuli-Aktin Interaktion beteiligt sein, da die Aktin-Motorproteine Myosin IIB und Myosin V an Mikrotubuli gebunden sind (Kelley *et al.*, 1996; Espreafico *et al.*, 1998; Wu *et al.*, 1998). Ebenso können Mikrotubuli-Motorproteine an der Interaktion mit Aktin beteiligt sein. So wurde gezeigt, daß Kinesin nach Depolymerisierung der Mikrotubuli an Aktin-Streßfasern gebunden ist (Okuhara *et al.*, 1989). Stathmin könnte beispielsweise in solche Signaltransduktionswege involviert sein und über die Regulation der Mikrotubuli-Dynamik auch das Aktinskelett beeinflussen.

Für die Signalübermittlung zwischen Mikrotubuli und Aktinskelett kommen die beiden GTPase-Signaltransduktionsproteine RhoA und Rac1 in Frage. Sie werden durch extrazelluläre Agonisten aktiviert und binden GTP, während sie inaktiv GDP binden. Die Aktivierung von Rac1 führt zur Aktinpolymerisation in den Lamellipodien, während die Aktivierung von RhoA die Ausbildung von kontraktile Aktin-Streßfasern und Fokalkontakten fördert (Hall, 1998). Die Steuerung dieser Signalkaskaden durch die dynamische Instabilität der Mikrotubuli könnte die Rolle der Mikrotubuli bei der Entstehung und Vorwärtsbewegung der Lamellipodien sowie die koordinierte Adhäsion und Kontraktion während der Zellwanderung erklären (Waterman-Storer und Salmon, 1999). Kürzlich konnte gezeigt werden, daß die Polymerisation der Mikrotubuli in Fibroblasten zu einer Aktivierung von Rac1 führen kann, welche wiederum zur Aktinpolymerisation und Vorwärtsbewegung der Lamellipodien führt. Die Ursache der Aktivierung ist dabei der Vorgang der Mikrotubulipolymerisation an sich und nicht das bloße Vorhandensein von polymerisierten Mikrotubuli (Waterman-Storer *et al.*, 1999). Weil Rac1-GDP, aber nicht Rac1-GTP an Tubulin binden kann (Best *et al.*, 1996), wird die Rac1-Aktivierung durch das Wachstum der Mikrotubuli dadurch erklärt, daß Rac1-GTP während des Wachstums von den Mikrotubuli ins Zytoplasma abgegeben wird. Da die Vorgänge bei der Zellwanderung oft mit dem Mechanismus der Fortbewegung der Listerien durch Aktinpolymerisation verglichen werden, erfüllt Stathmin vielleicht auch indirekt eine Funktion für die Aktinpolymerisation.

Die erstaunliche Beobachtung, daß ein durch Nocodazol induzierter „Breakdown“ der Mikrotubuli in Fibroblasten zur raschen Bildung von massiven Membranausstülpungen führt, die Lamellipodien ähneln (Mikhailov und Gundersen, 1998), könnte der Schlüssel für die Funktion von Stathmin beim Infektionszyklus von *L. monocytogenes* sein. Bereits 1989 wurde beobachtet, daß die künstliche Depolymerisation der Mikrotubuli in Fibroblasten durch Nocodazol bereits drei Minuten nach Zugabe zu einer Zunahme der Zellkontraktilität und anschließender Bildung von Aktin-Streßfasern führte (Danowski, 1989). Weiter wurde beschrieben, daß die Nocodazol-induzierte Kontraktilität mit der Phosphorylierung der regulatorischen leichten Kette von Myosin II korreliert. Dies postuliert, daß die Depolymerisation der Mikrotubuli einen Signalweg in Gang setzt, der zur Aktivierung von Myosin führt, was schließlich die Kontraktilität erhöht und zur Bildung von Aktin-Streßfasern und Fokalkontakten führt (Chrzanowska-Wodnicka und Burridge, 1996). Die durch die Depolymerisation ausgelöste Signalübermittlung erfolgt offensichtlich über RhoA, da spezifische RhoA-Inhibitoren die durch die Mikrotubuli-Depolymerisation induzierte Bildung von Streßfasern und Fokalkontakten unterdrücken (Enomoto, 1996; Zhang *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 1998). Hier wird postuliert, daß ein an die Mikrotubuli gebundener RhoA-Aktivator bei der Depolymerisation ins Zytosol entlassen wird. Ein solcher

RhoA-Aktivator könnte GEF-H1 sein, ein Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor, der Rac1 und RhoA aktivieren kann und an Mikrotubuli lokalisiert ist (Ren *et al.*, 1998).

Für eine *L. monocytogenes*-Infektion wäre demnach denkbar, daß Listerien über ActA und LaXp180 Stathmin modifizieren, was zu einer lokalen Depolymerisierung der Mikrotubuli führt und die Ausbildung von Membranausstülpungen zur Folge hat. An der Spitze solcher Ausstülpungen können sich die Listerien dann in die Nachbarzelle ausbreiten. Über Videomikroskopie wurde bereits gezeigt, daß nicht alle Listerien, die gegen die Membran stoßen, eine Membranausstülpung ausbilden, sondern häufig abprallen. Die Wahrscheinlichkeit, abzuprallen, hängt dabei sehr stark vom Alter des Zellmonolayers ab. Daraus wird gefolgert, daß die Ausstülpung der Membran kein passiver Prozeß ist und nicht allein dadurch zustande kommt, daß sich das Bakterium gegen die Membran nach außen bewegt, sondern vom submembranen Zytoskelett oder von Veränderungen der Zell-Zell-Adhäsion abhängt (Robbins *et al.*, 1999). Ein Hinweis für die Funktion von Stathmin, durch eine lokale Depolymerisation der Mikrotubuli die Ausbildung von Membranausstülpungen zu induzieren, damit sich die Listerien an der Spitze einer solchen Ausstülpung in die Nachbarzelle ausbreiten kann, ist die Lokalisation von LaXp180 und Stathmin am vorderen Pol des Bakteriums (in Bewegungsrichtung), genau an dem Pol, der mit der Zytoplasmamembran in Kontakt kommt.

Um dieses Modell zu überprüfen, müsste zunächst die Region in ActA genau charakterisiert werden, an die LaXp180 bindet. Nach Deletion dieser Region könnte LaXp180 und somit auch Stathmin nicht mehr binden. Falls dann die Fortbewegung dieser Mutante unbeeinträchtigt ist, sie sich aber nicht mehr in die Nachbarzellen ausbreiten kann, wäre das ein starker Hinweis auf die Funktion von Stathmin, die Ausbildung von Membranausstülpungen zu induzieren. Sollten sich diese Vermutungen bestätigen, so wäre damit gezeigt, daß ActA nicht nur für die intrazelluläre Bewegung notwendig ist, sondern durch die Rekrutierung von LaXp180 und Stathmin auch aktiv am Mechanismus der Ausbreitung von Zelle zu Zelle beteiligt ist.

4 Methoden

Alle nicht im einzelnen beschriebenen Methoden wie Restriktionsverdau von DNA, Horizontale Agarose-Gelelektrophorese, Ligation von DNA-Fragmenten, Polymerase-Kettenreaktion (PCR), Transformation von *E. coli*, Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*, SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE), Western-Blot, Coomassie-Blau- und Silberfärbung von Polyacrylamid-Gelen wurden nach Standardprotokollen aus Sambrook *et al.*, 1989 durchgeführt. Die „Yeast Two-Hybrid“-Tests erfolgten nach dem Produktprotokoll des MatchmakerTM-Two-Hybrid Systems (Clontech).

4.1 Aufreinigung von rekombinanten Proteinen

4.1.1 Aufreinigung von His₆-LaXp180 unter denaturierenden Bedingungen

Zur Aufreinigung von rekombinantem LaXp180 wurde das QIAexpressTM-System (Qiagen) verwendet, bei dem Proteine mit einem „Tag“ aus sechs Histidinen versehen werden, die dann über eine Ni-NTA Matrix (Nickel-Nitrilotriacetat) gereinigt werden können. Hierzu wurden die allgemeinen Protokolle aus „The QIAexpressionist, A handbook for high-level expression and purification of 6xHis-tagged proteins, 3rd Edition July 1997, Qiagen“ für His₆-LaXp180 optimiert. Da His₆-LaXp180 zum größten Teil unlöslich in Einschlußkörpern vorliegt, wird durch eine Aufreinigung unter denaturierenden Bedingungen die größte Ausbeute erzielt.

1 Liter 2YT-Medium (100 µg/µl Ampicillin, 30 µg/µl Kanamycin) wird mit 50 ml Übernachtskultur von *E. coli* M15 pQHS30 angeimpft und bei 37 °C unter Schütteln inkubiert, bis eine OD₆₀₀=1,0 erreicht ist (~3 h). Die Expression des His₆-LaXp180 ist optimal bei Induktion mit 1 mM IPTG bei einer OD₆₀₀=1,0 4 h bei 37 °C. Die Kultur wird abzentrifugiert (6000 rpm, 15 min, 4 °C), das Pellet zweimal mit FP-Puffer (4 °C) gewaschen und bis zur Weiterverarbeitung bei -80 °C eingefroren.

Ab hier erfolgen alle Arbeitsschritte auf Eis oder im Kühlraum mit vorgekühlten Geräten und Lösungen. Alle benötigten Puffer werden frisch mit einer Spatelspitze des Proteinase-Inhibitors PMSF versetzt. Das Pellet wird in 20 ml FP-Puffer resuspendiert, die Bakteriensuspension dreimal mit der FrenchTM-Press homogenisiert und abzentrifugiert (16000 rpm, 30 min, 4 °C). Der Überstand mit den zytoplasmatisch löslichen Proteinen wird verworfen, da His₆-LaXp180 zum größten Teil unlöslich ist und somit im Pellet vorliegt. Das Pellet wird 30 min mit einem Rührfisch im Eisbad in 20 ml Tritonpuffer suspendiert und bei 17000 rpm 15 min bei 4 °C abzentrifugiert. Das Pellet wird nochmals 30 min in 20 ml Tritonpuffer resuspendiert, abzentrifugiert und das verbleibende Pellet anschließend in 20 ml 6 M Guanidin-Puffer ebenfalls unter Rühren 30-60 min vollständig suspendiert. Das His₆-LaXp180 geht jetzt in Lösung. Der nach 15 min Zentrifugation bei 17000 rpm und 4 °C erhaltene Überstand wird auf die mit 6 M Guanidin-Puffer äquilibrierte Ni-NTA-Säule (15 ml Ni-NTA Agarose) mit geringer Pumpgeschwindigkeit geladen.

Nach dem Beladen der Säule wird das Protein in sinkender Konzentration an Guanidin rückgefaltet. Mit einem Gradientenmischer (20 ml 6 M Guanidin-Puffer/20 ml 1 M Guanidin-Puffer) wird ein linearer Gradient von 6 M zu 1 M Guanidin erzeugt. Mit reichlich 1 M Guanidin-Puffer (300 ml) wird bei höherer Pumpgeschwindigkeit gewaschen. Die Elution des His₆-LaXp180 erfolgt über einen Gradienten aus je 20 ml FP-Puffer mit 10 % Glycerin und Elutions-Puffer. Über einen Fraktionssammler werden Fraktionen à 1,5 ml aufgefangen. Mit Elutions-Puffer wird so lange eluiert, bis 60 Fraktionen gesammelt sind, danach wird die Säule mit reichlich (200 ml) Regenerations-Puffer regeneriert.

FP-Puffer: (Frenchpress-Puffer): 50 mM Tris pH 8,0; 50 mM KCl; 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) (0,1 M Stammlösung in Ethanol); 1 mM Dithiothreitol (DTT); pH auf 7,5 einstellen. **Triton-Puffer:** 50 mM Tris pH 8,0; 100 mM KCl; 1 mM DTT; 1 mM PMSF; 1 % Triton-X-100; pH auf 7,5 einstellen. **Guanidin-Puffer:** 50 mM Tris pH 8,0; 50 mM KCl; 10 % Glycerin; 1 mM PMSF; 1 mM DTT; 6 bzw. 1 M Guanidin; pH auf 7,5 einstellen. **Elutions-Puffer:** 50 mM Tris pH 8,0; 50 mM KCl; 10 % Glycerin; 1 mM PMSF; 1 mM DTT; 250 mM Imidazol; pH auf 7,5 einstellen. **Regenerations-Puffer:** 0,2 M Essigsäure; 30 % Glycerin.

4.1.2 Aufreinigung von rekombinantem ActA

Rekombinantes ActA wurde unter Verwendung des ImpactTM I-Systems (New England Biolabs) aufgereinigt. Hierbei wird ActA als ActA-Intein-CBD („Chitin binding domain“-Fusionsprotein exprimiert. Durch die CBD wird das Fusionsprotein an einer Chitin-Säule gebunden. Anschließend wird unter reduzierenden Bedingungen das anfusionierte ActA durch die Intein-domäne abgespalten und von der Säule eluiert. Hierzu wurden die allgemeinen Protokolle aus dem Handbuch des ImpactTM I-Systems für die Aufreinigung von ActA optimiert. Die Überexpression des ActA-Intein-CBD Fusionsproteins in *E. coli* DH5 α war am stärksten bei 30 °C in 2YT-Medium nach Induktion mit 1 mM IPTG für 4 h. Die OD₆₀₀ im Bereich von 0,5 bis 1,5 zum Zeitpunkt der Induktion hatte im Gegensatz zur Induktion von His₆-LaXp180 keinen Einfluß auf die Überexpression. Die Überexpression ist jedoch wesentlich geringer als bei His₆-Tag Proteinen. Eine starke Überexpression ist auch nicht gewollt, da Intein-CBD-Fusionen nativ aufgereinigt werden müssen. Eine starke Überexpression hätte zur Folge, daß das Fusionsprotein in Einschlußkörpern vorliegt und nur noch denaturierend in Lösung gebracht werden kann. Das denaturierte Protein kann jedoch nicht an Chitin binden.

1 Liter 2YT-Medium (100 μ g/ μ l Ampicillin) wird mit 10 ml Übernachtskultur von *E. coli* pCYB-ActA angeimpft und bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Die Induktion der Überexpression erfolgt bei einer OD₆₀₀ ~1 mit 1 mM IPTG 4 h unter Schütteln bei 30 °C. Die Kultur wird 15 min bei 4 °C mit 6000 rpm abzentrifugiert, das Pellet zweimal mit Säulenpuffer (4 °C) gewaschen und bis zur Weiterverarbeitung bei -80 °C eingefroren.

Alle folgenden Arbeitsschritte werden auf Eis bzw. im Kühlraum mit vorgekühlten Geräten und Lösungen durchgeführt und sämtliche Puffer frisch mit einer Spatelspitze PMSF versetzt. Das Pellet wird in 20 ml Säulenpuffer gelöst, dreimal mit der FrenchTM-Press homogenisiert und bei 17000 rpm 15 min bei 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand wird langsam (20 ml in 45 min) auf eine mit Säulenpuffer äquilibrierte Chitin-Säule (20 ml Chitin-Säulenmatrix, New England Biolabs) geladen und mit 300 ml Säulenpuffer gewaschen. Zur Induktion der Intein-Spaltung werden 40 ml Spaltpuffer bei maximaler Geschwindigkeit über die Säule gepumpt, die Pumpe gestoppt und die Säule verschlossen. Die Spaltung läuft über Nacht bei 4 °C. Am nächsten Tag wird mit Spaltpuffer ohne DTT eluiert und ca. 50 Fraktionen à 1,5 ml mit einem Fraktionssammler aufgefangen. Zur Regeneration wird reichlich Regenerationspuffer über die Säule gepumpt, wobei die ersten

10 Fraktionen ebenfalls aufgefangen werden. Da sich das SDS im Regenerationspuffer nur warm löst, werden die Säule und der Regenerationspuffer im Wasserbad auf ca. 60°C erwärmt.

Säulenpuffer: 20 mM Tris (pH 8,0); 500 mM NaCl; 0,1 mM EDTA; 0,1% Triton-X-100. **Spaltpuffer:** 20 mM Tris (pH 8,0); 50 mM NaCl; 0,1 mM EDTA; 30 mM DTT (DTT wird immer frisch dazugegeben). **Spaltpuffer ohne DTT:** 20 mM Tris (pH 8,0); 50 mM NaCl; 0,1 mM EDTA. **Regenerationspuffer:** 20 mM Tris (pH 8,0); 500 mM NaCl; 1% SDS.

4.1.3 Zusätzliche Reinigung über SDS-PAGE

Für eine zusätzliche Reinigung werden alle Fraktionen, die das jeweilige rekombinante Protein enthalten, vereinigt, mindestens 2 h (auch über Nacht) mit 10% TCA im Eisbad gefällt und bei 6000 rpm 15 min bei 4°C abzentrifugiert. Das Protein-Pellet wird einmal mit eiskaltem (-20°C) Aceton gewaschen und in 4x Laemmli-Puffer gelöst. Falls der Laemmli-Puffer dabei gelb wird (niedriger pH), wird 10 M NaOH mikroliterweise bis zur Blaufärbung zugegeben. Über ein präparatives SDS-Gel (breite Spacer, eine kleine Tasche für Marker und eine große für das zu reinigende Protein) werden die Proteine aufgetrennt (Lauf bei 4°C, da das dicke Gel sonst überhitzt). Das Gel wird mit Coomassie-Blau (0,05% in H₂O) gefärbt, mit H₂O entfärbt und die entsprechende Bande ausgeschnitten. Die kleingeschnittenen Gelstücke werden in einer BIOTRAPTM-Kammer (Schleicher & Schüll) in Biotrap-Puffer (6,06 g Tris; 28,82 g Glycin; 5 ml 10% SDS; auf 2 l H₂O) mit 100 V über Nacht eluiert, bis die Gelstücke farblos sind. Vor der Entnahme des eluierten Proteins wird 20 sec umgepolt, um alles Protein von der Membran zu lösen. Für den Zusammenbau der Kammer siehe [Geuder, 1987](#).

4.2 LaXp180-ActA *in vitro*-Bindungstest

Für den LaXp180-ActA *in vitro*-Bindungstest wird ein nativer Rohzelleextrakt aus *E. coli* M15 pQHS30, der nach Induktion mit IPTG große Mengen an rekombinatem His₆-LaXp180 enthält, auf eine Ni-NTA Säule (Qiagen) geladen und intensiv gewaschen. In einem nativen Rohzelleextrakt aus *E. coli* pCYB-ActA, der durch Induktion mit IPTG ActA als ActA-Intein-CBD („Chitin binding domain“-Fusionsprotein überexprimiert, wird durch Zugabe von β -Mercaptoethanol die Selbstspaltung des Inteins induziert. Dieser Zelleextrakt, der das bereits von der Intein-CBD-Fusion abgespaltene native ActA enthält, wird über die Säule gegeben, an der bereits das His₆-LaXp180 gebunden ist. Nach intensivem Waschen werden die Proteine mit einem ansteigenden Imidazol-Gradienten von der Säule eluiert.

Für die Überexpression von rekombinatem His₆-LaXp180 werden 125 ml 2YT-Medium (100 μ g/ μ l Ampicillin, 30 μ g/ μ l Kanamycin) mit 10 ml Übernachtskultur von *E. coli* M15 pQHS30 angeimpft und bei 37°C unter Schütteln inkubiert, bis eine OD₆₀₀=1,0 erreicht ist (~3 h). Die Expression des His₆-LaXp180 ist optimal bei Induktion mit 1 mM IPTG bei einer OD₆₀₀=1,0 über 4 h bei 37°C. Die Kultur wird bei 6000 rpm 15 min bei 4°C abzentrifugiert, das Pellet zweimal mit Bindungspuffer (4°C) gewaschen und bis zur Weiterverarbeitung bei -80°C eingefroren.

Zum Überexprimieren von rekombinatem ActA werden 125 ml 2YT-Medium (100 μ g/ μ l Ampicillin) mit 10 ml Übernachtskultur von *E. coli* pCYB-ActA angeimpft und bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Die Induktion der Überexpression erfolgt bei einer OD₆₀₀ ~1 mit 1 mM IPTG 4 h lang unter Schütteln bei 30°C. Die Kultur wird 15 min bei 4°C mit 6000 rpm abzentrifugiert, das Pellet zweimal mit Bindungspuffer (4°C) gewaschen und bis zur Weiterverarbeitung bei -80°C eingefroren.

Die nächsten Schritte werden auf Eis bzw. im Kühlraum mit vorgekühlten Puffern und Geräten durchgeführt und alle benötigten Puffer frisch mit einer Spatelspitze PMSF versetzt. Das Pellet aus 125 ml Kultur von *E. coli* pCYB-ActA wird in 10 ml Bindungspuffer gelöst, dreimal mit der FrenchTM-Press homogenisiert und abzentrifugiert (17000 rpm, 15 min, 4 °C). Der Überstand wird zur Induktion der Inteinspaltung mit 7 µl β-Mercaptoethanol versetzt (≙Endkonzentration von 20 mM) und 2 h bei 4 °C unter Rühren inkubiert.

In dieser Zeit wird das Pellet aus 125 ml Kultur von *E. coli* M15 pQHS30 in 10 ml Bindungspuffer gelöst, dreimal mit der FrenchTM-Press homogenisiert und abzentrifugiert (16000 rpm, 30 min, 4 °C). Der Überstand wird langsam auf eine mit Bindungspuffer äquilibrierte Ni-NTA Säule (Qiagen) geladen, die 15 ml Ni-NTA Agarose enthält. Die Säule wird mit mindestens 100 ml Bindungspuffer und hoher Pumpgeschwindigkeit gewaschen.

Zum Überstand mit dem rekombinanten ActA werden nach der Inteinspaltung 80 ml Bindungspuffer zum Absenken der β-Mercaptoethanolkonzentration zugegeben. Die Lösung wird nach dem Waschschrift langsam auf die Säule gepumpt, die bereits mit His₆-LaXp180 beladen wurde. Die Säule wird mit mind. 300 ml Bindungspuffer und hoher Pumpgeschwindigkeit gewaschen und mit einem Gradienten mit ansteigender Imidazolkonzentration eluiert. Hierzu werden 10 ml Bindungspuffer und 10 ml Elutionspuffer über einen Gradientenmischer langsam auf die Säule gepumpt. Anschließend wird Elutionspuffer auf die Säule gegeben, bis ca. 40 Fraktionen aufgefangen sind. Beim Regenerieren der Säule mit Regenerationspuffer werden zusätzlich noch die ersten 10 Fraktionen gesammelt.

Die Fraktionen werden mit 10% TCA gefällt (über Nacht im Eisbad) und abzentrifugiert (14000 rpm, 15 min, 4 °C). Die Protein-Pellets werden einmal mit eiskaltem (-20 °C) Aceton gewaschen und in je 30 µl 4x Laemmli-Puffer gelöst. Falls der Laemmli-Puffer dabei gelb wird (niedriger pH), wird NaOH mikroliterweise bis zur Blaufärbung zugegeben. Für Western-Blots werden 15 µl einer Fraktion auf eine Spur eines SDS-Polyacrylamidgels aufgetragen, elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und mit den entsprechenden Antikörpern entwickelt.

Bindungspuffer: 50 mM NaH₂PO₄; 300 mM NaCl; 10 mM Imidazol; 10 mM β-Mercaptoethanol; pH 7,2. **Elutionspuffer:** 50 mM NaH₂PO₄; 300 mM NaCl; 250 mM Imidazol; 10 mM β-Mercaptoethanol; pH 7,2. **Regenerations-Puffer:** 0,2 M Essigsäure; 30 % Glycerin.

4.3 RNA Isolation, cDNA Synthese und RT-PCR

Die RNA Isolation aus Gewebekulturzellen beruht auf der Guanidiniumisothiocyanat Methode von **Chomczynski und Sacchi, 1987**. Um eine Kontamination mit RNasen zu verhindern, werden alle Lösungen (außer aminogruppenhaltige wie z.B. Tris oder EDTA) mit 0,1 % Diethylpyrocarbonat (DEPC) behandelt und bei allen Schritten Handschuhe getragen. Die Zellen werden in einer Schale (Ø=60 mm) kultiviert, das Medium abgezogen, 0,5 ml Denaturierungslösung zugegeben und durch auf- und abpipettieren lysiert. Das Homogenat wird in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt, mit 50 µl 2 M Natriumacetat (pH 4) versetzt und durchmischt. Nach Zugabe von 500 µl Wasser-gesättigtem Phenol und 100 µl Chloroform/Isoamylalkohol (49:1) wird sorgfältig durchmischt, 15 min auf Eis inkubiert, abzentrifugiert (10000 g, 20 min, 4 °C) und die obere wässrige Phase, die die RNA enthält, in ein neues Reaktionsgefäß transferiert. Die RNA wird durch Zugabe von 0,5 ml Isopropanol (-20 °C) 30 min bei -20 °C gefällt, abzentrifugiert (10000 g, 10 min, 4 °C) und das Pellet in 150 µl Denaturierungslösung gelöst. Die RNA wird erneut durch Zugabe von 150 µl Isopropanol 30 min bei -20 °C gefällt, abzentrifugiert (10000 g, 10 min, 4 °C), das Pellet in 200 µl 75 % Ethanol gelöst und 10 min bei Raumtemperatur (RT)

inkubiert, um die restlichen Spuren des Guanidiniumisothiocyanats in Lösung zu bringen. Nach 5 min Abzentrifugieren bei 10000 g wird der Überstand verworfen, das Pellet 5 min im Vakuum bei RT getrocknet und in 15 μl DEPC- H_2O durch dreimaliges Erwärmen auf 55°C, kräftiges Mischen, inkubieren auf Eis und kurzes Abzentrifugieren gelöst.

Die cDNA-Synthese erfolgt mit dem 1st-Strand Synthesis Kit (Stratagene) nach dem Protokoll des Herstellers. Zu 5 μg RNA in 32 μl DEPC- H_2O werden 3 μl Oligo-dT Primer (100 ng/ μl) gegeben, durchgemischt, 5 min auf 65°C erhitzt und langsam auf RT abgekühlt. Nach Zugabe von 5 μl 10x 1st-Strand Buffer, 5 μl 0,1 M DTT, 0,5 μl RNA-Guard, 3,75 μl dNTP-Mix und 1 μl Murine Leukemia Virus Reverse Transkriptase wird der Ansatz 1 h bei 37°C inkubiert.

Mit spezifischen Primerpaaren werden die Nukleotidsequenzen der entsprechenden Gene, deren Transkription untersucht werden soll, über PCR mit unverdünnter oder 1:50 verdünnter cDNA als Template amplifiziert. Parameter für die PCR sind 1 min Denaturierung bei 94°C, 1 min „Annealing“ bei 56°C, 1 min Elongation bei 72°C über 30 Zyklen. Die PCR-Produkte werden elektrophoretisch in einem 1%-igen Agarose-Gel aufgetrennt und nach Ethidiumbromid-Färbung unter UV Licht sichtbar gemacht. Als interne Kontrolle werden PCRs mit β -Aktin spezifischen Primerpaaren durchgeführt. Zur Kontrolle auf Kontamination mit DNA werden PCRs mit den RNA-Proben, die nicht revers transkribiert wurden, durchgeführt.

Denaturierungslösung: 4 M Guanidiniumisothiocyanat; 20 mM Natriumacetat (pH 5,2); 0,1 mM DTT; 0,5% Sarkosyl. **DEPC- H_2O :** 0,1% DEPC in H_2O , über Nacht bei 37°C inkubieren, autoklavieren (DEPC wird durch Autoklavieren zerstört). **dNTP-Mix:** 20 mM dATP, 20 mM dCTP, 20 mM dGTP, 20 mM dTTP in DEPC- H_2O .

4.4 Immunopräzipitation von LaXp180

Die Protokolle zur Immunopräzipitation wurden nach [Sambrook et al., 1989](#), modifiziert. Zur Herstellung eines Proteinextraktes aus Cos-1-Fibroblasten werden die in einer Schale ($\varnothing=90$ mm) in RPMI 1640 Medium, 10% FCS kultivierten Zellen mit PBS gewaschen, auf Eis vorgekühlt und mit 1 ml eiskaltem Lysispuffer 20 min auf Eis lysiert. Das gallertartige Lysat wird mit einem Gummischaber abgeschabt und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt.

Für die Immunopräzipitation von LaXp180 wurden neben Lysaten aus Cos-1-Fibroblasten auch Gehirnextrakte von Mäusen verwendet, da das Phosphoprotein Stathmin in der höchsten Konzentration im Gehirn vorkommt ([Koppel et al., 1990](#)). Da Stathmin offensichtlich an LaXp180 bindet ([Maucuer et al., 1995](#)), wurde davon ausgegangen, daß vermutlich auch LaXp180 im Gehirn in höherer Konzentration vorkommt. Für einen Maus-Gehirnextrakt werden Gehirne von zwei BL-6 Mäusen in 2 ml Lysispuffer homogenisiert, 20 min auf Eis inkubiert, abzentrifugiert (14000 rpm, 5 min, 4°C) und der Überstand in der Ultrazentrifuge abzentrifugiert (100000 rpm, 6 min, 4°C). Das Lysat kann bei -80°C aufbewahrt werden (nach [Koppel et al., 1990](#)).

Zu 500 μl Lysat werden 100 μl NET-Gel-Puffer und 5 μl anti-LaXp180-Serum gegeben und 1 h im Kühlraum unter starkem Schütteln (Vibrax) inkubiert. In dieser Zeit lässt man die Protein-A-Agarose vorquellen, indem man 10 mg Protein-A-Agarose (Sigma P-0932) in 1 ml H_2O resuspendiert, nach 30 min abzentrifugiert (5 min) und das Pellet in 50 μl H_2O aufnimmt. 10 μl der vorgequollenen Protein-A-Agarose-Lösung werden zum Lysat zugegeben und erneut 1 h unter starkem Schütteln (die Protein-A-Agarose darf sich nicht absetzen) im Kühlraum inkubiert. Nach Abzentrifugieren (5 min) wird das Pellet zweimal mit NET-Gel-Puffer und einmal mit 10 mM Tris (pH 7,5), 0,1% Igepal 20 min unter kräftigem Schütteln gewaschen. Das Pellet wird in 20 μl 4x Laemmli-Puffer aufgenommen,

5 min bei 100 °C aufgeköcht, erneut abzentrifugiert, der Überstand über SDS-PAGE aufgetrennt und nach Transfer auf eine Nitrozellulosemembran im Western-Blot mit dem anti-LaXp180-Serum (1:1000) und SC-2004 (1:1000) als Sekundärantikörper analysiert. Als Negativkontrollen werden Immunopräzipitationen mit dem Präimmunserum des Kaninchens oder ohne Serum durchgeführt.

Lysispuffer: 50 mM Tris-Cl (pH 7,5); 150 mM NaCl; 0,02% NaN₃; 0,1% SDS; 100 µg/ml PMSF (Stammlösung 10 mg/ml in Isopropanol); 1 µg/ml Aprotinin (Stammlösung 10 mg/ml in 0,01 M HEPES); 1 % Igepal; 0,5 % Natriumdeoxycholat. Die PMSF- und Aprotinin-Stammlösungen werden bei -20 °C gelagert und frisch zugesetzt. **NET-Gel-Puffer:** 50 mM Tris-Cl (pH 7,5); 150 mM NaCl; 0,1 % Igepal; 1 mM EDTA (pH 8,0); 0,25 % Gelatine; 0,02 % NaN₃.

4.5 Immunfluoreszenzfärbung von Gewebekulturzellen

4.5.1 Kultur und Infektion von Cos-1-Fibroblasten

Cos-1-Fibroblasten und Caco-2-Epithelzellen werden in 250 ml Zellkulturflaschen in 12 ml RPMI 1640 (Gibco), 10 % Fötale Kälberserum (FCS) im Brutschrank bei 37 °C und 5% CO₂ kultiviert. Wenn der Zellrasen fast geschlossen ist, werden die Zellen passagiert (3x wöchentlich), indem das Medium abgesaugt, einmal mit Phosphat-gepufferter Saline (PBS) gewaschen wird und die Zellen durch Trypsin-EDTA (Gibco) vom Flaschenboden abgelöst werden: 2 ml Trypsin-EDTA werden zugegeben, durch Schwenken gleichmäßig über den Zellrasen verteilt und abgesaugt. Die Flasche wird im Brutschrank inkubiert, bis der Zellrasen sich abzulösen beginnt (ca. 5 min). Der Zellrasen wird mit 6 ml Medium abgespült und durch Auf- und Abpipettieren suspendiert. 2 ml der Zellsuspension werden in eine neue Flasche gegeben, die bereits 10 ml Medium enthält.

Für die Isolation von RNA werden 48 h vorher 5·10⁶ Zellen in Schalen (Ø=60 mm) ausgesät, für Immunfluoreszenzfärbungen werden 48 h vorher 2·10⁵ Zellen oder 72 h vorher 1·10⁵ Zellen in einen Napf einer 12-Napf Platte ausgesät, in dem sich bereits ein Deckglas (aus Glas zur Aceton-Fixierung!) befindet.

Zur Herstellung von *L. monocytogenes*-Glyzerinkulturen für Infektionen werden 20 ml BHI Medium („brain heart infusion“) 1:50 mit einer Übernachtskultur angeimpft und im Schüttler bei 37°C inkubiert, bis 180 Klett-Einheiten erreicht sind. Die Kultur wird 15 min bei 6000 rpm und 4 °C abzentrifugiert, zweimal mit kaltem PBS gewaschen, in 10 ml PBS, 20 % Glyzerin suspendiert, aliquotiert und bei -80 °C aufbewahrt. Säugerzellen werden für Immunfluoreszenzfärbungen mit einer MOI=50 („multiplicity of infection“) für die Stämme *L. monocytogenes* A49 und *L. monocytogenes* Δ2 und einer MOI=12,5 für *L. monocytogenes* EGD infiziert, zur Isolation von RNA aus infizierten Säugerzellen generell mit einer MOI=50 für alle Stämme.

Zur Infektion werden die Gewebekulturzellen einmal mit PBS (mit Ca²⁺/Mg²⁺) gewaschen und neues Medium zugegeben, welches die einer gewünschten MOI entsprechende Anzahl von Bakterien enthält. Die Bakterien werden anschließend 10 min bei 1200 rpm auf die Gewebekulturzellen zentrifugiert. Nach 50 min Inkubation im Brutschrank werden die Zellen dreimal mit PBS (mit Ca²⁺/Mg²⁺) gewaschen und frisches Medium zugegeben, das Gentamycin in einer Endkonzentration von 50 µg/ml enthält. Dieser Zeitpunkt wird mit 0 h p.i. („post infection“) bezeichnet. Die infizierten Zellen werden nach einer Inkubationszeit von 4 h im Brutschrank für die Immunfluoreszenzfärbung fixiert (= 4 h p.i.).

20x PBS: 160 g NaCl, 4 g KCl, 23 g Na₂HPO₄, 4 g KH₂PO₄ auf 1 l H₂O, autoklavieren.

20x Ca²⁺/Mg²⁺: 2 g MgCl₂ x 6 H₂O, 2 g CaCl₂ x 6 H₂O auf 1 l H₂O, autoklavieren.

4.5.2 Immunfluoreszenzfärbung mit dem anti-LaXp180-Serum

Die Immunfluoreszenzfärbungen werden modifiziert nach Mounier *et al.*, 1990, durchgeführt. Für Färbungen mit dem anti-LaXp180-Serum werden die Deckgläschen mit den infizierten Gewebekulturzellen noch in der 12-Napf-Platte zweimal mit PBS und einmal mit PHEM-Puffer (4 °C) vorsichtig gewaschen und genau 1 min mit 1 ml PHEM, 0,5 % Triton-X-100 (4 °C) bedeckt. Danach werden die Deckgläschen 3 min in -20 °C kaltem Aceton in einer neuen, vorgekühlten Glasschale inkubiert und auf einem Stück Filterpapier am Platz getrocknet. Das präadsorbierte anti-LaXp180-Serum wird 1:40 in PBS, 2% BSA (Rinderserumalbumin) verdünnt und ein Tropfen von 30 μ l auf ein auf den Tisch geklebtes Stück Parafilm pipettiert. Das Deckgläschen wird mit dem Zellrasen nach unten luftblasenfrei auf den Tropfen gelegt und mindestens 40 min bei Raumtemperatur inkubiert. Für längere Inkubationszeiten sollte das Parafilmstück in eine verschließbare Dose geklebt und ein mit Wasser getränktes Papiertuch dazugelegt werden, um ein Austrocknen zu verhindern. Zum Waschen werden drei 50 ml-Röhrchen mit PBS gefüllt und die Deckgläschen mit einer Pinzette jeweils 10 s in jedem Röhrchen unter leichtem Schwenken gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wird überschüssiges PBS von der Unterseite und vom Rand des Deckgläschens mit einem Papiertuch abgewischt, um eine weitere Verdünnung des nächsten Antikörpers zu vermeiden. Mit der Oberseite nach unten wird das Deckgläschen auf einen 30 μ l-Tropfen des LRSC-konjugierten Ziege-anti-Kaninchen Sekundärantikörpers (Dianova) gelegt, der 1:40 in PBS, 2 % BSA verdünnt wurde. Wegen der hohen Lichtempfindlichkeit der Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörper sind die Präparate während der folgenden Inkubationen lichtundurchlässig abzudecken und bis zur Mikroskopie in einer lichtundurchlässigen Schachtel aufzubewahren. Nach mindestens 40 min Inkubation des Sekundärantikörpers werden die Deckgläschen dreimal gewaschen und für eine optionale Phalloidin-Färbung 40 min auf einen Tropfen 1:20 mit PBS verdünntes FITC-Phalloidin (Sigma) gelegt. Vorsicht: Phalloidin ist extrem toxisch! Nach dreimaligem Waschen und Abtupfen der PBS-Reste wird das Deckgläschen mit der Oberseite nach unten luftblasenfrei auf einen 4 μ l-Tropfen PBS, 50 % Glycerin auf einem Objektträger gelegt. Die überschüssigen PBS-Glycerinreste werden mit einem Papiertuch abgewischt und das Deckgläschen am Rand luftdicht mit Nagellack versiegelt.

PHEM-Puffer: 60 mM PIPES; 23 mM HEPES; 10 mM EGTA; 1 mM MgCl₂ x 6 H₂O. pH=6,9 mit NaOH einstellen.

4.5.3 Immunfluoreszenzfärbung mit dem anti-Stathmin-Serum

Die anti-Stathmin-Färbung erfolgt nach Gavet *et al.*, 1998. Die Deckgläschen mit den Gewebekulturzellen werden in der 12-Napf-Platte zweimal vorsichtig mit PBS gewaschen, 6 min in -20 °C kaltem Methanol in einer neuen, vorgekühlten Glasschale fixiert und zum Absättigen unspezifischer Bindungsstellen gleich ohne Trocknen mit der Oberseite nach unten 1 h auf einen 30 μ l-Tropfen PBS, 3% BSA gelegt. Zweckmäßigerweise klebt man hierzu ein Stück Parafilm in eine verschließbare Dose und legt ein mit Wasser getränktes Papiertuch dazu, um ein Austrocknen zu verhindern. Zum Waschen werden drei 50 ml-Röhrchen mit PBS gefüllt und die Deckgläschen mit einer Pinzette jeweils 10 s in jedem Röhrchen unter leichtem Schwenken gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wird überschüssiges PBS von der Unterseite und vom Rand des Deckgläschens mit einem Papiertuch aufgesaugt. Das Deckgläschen wird mit der Oberseite nach unten auf einen 30 μ l-Tropfen des ersten Antikörpers gelegt und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Für die anti-Stathmin-Färbung wird das polyklonale anti-Peptid-C-Serum (A. Sobel, INSERM, Paris) in einer Verdünnung von 1:200 in PBS, 2 % BSA verwendet. Das anti-Peptid-C-Serum wurde gegen ein synthetisches Peptid aus den 16 C-terminalen Aminosäuren von Stathmin in einem Kaninchen synthetisiert (Koppel *et al.*, 1990). Nach dreimaligem Waschen wird das

Deckgläschen 2 h auf einem 30 μ l-Tropfen des LRSC-konjugierten Ziege-anti-Kaninchen Sekundärantikörpers (Dianova) bei Raumtemperatur inkubiert, dreimal gewaschen, luftblasenfrei auf einen 4 μ l-Tropfen PBS, 50 % Glycerin auf einem Objektträger gelegt und nach Abwischen der überschüssigen PBS-Glycerinreste luftdicht mit Nagellack versiegelt.

4.6 Transfektion von Cos-1-Zellen

Die Transfektion von Cos-1-Zellen wurde mit Lipofectamine PlusTM (Gibco) nach den Herstellerangaben für Cos-7-Zellen durchgeführt. Für anschließende Immunfluoreszenzanalysen werden mittags am Tag vor der Transfektion $1,5 \cdot 10^5$ Cos-1-Fibroblasten pro Napf einer 12-Napf-Platte in 3 ml DMEM (Gibco) ausgesät, das 10% FCS und nicht-essentielle Aminosäuren enthält, und im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Alle Mengenangaben beziehen sich auf einen Napf einer 12-Napf-Platte. Die Transfektion erfolgt nach 24 h, wobei der Zellrasen dann zu 70-80% den Boden bedecken sollte. Für die Transfektion werden die Lösungen A und B hergestellt: Für die Lösung A werden 0,8 μ g Plasmid-DNA und 7 μ l PLUS-Reagens zu 150 μ l Serum-freiem DMEM (mit nicht-essentiellen Aminosäuren) zugegeben, kräftig durchmischt und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Lösung B besteht aus 3 μ l Lipofectamine-Reagens in 150 μ l DMEM. Lösung A und B werden vereinigt und durchmischt. Nach 15 min Inkubation werden 300 μ l Serum-freies DMEM zugegeben. Die zu transfizierenden Zellen werden zweimal mit Serum-freiem DMEM gewaschen, mit der Mischung aus Lösung A und B überschichtet und im Brutschrank inkubiert. Nach 4 h werden 600 μ l DMEM mit 20% FCS zugegeben, ohne vorher die Transfektionslösung zu entfernen.

Am Morgen des nächsten Tages werden die Zellen dreimal mit PBS (mit Ca²⁺/Mg²⁺) gewaschen, frisches RPMI mit 10% FCS zugegeben und im Brutschrank inkubiert. Am Nachmittag werden die transfizierten Zellen fixiert und für Immunfluoreszenzanalysen gefärbt. Sollen die transfizierten Zellen infiziert werden, wird das frische RPMI mit 10% FCS gleich mit der entsprechenden Menge Bakterien versetzt. Das weitere Vorgehen für die Infektion erfolgt nach [4.5.1](#).

5 Material

5.1 Plasmide

Plasmid	Eigenschaften	Herkunft
pERL3-79-1:	<i>prfA</i> -Gen von <i>L. monocytogenes</i> NCTC 7973, Em^r	Bohne, 1995
pQE30:	erzeugt N-terminalen His ₆ -Tag, Amp^r	Qiagen
pQHS30:	C-Terminus (467 AS) des humanen LaXp180 mit N-terminalen His ₆ -Tag in pQE30, Amp^r	J. Laubinger, Inst. für Physiologie, Universität Mainz
pCYB4:	erzeugt Intein-CBD („Chitin Binding Domain“)-Fusion, Amp^r	New England Biolabs
pCYB-ActA:	ActA-Intein-CBD-Fusionsprotein, Amp^r	diese Arbeit
pCI:	Vektor zur transienten Transfektion, Amp^r	Promega
pCIV:	cDNA des vollständigen LaXp180 in pCI. Klonierung über <i>Eco RI</i> und <i>Not I</i> , Amp^r	J. Laubinger, Inst. für Physiologie, Universität Mainz
pCIC:	cDNA des C-Terminus von LaXp180 (AS 1036-1591) in pCI. Klonierung über <i>Acc I</i> und <i>Not I</i> , Amp^r	J. Laubinger, Inst. für Physiologie, Universität Mainz
pPC86:	GAL4-TA Fusionsvektor für das „Yeast Two-Hybrid“ System, TRP1, Amp^r	Chevray und Nathans, 1992
pPC97:	GAL4-DB Fusionsvektor für das „Yeast Two-Hybrid“ System, LEU2, Amp^r	D. Nathans, Howard Hughes Medical Institute, Baltimore
pPC97-ActA:	GAL4-DB-Fusion mit ActA-Fragment (AS 30-613)	diese Arbeit
pPC97-NActA:	GAL4-DB-Fusion mit ActA-Fragment (AS 30-263)	diese Arbeit
pPC97-PActA:	GAL4-DB-Fusion mit ActA-Fragment (AS 264-429)	diese Arbeit
pPC97-CActA:	GAL4-DB-Fusion mit ActA-Fragment (AS 423-613)	diese Arbeit
pPC97-NPActA:	GAL4-DB-Fusion mit ActA-Fragment (AS 30-429)	diese Arbeit
pPC97-PCActA:	GAL4-DB-Fusion mit ActA-Fragment (AS 264-613)	diese Arbeit
pPC97- Δ PactA:	GAL4-DB-Fusion mit ActA-Fragment (AS 30-190 und 470-613)	diese Arbeit
pPC67:	embryonale murine cDNA-Genbank in pPC86	Chevray und Nathans, 1992

5.2 Stämme

Stamm	Eigenschaften	Herkunft
<i>L. monocytogenes</i> Sv 1/2a EGD:	Wildtyp	S. H. E. Kaufmann
<i>L. monocytogenes</i> A49:	Deletion des zentralen prolinreichen Bereichs von ActA (vgl. Abb. 7)	Hauf <i>et al.</i> , 1997
<i>L. monocytogenes</i> Δ 2:	Deletion der Gene <i>actA</i> , <i>mpl</i> und <i>plcB</i>	Hauf <i>et al.</i> , 1997
<i>S. cerevisiae</i> HF7c:	Genotyp: <i>MATa</i> , <i>ura3-52</i> , <i>his3-200</i> , <i>lys2-801</i> , <i>ade2-101</i> , <i>trp1-901</i> , <i>leu2-3</i> , 112, <i>gal4-542</i> , <i>gal80-538</i> , <i>LYS2::GAL1-his3</i> , <i>URA3::(GAL4 17-mers)₃-CYC1-lacZ</i> . Der Stamm HF7c enthält die GAL4-abhängigen Reportergene <i>his3</i> und <i>lacZ</i> und als Auxotrophiemarker <i>trp1</i> und <i>leu2</i> .	Clontech

<i>S. cerevisiae</i> SFY526:	Genotyp: <i>MATa</i> , <i>ura3-52</i> , <i>his3-200</i> , <i>lys2-801</i> , <i>ade2-101</i> , <i>trp1-901</i> , <i>leu2-3</i> , 112, <i>can^r</i> , <i>gal4-542</i> , <i>gal80-538</i> , <i>URA3::GAL1-lacZ</i> . Der Stamm SFY526 enthält als Reporter gen <i>lacZ</i> und als Auxotrophiemarker <i>trp1</i> und <i>leu2</i> .	Clontech (Bartel <i>et al.</i> , 1993)
<i>E. coli</i> DH5 α :	Genotyp: <i>supE44</i> Δ <i>lacU169</i> (ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15) <i>hsdR17</i> <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>gyrA96</i> <i>thi-1</i> <i>relA1</i> . Rekombinationsnegativer Suppressor Stamm zur Amplifikation von Plasmiden und Cosmiden. Die Mutation ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 erlaubt α -Komplementation mit dem N-Terminus der in pUC-Vektoren kodierten β -Galaktosidase.	BRL (Hanahan, 1983)
<i>E. coli</i> M15 [pREP4]:	Genotyp: <i>lac⁻</i> , <i>ara⁻</i> , <i>gal⁻</i> , <i>mtl⁻</i> , <i>F⁻</i> , <i>recA⁺</i> , <i>wvr⁺</i> , <i>lon⁺</i> , [Km ^r], Nal ^s , Str ^s , Rif ^s . Stamm zur Überexpression von His ₆ -Tag Proteinen. Das „low-copy“-Plasmid pREP4 exprimiert konstitutiv den <i>lac</i> -Repressor.	Qiagen

5.3 Zell-Linien

Zell-Linie	Eigenschaften
Cos-1 ATCC: CRL-1650	Morphologie: Fibroblasten-ähnlich Herkunft: Afrikanische Grüne Meerkatze, Niere, SV-40 transformiert
HeLa ATCC: CCL-2	Morphologie: epithelzellähnlich Herkunft: Mensch, Gebärmutterhalskarzinom
Caco-2 ATCC: HTB-37	Morphologie: epithelzellähnlich Herkunft: Mensch, Dickdarm, Adenokarzinom
P388D ₁ ATCC: TIB-63	Morphologie: Makrophagen-ähnlich Herkunft: Maus, Makrophagen-Vorläufer
HBMEC	Mikrovaskuläre Gehirndothelzellen Herkunft: Mensch; (K. S. Kim, Children's Hospital, Los Angeles)
BMM Φ	Primäre Knochenmarksmakrophagen Herkunft: Maus, Oberschenkelknochen

Kulturbedingungen: Cos-1-, HeLa-, Caco-2- und P388D₁-Zellen werden nach Standardprotokollen aus Hay *et al.*, 1994, kultiviert. Die Kultur von HBMEC erfolgt nach Stins *et al.*, 1994. Primäre Knochenmarksmakrophagen BMM Φ wurden nach Kuhn und Goebel, 1994, isoliert und kultiviert.

Literatur

- ADAM, T., ARPIN, M., PREVOST, M. C., GOUNON, P., AND SANSONETTI, P. J. 1995. Cytoskeletal rearrangements and the functional role of T-plastin during entry of *Shigella flexneri* into HeLa cells. *J Cell Biol*, **129**(2): 367–81.
- ALI, N., AND SIDDIQUI, A. 1997. The La antigen binds 5' noncoding region of the Hepatitis C virus RNA in the context of the initiator AUG codon and stimulates internal ribosome entry site-mediated translation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**(6): 2249–54.
- ALVAREZ-DOMINGUEZ, C., VÁZQUES-BOLAND, J. A., CARRASCO-MARIN, E., LÓPEZ-MATO, P., AND LEYVA-COBIÁN, F. 1997. Host cell heparan sulfate proteoglycans mediate attachment and entry of *Listeria monocytogenes*, and the listerial surface protein ActA is involved in heparan sulfate receptor recognition. *Infect Immun*, **65**(1): 78–88.
- BACHMANN, C., FISCHER, L., WALTER, U., AND REINHARD, M. 1999. The EVH2 Domain of the Vasodilator-stimulated Phosphoprotein Mediates Tetramerisation, F-actin Binding, and Actin Bundle Formation. *J Biol Chem*, **274**(33): 23549–57.
- BACHMANN, M., MAYET, W. J., SCHRÖDER, H. C., PFEIFER, K., MEYER ZUM BUSCHENFELDE, K. H., AND MÜLLER, W. E. 1986a. Association of La and Ro antigens with intracellular structures in HEP-2 carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **83**(20): 7770–4.
- BACHMANN, M., SCHRÖDER, H. C., WAGNER, K. G., MAYET, W. J., PFEIFER, K., AND MÜLLER, W. E. 1986b. Purification and characterization of the Ro and La antigens. Modulation of their binding affinities to poly(U) by phosphorylation and the presence of ATP. *Biol Chem Hoppe Seyler*, **367**(8): 671–80.
- BACHMANN, M., PFEIFER, K., SCHRÖDER, H. C., AND MÜLLER, W. E. 1990a. Characterization of the autoantigen La as a nucleic acid-dependent ATPase/dATPase with melting properties. *Cell*, **60**(1): 85–93.
- BACHMANN, M., CHANG, S., SLOR, H., KUKULIES, J., AND MÜLLER, W. E. 1990b. Shuttling of the autoantigen La between nucleus and cell surface after uv irradiation of human keratinocytes. *Exp Cell Res*, **191**(2): 171–80.
- BACHMANN, M., ZAUBITZER, T., AND MÜLLER, W. E. 1992a. The autoantigen La/SSB: detection on and uptake by mitotic cells. *Exp Cell Res*, **201**(2): 387–98.
- BACHMANN, M., ALTHOFF, H., TRÖSTER, H., SELENKA, C., FALKE, D., AND MÜLLER, W. E. 1992b. Translocation of the nuclear autoantigen La to the cell surface of Herpes simplex virus type 1 infected cells. *Autoimmunity*, **12**(1): 37–45.
- BACHMANN, M., DEISTER, H., PAUTZ, A., LAUBINGER, J., SCHMITZ, M., FALKE, D., PODLECH, J., AND GROLZ, D. 1998. The human autoantigen La/SS-B accelerates Herpes simplex virus type 1 replication in transfected mouse 3T3 cells. *Clin Exp Immunol*, **112**(3): 482–9.
- BARTEL, P., CHIEN, C. T., STERNGLANZ, R., AND FIELDS, S. 1993. Elimination of false positives that arise in using the two-hybrid system. *Biotechniques*, **14**(6): 920–4.
- BELMONT, L. D., AND MITCHISON, T. J. 1996. Identification of a protein that interacts with tubulin dimers and increases the catastrophe rate of microtubules. *Cell*, **84**(4): 623–31.
- BERETTA, L., DOBRANSKY, T., AND SOBEL, A. 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**(27): 20076–84.
- BERETTA, L., DUBOIS, M. F., SOBEL, A., AND BENSUADE, O. 1995. Stathmin is a major substrate for mitogen-activated protein kinase during heat shock and chemical stress in HeLa cells. *Eur J Biochem*, **227**(1-2): 388–95.
- BERNARDINI, M. L., MOUNIER, J., D'HAUTEVILLE, H., COQUIS-RONDON, M., AND SANSONETTI, P. J. 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 U S A*, **86**(10): 3867–71.

- BEST, A., AHMED, S., KOZMA, R., AND LIM, L. 1996. The Ras-related GTPase Rac1 binds tubulin. *J Biol Chem*, **271**(7): 3756–62.
- BOHNE, J., KESTLER, H., UEBELE, C., SOKOLOVIC, Z., AND GOEBEL, W. 1996. Differential regulation of the virulence genes of *Listeria monocytogenes* by the transcriptional activator PrfA. *Mol Microbiol*, **20**(6): 1189–98.
- BOHNE, JUTTA. 1995. *Regulation von Virulenzgenen in Listeria monocytogenes durch den Transkriptionsfaktor PrfA*. Doktorarbeit, Bayerische Julius-Maximilians-Universität, Würzburg.
- BRUNDAGE, R. A., SMITH, G. A., CAMILLI, A., THERIOT, J. A., AND PORTNOY, D. A. 1993. Expression and phosphorylation of the *Listeria monocytogenes* ActA protein in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**(24): 11890–4.
- BUBERT, A., RIEBE, J., SCHNITZLER, N., SCHÖNBERG, A., GOEBEL, W., AND SCHUBERT, P. 1997. Isolation of catalase-negative *Listeria monocytogenes* strains from listeriosis patients and their rapid identification by anti-p60 antibodies and/or PCR. *J Clin Microbiol*, **35**(1): 179–83.
- BUCHWALOW, I. B., EMOTO, M., BRICH, M., AND KAUFMANN, S. H. 1997. Involvement of tubulin and inhibitory G proteins in the interaction of *Listeria monocytogenes* with mouse hepatocytes. *Infect Immun*, **65**(3): 1095–7.
- CAMERON, L. A., FOOTER, M. J., VAN OUDENAARDEN, A., AND THERIOT, J. A. 1999. Motility of ActA protein-coated microspheres driven by actin polymerization. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**: 4908–4913.
- CAMILLI, A., GOLDFINE, H., AND PORTNOY, D. A. 1991. *Listeria monocytogenes* mutants lacking phosphatidylinositol-specific phospholipase C are avirulent. *J Exp Med*, **173**(3): 751–4.
- CAMILLI, A., LG, L. G. TILNEY, AND PORTNOY, D. A. 1993. Dual roles of plcA in *Listeria monocytogenes* pathogenesis. *Mol Microbiol*, **8**(1): 143–57.
- CARLIER, M. F. 1998. Control of actin dynamics. *Curr Opin Cell Biol*, **10**(1): 45–51.
- CARLIER, M. F., LAURENT, V., SANTOLINI, J., MELKI, R., DIDRY, D., XIA, G. X., HONG, Y., CHUA, N. H., AND PANTALONI, D. 1997. Actin depolymerizing factor (ADF/cofilin) enhances the rate of filament turnover: implication in actin-based motility. *J Cell Biol*, **136**(6): 1307–22.
- CASSIMERIS, L. 1999. Accessory protein regulation of microtubule dynamics throughout the cell cycle. *Curr Opin Cell Biol*, **11**(1): 134–41.
- CHAKRABORTY, T., LEIMEISTER-WÄCHTER, M., DOMANN, E., HARTL, M., GOEBEL, W., NICHTERLEIN, T., AND NOTERMANS, S. 1992. Coordinate regulation of virulence genes in *Listeria monocytogenes* requires the product of the *prfA* gene. *J Bacteriol*, **174**(2): 568–74.
- CHAKRABORTY, T., EBEL, F., DOMANN, E., NIEBUHR, K., GERSTEL, B., PISTOR, S., TEMM-GROVE, C. J., JOCKUSCH, B. M., REINHARD, M., AND WALTER, U. 1995. A focal adhesion factor directly linking intracellularly motile *Listeria monocytogenes* and *Listeria ivanovii* to the actin-based cytoskeleton of mammalian cells. *EMBO J*, **14**(7): 1314–21.
- CHAN, E. K., SULLIVAN, K. F., FOX, R. I., AND TAN, E. M. 1989. Sjögren's syndrome nuclear antigen B (La): cDNA cloning, structural domains, and autoepitopes. *J Autoimmun*, **2**(4): 321–7.
- CHEVRAY, P. M., AND NATHANS, D. 1992. Protein interaction cloning in yeast: identification of mammalian proteins that react with the leucine zipper of Jun. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**(13): 5789–93.
- CHOMCZYNSKI, P., AND SACCHI, N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987, **162**(1): 156–9.
- CHRZANOWSKA-WODNICKA, M., AND BURRIDGE, K. 1996. Rho-stimulated contractility drives the formation of stress fibers and focal adhesions. *J Cell Biol*, **133**(6): 1403–15.
- CICCHETTI, G., MAURER, P., WAGENER, P., AND KOCKS, C. 1999. Actin and phosphoinositide binding by the ActA protein of the bacterial pathogen *Listeria monocytogenes*. *J Biol Chem*, **274**(47): 33616–26.
- CORNELIS, G. R., AND WOLF-WATZ, H. 1997. The *Yersinia* Yop virulon: a bacterial system for subverting eukaryotic cells. *Mol Microbiol*, **23**(5): 861–7.
- COSSART, P., AND KOCKS, C. 1994. The actin-based motility of the facultative intracellular pathogen *Listeria monocytogenes*. *Mol Microbiol*, **13**(3): 395–402.
- COSSART, P., AND LECUIT, M. 1998. Interactions of *Listeria monocytogenes* with mammalian cells during entry and actin-based movement: bacterial factors, cellular ligands and signaling. *EMBO J*, **17**(14): 3797–806.
- COSSART, P., VICENTE, M. F., MENGAUD, J., BAQUERO, F., PEREZ-DIAZ, J. C., AND BERCHE, P. 1989. Listeriolysin O is essential for virulence of *Listeria monocytogenes*: direct evidence obtained by gene complementation. *Infect Immun*, **57**(11): 3629–36.

- CRAIG, A. W., SVITKIN, Y. V., LEE, H. S., BELSHAM, G. J., AND SONENBERG, N. 1997. The La autoantigen contains a dimerization domain that is essential for enhancing translation. *Mol Cell Biol*, **17**(1): 163–9.
- CUDMORE, S., COSSART, P., GRIFFITHS, G., AND WAY, M. 1995. Actin-based motility of Vaccinia virus. *Nature*, **378**(6557): 636–8.
- CURMI, P. A., MAUCUER, A., ASSELIN, S., LECOURTOIS, M., CHAFFOTTE, A., SCHMITTER, J. M., AND SOBEL, A. 1994. Molecular characterization of human stathmin expressed in *Escherichia coli*: site-directed mutagenesis of two phosphorylatable serines (Ser-25 and Ser-63). *Biochem J*, **300**(Pt 2): 331–8.
- CURMI, P. A., ANDERSEN, S. S., LACHKAR, S., GAVET, O., KARSENTI, E., KNOSSOW, M., AND SOBEL, A. 1997. The stathmin/tubulin interaction *in vitro*. *J Biol Chem*, **272**(40): 25029–36.
- DABIRI, G. A., SANGER, J. M., PORTNOY, D. A., AND SOUTHWICK, F. S. 1990. *Listeria monocytogenes* moves rapidly through the host-cell cytoplasm by inducing directional actin assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **87**(16): 6068–72.
- DANOWSKI, B. A. 1989. Fibroblast contractility and actin organization are stimulated by microtubule inhibitors. *J Cell Sci*, **93**(Pt 2): 255–66.
- DESAI, A., AND MITCHISON, T. J. 1997. Microtubule polymerization dynamics. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **13**: 83–117.
- DI PAOLO, G., ANTONSSON, B., KASSEL, D., RIEDERER, B. M., AND GRENNINGLOH, G. 1997. Phosphorylation regulates the microtubule-destabilizing activity of stathmin and its interaction with tubulin. *FEBS Lett*, **416**(2): 149–52.
- DIDRY, D., CARLIER, M. F., AND PANTALONI, D. 1998. Synergy between actin depolymerizing factor/cofilin and profilin in increasing actin filament turnover. *J Biol Chem*, **273**(40): 25602–11.
- DOLD, F. G., SANGER, J. M., AND SANGER, J. W. 1994. Intact alpha-actinin molecules are needed for both the assembly of actin into the tails and the locomotion of *Listeria monocytogenes* inside infected cells. *Cell Motil Cytoskeleton*, **28**(2): 97–107.
- DOMANN, E., WEHLAND, J., ROHDE, M., PISTOR, S., HARTL, M., GOEBEL, W., LEIMEISTER-WÄCHTER, M., WUENSCHER, M., AND CHAKRABORTY, T. 1992. A novel bacterial virulence gene in *Listeria monocytogenes* required for host cell microfilament interaction with homology to the proline-rich region of vinculin. *EMBO J*, **11**(5): 1981–90.
- DOYE, V., SOUBRIER, F., BAUW, G., BOUTTERIN, M. C., BERETTA, L., KOPPEL, J., VANDEKERCKHOVE, J., AND SOBEL, A. 1989. A single cDNA encodes two isoforms of stathmin, a developmentally regulated neuron-enriched phosphoprotein. *J Biol Chem*, **264**(21): 12134–7.
- DRAMSI, S., DEHOUX, P., LEBRUN, M., GOOSSENS, P. L., AND COSSART, P. 1997. Identification of four new members of the internalin multigene family of *Listeria monocytogenes* EGD. *Infect Immun*, **65**(5): 1615–25.
- EGILE, C., LOISEL, T. P., LAURENT, V., LI, R., PANTALONI, D., SANSONETTI, P. J., AND CARLIER, M. F. 1999. Activation of the CDC42 effector N-WASP by the *Shigella flexneri* IcsA protein promotes actin nucleation by Arp2/3 complex and bacterial actin-based motility. *J Cell Biol*, **146**(6): 1319–32.
- ENGELBRECHT, F., SK, S. K. CHUN, OCHS, C., HESS, J., LOTTSPEICH, F., GOEBEL, W., AND SOKOLOVIC, Z. 1996. A new PrfA-regulated gene of *Listeria monocytogenes* encoding a small, secreted protein which belongs to the family of internalins. *Mol Microbiol* 1996, **21**(4): 823–37.
- ENOMOTO, T. 1996. Microtubule disruption induces the formation of actin stress fibers and focal adhesions in cultured cells: possible involvement of the rho signal cascade. *Cell Struct Funct*, **21**(5): 317–26.
- ESPRAFICO, E. M., COLING, D. E., TSAKRACLIDES, V., KROGH, K., WOLENSKI, J. S., KALINEC, G., AND KACHAR, B. 1998. Localization of myosin-V in the centrosome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**(15): 8636–41.
- FAN, H., SAKULICH, A. L., GOODIER, J. L., ZHANG, X., QIN, J., AND MARAIA, R. J. 1997. Phosphorylation of the human La antigen on serine 366 can regulate recycling of RNA polymerase III transcription complexes. *Cell*, **88**(5): 707–15.
- FIELDS, S., AND SONG, O. 1989. A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature*, **340**(6230): 245–6.
- FINLAY, B. B., RUSCHKOWSKI, S., AND DEDHAR, S. 1991. Cytoskeletal rearrangements accompanying *Salmonella* entry into epithelial cells. *J Cell Sci*, **99**(Pt 2): 283–96.
- FOISNER, R., AND WICHE, G. 1991. Intermediate filament-associated proteins. *Curr Opin Cell Biol*, **3**(1): 75–81.
- FRANCOEUR, A. M., AND MATHEWS, M. B. 1982. Interaction between VA RNA and the lupus antigen La: formation of a ribonucleoprotein particle *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **79**(22): 6772–6.

- FREVERT, U., SINNIS, P., CERAMI, C., SHREFFLER, W., TAKACS, B., AND NUSSENZWEIG, V. 1993. Malaria circumsporozoite protein binds to heparan sulfate proteoglycans associated with the surface membrane of hepatocytes. *J Exp Med*, **177**(5): 1287–98.
- FRIEDERICH, E., GOUIN, E., HELLIO, R., KOCKS, C., COSSART, P., AND LOUWARD, D. 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**(12): 2731–44.
- FUJII, T., HIROMORI, T., HAMAMOTO, M., AND SUZUKI, T. 1997. Interaction of chicken gizzard smooth muscle calponin with brain microtubules. *J Biochem (Tokyo)*, **122**(2): 344–51.
- GAVET, O., OZON, S., MANCEAU, V., LAWLER, S., CURMI, P., AND SOBEL, A. 1998. The stathmin phosphoprotein family: intracellular localization and effects on the microtubule network. *J Cell Sci*, **111**(Pt 22): 3333–46.
- GEDDE, M. M., HIGGINS, D. E., TILNEY, L. G., AND PORTNOY, D. A. 2000. Role of Listeriolysin O in Cell-to-Cell Spread of *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun*, **68**(2): 999–1003.
- GEOFFROY, C., RAVENEAU, J., BERETTI, J. L., LECROISEY, A., VÁZQUEZ-BOLAND, J. A., ALOUF, J. E., AND BERCHE, P. 1991. Purification and characterization of an extracellular 29-kilodalton phospholipase C from *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun*, **59**(7): 2382–8.
- GERTLER, F. B., COMER, A. R., JUANG, J. L., AHERN, S. M., CLARK, M. J., LIEBL, E. C., AND HOFFMANN, F. M. 1995. Enabled, a dosage-sensitive suppressor of mutations in the *Drosophila* Abl tyrosine kinase, encodes an Abl substrate with SH3 domain-binding properties. *Genes Dev*, **9**(5): 521–33.
- GERTLER, F. B., NIEBUHR, K., REINHARD, M., WEHLAND, J., AND SORIANO, P. 1996. Mena, a relative of VASP and *Drosophila* Enabled, is implicated in the control of microfilament dynamics. *Cell*, **87**(2): 227–39.
- GEUDER, KERSTIN. 1987. *Versuche zur Aufklärung der Regulation von Synthese und Transport des Hämolyins in Escherichia coli*. Doktorarbeit, Bayerische Julius-Maximilians Universität, Fakultät für Biologie, Würzburg.
- GILMORE, A. P., AND BURRIDGE, K. 1996. Regulation of vinculin binding to talin and actin by phosphatidylinositol-4-5-bisphosphate. *Nature*, **381**(6582): 531–5.
- GOLDFINE, H., AND KNOB, C. 1992. Purification and characterization of *Listeria monocytogenes* phosphatidylinositol-specific phospholipase C. *Infect Immun*, **60**(10): 4059–67.
- GOLDFINE, H., JOHNSTON, N. C., AND KNOB, C. 1993. Nonspecific phospholipase C of *Listeria monocytogenes*: activity on phospholipids in Triton X-100 mixed micelles and in biological membranes. *J Bacteriol*, **175**(14): 4298–306.
- GOLSTEYN, R. M., BECKERLE, M. C., KOAY, T., AND FRIEDERICH, E. 1997. Structural and functional similarities between the human cytoskeletal protein zyxin and the ActA protein of *Listeria monocytogenes*. *J Cell Sci*, **110**(Pt 16): 1893–906.
- GONZALEZ, M., CAMBIAZO, V., AND MACCIONI, R. B. 1998. The interaction of Mip-90 with microtubules and actin filaments in human fibroblasts. *Exp Cell Res*, **239**(2): 243–53.
- GOTTLIEB, E., AND STEITZ, J. A. 1989a. Function of the mammalian La protein: evidence for its action in transcription termination by RNA polymerase III. *EMBO J*, **8**(3): 851–61.
- GOTTLIEB, E., AND STEITZ, J. A. 1989b. The RNA binding protein La influences both the accuracy and the efficiency of RNA polymerase III transcription *in vitro*. *EMBO J*, **8**(3): 841–50.
- GREIFFENBERG, L., GOEBEL, W., KIM, K. S., WEIGLEIN, I., BUBERT, A., ENGELBRECHT, F., STINS, M., AND KUHN, M. 1998. Interaction of *Listeria monocytogenes* with human brain microvascular endothelial cells: InlB-dependent invasion, long-term intracellular growth, and spread from macrophages to endothelial cells. *Infect Immun*, **66**(11): 5260–7.
- GRIMM, C., LUND, E., AND DAHLBERG, J. E. 1997. *In vivo* selection of RNAs that localize in the nucleus. *EMBO J*, **16**(4): 793–806.
- GUZMAN, C. A., ROHDE, M., CHAKRABORTY, T., DOMANN, E., HUDEL, M., WEHLAND, J., AND TIMMIS, K. N. 1995. Interaction of *Listeria monocytogenes* with mouse dendritic cells. *Infect Immun*, **63**(9): 3665–73.
- HALL, A. 1998. Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science*, **279**(5350): 509–14.
- HANAHAN, D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol*, **166**(4): 557–80.
- HANASH, S. M., STRAHLER, J. R., KUICK, R., CHU, E. H., AND NICHOLS, D. 1988. Identification of a polypeptide associated with the malignant phenotype in acute leukemia. *J Biol Chem*, **263**(26): 12813–5.

- HAUF, N., GOEBEL, W., FIEDLER, F., SOKOLOVIC, Z., AND KUHN, M. 1997. *Listeria monocytogenes* infection of P388_{D1} 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 U S A*, **94**(17): 9394–9.
- HAY, R., CAPUTO, J., CHEN, T. R., MACY, M., MCCLINTOCK, P., AND REID, Y. (eds) . 1994. *ATCC Cell Lines and Hybridomas*. 8 edn. Rockville, Maryland: American Type Culture Collection.
- HEINZEN, R. A., HAYES, S. F., PEACOCK, M. G., AND HACKSTADT, T. 1993. Directional actin polymerization associated with spotted fever group *Rickettsia* infection of Vero cells. *Infect Immun*, **61**(5): 1926–35.
- HEISE, T., GUIDOTTI, L. G., AND CHISARI, F. V. 1999. La autoantigen specifically recognizes a predicted stem-loop in Hepatitis B virus RNA. *J Virol*, **73**(7): 5767–76.
- HENDRICK, J. P., WOLIN, S. L., RINKE, J., LERNER, M. R., AND STEITZ, J. A. 1981. Ro small cytoplasmic ribonucleoproteins are a subclass of La ribonucleoproteins: further characterization of the Ro and La small ribonucleoproteins from uninfected mammalian cells. *Mol Cell Biol*, **1**(12): 1138–49.
- HÜHN, P., PRUIJN, G. J., VAN VENROOIJ, W. J., AND BACHMANN, M. 1997. Characterization of the autoantigen La (SS-B) as a dsRNA unwinding enzyme. *Nucleic Acids Res*, **25**(2): 410–6.
- HICKS, G. R., AND RAIKHEL, N. V. 1995. Protein import into the nucleus: an integrated view. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **11**: 155–88.
- HORWITZ, S. B., SHEN, H. J., HE, L., DITTMAR, P., NEEF, R., CHEN, J., AND SCHUBART, U. K. 1997. The microtubule-destabilizing activity of metablastin (p19) is controlled by phosphorylation. *J Biol Chem*, **272**(13): 8129–32.
- HOWELL, B., LARSSON, N., GULLBERG, M., AND CASSIMERIS, L. 1999. Dissociation of the tubulin-sequestering and microtubule catastrophe-promoting activities of oncoprotein 18/stathmin. *Mol Biol Cell*, **10**(1): 105–18.
- ISBERG, R. R., AND LEONG, J. M. 1990. Multiple β_1 chain integrins are receptors for invasins, a protein that promotes bacterial penetration into mammalian cells. *Cell*, **60**(5): 861–71.
- ISBERG, R. R., AND VAN NHIEU, G. T. 1994. Two mammalian cell internalization strategies used by pathogenic bacteria. *Annu Rev Genet*, **28**: 395–422.
- JEFFERIES, H. B., FUMAGALLI, S., DENNIS, P. B., REINHARD, C., PEARSON, R. B., AND THOMAS, G. 1997. Rapamycin suppresses 5' TOP mRNA translation through inhibition of p70s6k. *EMBO J*, **16**(12): 3693–704.
- JOURDAIN, L., CURMI, P., SOBEL, A., PANTALONI, D., AND CARLIER, M. F. 1997. Stathmin: a tubulin-sequestering protein which forms a ternary T2S complex with two tubulin molecules. *Biochemistry*, **36**(36): 10817–21.
- KALMES, A., HAGEMANN, C., WEBER, C. K., WIXLER, L., SCHUSTER, T., AND RAPP, U. R. 1998. Interaction between the protein kinase B-Raf and the α -subunit of the 11S proteasome regulator. *Cancer Res*, **58**(14): 2986–90.
- KARUNASAGAR, I., KROHNE, G., AND GOEBEL, W. 1993. *Listeria ivanovii* is capable of cell-to-cell spread involving actin polymerization. *Infect Immun*, **61**(1): 162–9.
- KELLEY, C. A., SELLERS, J. R., GARD, D. L., BUI, D., ADELSTEIN, R. S., AND BAINES, I. C. 1996. *Xenopus* nonmuscle myosin heavy chain isoforms have different subcellular localizations and enzymatic activities. *J Cell Biol*, **134**(3): 675–87.
- KOCKS, C., GOUIN, E., TABOURET, M., BERCHE, P., OHAYON, H., AND COSSART, P. 1992. *L. monocytogenes*-induced actin assembly requires the actA gene product, a surface protein. *Cell*, **68**(3): 521–31.
- KOCKS, C., HELLIO, R., GOUNON, P., OHAYON, H., AND COSSART, P. 1993. Polarized distribution of *Listeria monocytogenes* surface protein ActA at the site of directional actin assembly. *J Cell Sci*, **105**(Pt 3): 699–710.
- KOCKS, C., MARCHAND, J. B., GOUIN, E., D'HAUTEVILLE, H., SANSONETTI, P. J., CARLIER, M. F., AND COSSART, P. 1995. The unrelated surface proteins ActA of *Listeria monocytogenes* and IcsA of *Shigella flexneri* are sufficient to confer actin-based motility on *Listeria innocua* and *Escherichia coli* respectively. *Mol Microbiol*, **18**(3): 413–23.
- KOHSAKA, H., YAMAMOTO, K., FUJII, H., MIURA, H., MIYASAKA, N., NISHIOKA, K., AND MIYAMOTO, T. 1990. Fine epitope mapping of the human SS-B/La protein. Identification of a distinct autoepitope homologous to a viral gag polyprotein. *J Clin Invest*, **85**(5): 1566–74.
- KOLCH, W., HEIDECCKER, G., LLOYD, P., AND RAPP, U. R. 1991. Raf-1 protein kinase is required for growth of induced NIH/3T3 cells. *Nature*, **349**(6308): 426–8.

- KOPPEL, J., BOUTTERIN, M.-C., DOYE, V., PEYRO-SAINT-PAUL, H., AND SOBEL, A. 1990. Developmental Tissue Expression and Phylogenetic Conservation of Stathmin, a Phosphoprotein Associated with Cell Regulations. *J Biol Chem*, **265**(7): 3703–7.
- KREFT, J., DUMBSKY, M., AND THEISS, S. 1995. The actin-polymerization protein from *Listeria ivanovii* is a large repeat protein which shows only limited amino acid sequence homology to ActA from *Listeria monocytogenes*. *FEMS Microbiol Lett*, **126**(2): 113–21.
- KREMERSKOTHEN, J., NETTERMANN, M., OP DE BEKKE, A., BACHMANN, M., AND BROSIUS, J. 1998. Identification of human autoantigen La/SS-B as BC1/BC200 RNA-binding protein. *DNA Cell Biol*, **17**(9): 751–9.
- KUHN, M. 1998. The microtubule depolymerizing drugs nocodazole and colchicine inhibit the uptake of *Listeria monocytogenes* by P388D₁ macrophages. *FEMS Microbiol Lett*, **160**(1): 87–90.
- KUHN, M., AND GOEBEL, W. 1994. Induction of cytokines in phagocytic mammalian cells infected with virulent and avirulent *Listeria* strains. *Infect Immun*, **62**(2): 348–56.
- KURILLA, M. G., CABRADILLA, C. D., HOLLOWAY, B. P., AND KEENE, J. D. 1984. Nucleotide sequence and host La protein interactions of Rabies virus leader RNA. *J Virol*, **50**(3): 773–8.
- LARSSON, N., MARKLUND, U., MELANDER GRADIN, H., BRATTSAND, G., AND GULLBERG, M. 1997. Control of microtubule dynamics by oncoprotein 18: dissection of the regulatory role of multisite phosphorylation during mitosis. *Mol Cell Biol*, **17**(9): 5530–9.
- LARSSON, N., SEGERMAN, B., HOWELL, B., FRIDELL, K., CASSIMERIS, L., AND GULLBERG, M. 1999. Op18/stathmin mediates multiple region-specific tubulin and microtubule-regulating activities. *J Cell Biol*, **146**(6): 1289–302.
- LASA, I., DAVID, V., GOUIN, E., MARCHAND, J. B., AND COSSART, P. 1995. The amino-terminal part of ActA is critical for the actin-based motility of *Listeria monocytogenes*; the central proline-rich region acts as a stimulator. *Mol Microbiol*, **18**(3): 425–36.
- LASA, I., GOUIN, E., GOETHALS, M., VANCOMPENOLLE, K., DAVID, V., VANDEKERCKHOVE, J., AND COSSART, P. 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**(7): 1531–40.
- LASA, I., DEHOUX, P., AND COSSART, P. 1998. Actin polymerization and bacterial movement. *Biochim Biophys Acta*, **1402**(3): 217–28.
- LAURENT, V., LOISEL, T. P., HARBECK, B., WEHMAN, A., GROBE, L., JOCKUSCH, B. M., WEHLAND, J., GERTLER, F. B., AND CARLIER, M. F. 1999. Role of proteins of the Ena/VASP family in actin-based motility of *Listeria monocytogenes*. *J Cell Biol*, **144**(6): 1245–58.
- LE GOUVELLO, S., MANCEAU, V., AND SOBEL, A. 1998. Serine 16 of stathmin as a cytosolic target for Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II after CD2 triggering of human T lymphocytes. *J Immunol*, **161**(3): 1113–22.
- LECUIT, M., DRAMSI, S., GOTTARDI, C., FEDOR-CHAIKEN, M., GUMBINER, B., AND COSSART, P. 1999. A single amino acid in E-Cadherin responsible for host specificity towards the human pathogen *Listeria monocytogenes*. *EMBO J*, **18**(14): 3956–63.
- LEIMEISTER-WÄCHTER, M., HAFNER, C., DOMANN, E., GOEBEL, W., AND CHAKRABORTY, T. 1990. Identification of a gene that positively regulates expression of listeriolysin, the major virulence factor of *Listeria monocytogenes*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **87**(21): 8336–40.
- LEIMEISTER-WÄCHTER, M., DOMANN, E., AND CHAKRABORTY, T. 1991. Detection of a gene encoding a phosphatidylinositol-specific phospholipase C that is co-ordinately expressed with listeriolysin in *Listeria monocytogenes*. *Mol Microbiol*, **5**(2): 361–6.
- LI, L., AND COHEN, S. N. 1996. Tsg101: a novel tumor susceptibility gene isolated by controlled homozygous functional knockout of allelic loci in mammalian cells. *Cell*, **85**(3): 319–29.
- LIU, B. P., CHRZANOWSKA-WODNICKA, M., AND BURRIDGE, K. 1998. Microtubule depolymerization induces stress fibers, focal adhesions, and DNA synthesis via the GTP-binding protein Rho. *Cell Adhes Commun*, **5**(4): 249–55.
- LOISEL, T. P., BOUJEMAA, R., PANTALONI, D., AND CARLIER, M. F. 1999. Reconstitution of actin-based motility of *Listeria* and *Shigella* using pure proteins. *Nature*, **401**(6753): 613–6.
- LORBER, B. 1997. Listeriosis. *Clin Infect Dis*, **24**(1): 1–9; quiz 10–1.
- LOVRIĆ, J., DAMMEIER, S., KIESER, A., MISCHAK, H., AND KOLCH, W. 1998. Activated raf induces the hyperphosphorylation of stathmin and the reorganization of the microtubule network. *J Biol Chem*, **273**(35): 22848–55.
- LUO, X. N., MOOKERJEE, B., FERRARI, A., MISTRY, S., AND ATWEH, G. F. 1994. Regulation of phosphoprotein p18 in leukemic cells. Cell cycle regulated phosphorylation by p34^{cdc2} kinase. *J Biol Chem*, **269**(14): 10312–8.

- MA, L., CANTLEY, L. C., JANMEY, P. A., AND KIRSCHNER, M. W. 1998. Corequirement of specific phosphoinositides and small GTP-binding protein Cdc42 in inducing actin assembly in *Xenopus* egg extracts. *J Cell Biol*, **140**(5): 1125–36.
- MACHESKY, L. M., AND GOULD, K. L. 1999. The Arp2/3 complex: a multifunctional actin organizer. *Curr Opin Cell Biol*, **11**(1): 117–21.
- MADORE, S. J., WIEBEN, E. D., AND PEDERSON, T. 1984. Eukaryotic small ribonucleoproteins. Anti-La human autoantibodies react with U1 RNA-protein complexes. *J Biol Chem*, **259**(3): 1929–33.
- MARAIA, R. J. 1996. Transcription termination factor La is also an initiation factor for RNA polymerase III. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**(8): 3383–7.
- MARCHAND, J. B., MOREAU, P., PAOLETTI, A., COSSART, P., CARLIER, M. F., AND PANTALONI, D. 1995. Actin-based movement of *Listeria monocytogenes*: actin assembly results from the local maintenance of uncapped filament barbed ends at the bacterium surface. *J Cell Biol*, **130**(2): 331–43.
- MARKLUND, U., BRATTSAND, G., OSTERMAN, O., OHLSSON, P. I., AND GULLBERG, M. 1993a. Multiple signal transduction pathways induce phosphorylation of serines 16, 25, and 38 of oncoprotein 18 in T lymphocytes. *J Biol Chem*, **268**(34): 25671–80.
- MARKLUND, U., BRATTSAND, G., SHINGLER, V., AND GULLBERG, M. 1993b. Serine 25 of oncoprotein 18 is a major cytosolic target for the mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem*, **268**(20): 15039–47.
- MARKLUND, U., OSTERMAN, O., MELANDER, H., BERGH, A., AND GULLBERG, M. 1994a. The phenotype of a 'Cdc2 kinase target site-deficient' mutant of oncoprotein 18 reveals a role of this protein in cell cycle control. *J Biol Chem*, **269**(48): 30626–35.
- MARKLUND, U., LARSSON, N., BRATTSAND, G., OSTERMAN, O., CHATILA, T. A., AND GULLBERG, M. 1994b. Serine 16 of oncoprotein 18 is a major cytosolic target for the Ca^{2+} /calmodulin-dependent kinase-Gr. *Eur J Biochem*, **225**(1): 53–60.
- MARKLUND, U., LARSSON, N., MELANDER GRADIN, H., BRATTSAND, G., AND GULLBERG, M. 1996. Oncoprotein 18 is a phosphorylation-responsive regulator of microtubule dynamics. *EMBO J*, **15**(19): 5290–8.
- MARQUIS, H., GOLDFINE, H., AND PORTNOY, D. A. 1997. Proteolytic pathways of activation and degradation of a bacterial phospholipase C during intracellular infection by *Listeria monocytogenes*. *J Cell Biol*, **137**(6): 1381–92.
- MATTIOLI, M., AND REICHLIN, M. 1974. Heterogeneity of RNA protein antigens reactive with sera of patients with systemic lupus erythematosus. Description of a cytoplasmic nonribosomal antigen. *Arthritis Rheum*, **17**(4): 421–9.
- MAUCUER, A., DOYE, V., AND SOBEL, A. 1990. A single amino acid difference distinguishes the human and the rat sequences of stathmin, a ubiquitous intracellular phosphoprotein associated with cell regulations. *FEBS Lett*, **264**(2): 275–8.
- MAUCUER, A., CAMONIS, J. H., AND SOBEL, A. 1995. Stathmin interaction with a putative kinase and coiled-coil-forming protein domains. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**(8): 3100–4.
- MAUCUER, A., OZON, S., MANCEAU, V., GAVET, O., LAWLER, S., CURMI, P., AND SOBEL, A. 1997. KIS is a protein kinase with an RNA recognition motif. *J Biol Chem*, **272**(37): 23151–6.
- MAY, R. C., HALL, M. E., HIGGS, H. N., POLLARD, T. D., CHAKRABORTY, T., WEHLAND, J., MACHESKY, L. M., AND SECHI, A. S. 1999. The Arp2/3 complex is essential for the actin-based motility of *Listeria monocytogenes*. *Curr Biol*, **9**(14): 759–62.
- MCLAREN, R. S., CARUCCIO, N., AND ROSS, J. 1997. Human La protein: a stabilizer of histone mRNA. *Mol Cell Biol*, **17**(6): 3028–36.
- MEEROVITCH, K., PELLETIER, J., AND SONENBERG, N. 1989. A cellular protein that binds to the 5'-noncoding region of Poliovirus RNA: implications for internal translation initiation. *Genes Dev*, **3**(7): 1026–34.
- MEEROVITCH, K., SVITKIN, Y. V., LEE, H. S., LEJBKOWICZ, F., KENAN, D. J., CHAN, E. K., AGOL, V. I., KEENE, J. D., AND SONENBERG, N. 1993. La autoantigen enhances and corrects aberrant translation of Poliovirus RNA in reticulocyte lysate. *J Virol*, **67**(7): 3798–807.
- MELANDER GRADIN, H., MARKLUND, U., LARSSON, N., CHATILA, T. A., AND GULLBERG, M. 1997. Regulation of microtubule dynamics by Ca^{2+} /calmodulin-dependent kinase IV/Gr-dependent phosphorylation of oncoprotein 18. *Mol Cell Biol*, **17**(6): 3459–67.
- MELANDER GRADIN, H., LARSSON, N., MARKLUND, U., AND GULLBERG, M. 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**(1): 131–41.

- MENGAUD, J., DRAMSI, S., GOUIN, E., VÁZQUES-BOLAND, J. A., MILON, G., AND COSSART, P. 1991. Pleiotropic control of *Listeria monocytogenes* virulence factors by a gene that is autoregulated. *Mol Microbiol*, **5**(9): 2273–83.
- MENGAUD, J., OHAYON, H., GOUNON, P., MÈGE, R. M., AND COSSART, P. 1996. E-cadherin is the receptor for internalin, a surface protein required for entry of *L. monocytogenes* into epithelial cells. *Cell*, **84**(6): 923–32.
- MIKHAILOV, A., AND GUNDERSEN, G. G. 1998. Relationship between microtubule dynamics and lamellipodium formation revealed by direct imaging of microtubules in cells treated with nocodazole or taxol. *Cell Motil Cytoskeleton*, **41**(4): 325–40.
- MOUNIER, J., RYTER, A., COQUIS-RONDON, M., AND SANSONETTI, P. J. 1990. Intracellular and cell-to-cell spread of *Listeria monocytogenes* involves interaction with F-actin in the enterocytelike cell line Caco-2. *Infect Immun*, **58**(4): 1048–58.
- MOURRAIN, P., LASA, I., GAUTREAU, A., GOUIN, E., PUGSLEY, A., AND COSSART, P. 1997. ActA is a dimer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**(19): 10034–9.
- MULLINS, R. D., HEUSER, J. A., AND POLLARD, T. D. 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 U S A*, **95**(11): 6181–6.
- MURRAY, E. G. D., WEBB, R. A., AND SWANN, M. B. R. 1926. A disease of rabbits characterized by large mononuclear leucocytosis, caused by a hitherto undescribed bacillus, *Bacillum monocytogenes* (n.sp.). *J. Pathol. Bacteriol.*, **29**: 407–439.
- NAGASE, T., SEKI, N., ISHIKAWA, K., OHIRA, M., KAWARABAYASI, Y., OHARA, O., TANAKA, A., KOTANI, H., MIYAJIMA, N., AND NOMURA, N. 1996. Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. VI. The coding sequences of 80 new genes (KIAA0201-KIAA0280) deduced by analysis of cDNA clones from cell line KG-1 and brain. *DNA Res*, **3**(5): 321–9.
- NIEBUHR, K., CHAKRABORTY, T., ROHDE, M., GAZLIG, T., JANSEN, B., KOLLNER, P., AND WEHLAND, J. 1993. Localization of the ActA polypeptide of *Listeria monocytogenes* in infected tissue culture cell lines: ActA is not associated with actin 'comets'. *Infect Immun*, **61**(7): 2793–802.
- NIEBUHR, K., EBEL, F., FRANK, R., REINHARD, M., DOMANN, E., CARL, U. D., WALTER, U., GERTLER, F. B., WEHLAND, J., AND CHAKRABORTY, T. 1997. A novel proline-rich motif present in ActA of *Listeria monocytogenes* and cytoskeletal proteins is the ligand for the EVH1 domain, a protein module present in the Ena/VASP family. *EMBO J*, **16**(17): 5433–44.
- OFFEN, D., MENDLOVIC, S., FRICKE, H., SPERLING, R., SPERLING, J., AND MOZES, E. 1990. Monoclonal anti-La antibody derived from a mouse with experimental SLE is similar to human anti-La antibodies. *J Autoimmun*, **3**(6): 701–13.
- OKUHARA, K., MUROFUSHI, H., AND SAKAI, H. 1989. Binding of kinesin to stress fibers in fibroblasts under condition of microtubule depolymerization. *Cell Motil Cytoskeleton*, **12**(2): 71–7.
- OZON, S., MAUCUER, A., AND SOBEL, A. 1997. The stathmin family - molecular and biological characterization of novel mammalian proteins expressed in the nervous system. *Eur J Biochem*, **248**(3): 794–806.
- PALMER, L. E., HOBBIIE, S., GALAN, J. E., AND BLISKA, J. B. 1998. YopJ of *Yersinia pseudotuberculosis* is required for the inhibition of macrophage TNF- α production and downregulation of the MAP kinases p38 and JNK. *Mol Microbiol*, **27**(5): 953–65.
- PARK, Y. W., AND KATZE, M. G. 1995. Translational control by Influenza virus. Identification of cis-acting sequences and trans-acting factors which may regulate selective viral mRNA translation. *J Biol Chem*, **270**(47): 28433–9.
- PARRISIUS, J., BHAKDI, S., ROTH, M., TRANUM-JENSEN, J., GOEBEL, W., AND SEELIGER, H. P. 1986. Production of listeriolysin by β -hemolytic strains of *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun*, **51**(1): 314–9.
- PEARSON, W. R., AND LIPMAN, D. J. 1988. Improved tools for biological sequence comparison. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **85**(8): 2444–8.
- PERSSON, C., CARBALLAIRA, N., WOLF-WATZ, H., AND FÄLLMANN, M. 1997. The PTPase YopH inhibits uptake of *Yersinia*, tyrosine phosphorylation of p130^{Cas} and FAK, and the associated accumulation of these proteins in peripheral focal adhesions. *EMBO J*, **16**(9): 2307–18.
- PFEUFFER, T. 1996. *Untersuchungen zur Interaktion von Wirtszellproteinen mit Virulenzfaktoren von Listeria monocytogenes*. Diplomarbeit, Bayerische Julius-Maximilians-Universität, Würzburg.
- PISTOR, S., CHAKRABORTY, T., NIEBUHR, K., DOMANN, E., AND WEHLAND, J. 1994. The ActA protein of *Listeria monocytogenes* acts as a nucleator inducing reorganization of the actin cytoskeleton. *EMBO J*, **13**(4): 758–63.

- PISTOR, S., CHAKRABORTY, T., WALTER, U., AND WEHLAND, J. 1995. The bacterial actin nucleator protein ActA of *Listeria monocytogenes* contains multiple binding sites for host microfilament proteins. *Curr Biol*, **5**(5): 517–25.
- POGUE, G. P., HOFMANN, J., DUNCAN, R., BEST, J. M., ETHERINGTON, J., SONTHEIMER, R. D., AND NAKHASI, H. L. 1996. Autoantigens interact with cis-acting elements of Rubella virus RNA. *J Virol*, **70**(9): 6269–77.
- PRUIJN, G. J., SLOBBE, R. L., AND VAN VENROOIJ, W. J. 1990. Structure and function of La and Ro RNPs. *Mol Biol Rep*, **14**(2-3): 43–8.
- PSCHYREMBEL. 1993. *Medizinisches Wörterbuch*. 257 edn. Hamburg: Nikol Verlagsgesellschaft mbH.
- PUMIGLIA, K. M., AND DECKER, S. J. 1997. Cell cycle arrest mediated by the MEK/mitogen-activated protein kinase pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**(2): 448–52.
- PURICH, D. L., AND SOUTHWICK, F. S. 1997. ABM-1 and ABM-2 homology sequences: consensus docking sites for actin-based motility defined by oligoproline regions in *Listeria* ActA surface protein and human VASP. *Biochem Biophys Res Commun*, **231**(3): 686–91.
- REINHARD, M., RÜDIGER, M., JOCKUSCH, B. M., AND WALTER, U. 1996. VASP interaction with vinculin: a recurring theme of interactions with proline-rich motifs. *FEBS Lett*, **399**(1-2): 103–7.
- REN, Y., LI, R., ZHENG, Y., AND BUSCH, H. 1998. Cloning and characterization of GEF-H1, a microtubule-associated guanine nucleotide exchange factor for Rac and Rho GTPases. *J Biol Chem*, **273**(52): 34954–60.
- RENZONI, A., KLARSELD, A., DRAMSI, S., AND COSSART, P. 1997. Evidence that PrfA, the pleiotropic activator of virulence genes in *Listeria monocytogenes*, can be present but inactive. *Infect Immun*, **65**(4): 1515–8.
- RESSAD, F., DIDRY, D., EGILE, C., PANTALONI, D., AND CARLIER, M. F. 1999. Control of actin filament length and turnover by actin depolymerizing factor (ADF/cofilin) in the presence of capping proteins and ARP2/3 complex. *J Biol Chem*, **274**(30): 20970–6.
- RIEDERER, B. M., PELLIER, V., ANTONSSON, B., PAOLO, G. DI, STIMPSON, S. A., LUTJENS, R., CATSICAS, S., AND GRENNINGLOH, G. 1997. Regulation of microtubule dynamics by the neuronal growth-associated protein SCG10. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**(2): 741–5.
- RINKE, J., AND STEITZ, J. A. 1985. Association of the lupus antigen La with a subset of U6 snRNA molecules. *Nucleic Acids Res*, **13**(7): 2617–29.
- ROBBINS, J. R., BARTH, A. I., MARQUIS, H., DE HOSTOS, E. L., NELSON, W. J., AND THERIOT, J. A. 1999. *Listeria monocytogenes* exploits normal host cell processes to spread from cell to cell. *J Cell Biol*, **146**(6): 1333–50.
- ROSENBLATT, J., AGNEW, B. J., ABE, H., BAMBURG, J. R., AND MITCHISON, T. J. 1997. Xenopus actin depolymerizing factor/cofilin (XAC) is responsible for the turnover of actin filaments in *Listeria monocytogenes* tails. *J Cell Biol*, **136**(6): 1323–32.
- ROUQUETTE, C., DE CHASTELLIER, C., NAIR, S., AND BERCHE, P. 1998. The ClpC ATPase of *Listeria monocytogenes* is a general stress protein required for virulence and promoting early bacterial escape from the phagosome of macrophages. *Mol Microbiol*, **27**(6): 1235–45.
- RUTJES, S. A., UTZ, P. J., DER HEIJDEN, A., BROEKHUIS, C., VAN VENROOIJ, W. J., AND PRUIJN, G. J. 1999. The La (SS-B) autoantigen, a key protein in RNA biogenesis, is dephosphorylated and cleaved early during apoptosis. *Cell Death Differ*, **6**(10): 976–986.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F., AND MANIATIS, T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- SAMUELS, M. L., AND MCMAHON, M. 1994. Inhibition of platelet-derived growth factor- and epidermal growth factor-mediated mitogenesis and signaling in 3T3 cells expressing delta Raf-1:ER, an estradiol-regulated form of Raf-1. *Mol Cell Biol*, **14**(12): 7855–66.
- SANGER, J. M., SANGER, J. W., AND SOUTHWICK, F. S. 1992. Host cell actin assembly is necessary and likely to provide the propulsive force for intracellular movement of *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun*, **60**(9): 3609–19.
- SCHLECH, W. F., LAVIGNE, P. M., BORTOLUSSI, R. A., ALLEN, A. C., HALDANE, E. V., WORT, A. J., HIGHTOWER, A. W., JOHNSON, S. E., KING, S. H., NICHOLLS, E. S., AND BROOME, C. V. 1983. Epidemic listeriosis - evidence for transmission by food. *N Engl J Med*, **308**(4): 203–6.
- SCHUBART, U. K., ALAGO W, J., AND DANOFF, A. 1987. Properties of p19, a novel cAMP-dependent protein kinase substrate protein purified from bovine brain. *J Biol Chem*, **262**(24): 11871–7.
- SCHUCHAT, A., SWAMINATHAN, B., AND BROOME, C. V. 1991. Epidemiology of human listeriosis. *Clin Microbiol Rev*, **4**(2): 169–83.

- SEWING, A., WISEMAN, B., LLOYD, A. C., AND LAND, H. 1997. High-intensity Raf signal causes cell cycle arrest mediated by p21Cip1. *Mol Cell Biol*, **17**(9): 5588–97.
- SHEEHAN, B., KLARSFELD, A., EBRIGHT, R., AND COSSART, P. 1996. A single substitution in the putative helix-turn-helix motif of the pleiotropic activator PrfA attenuates *Listeria monocytogenes* virulence. *Mol Microbiol*, **20**(4): 785–97.
- SIDER, J. R., MANDATO, C. A., WEBER, K. L., ZANDY, A. J., BEACH, D., FINST, R. J., SKOBLE, J., AND BEMENT, W. M. 1999. Direct observation of microtubule-f-actin interaction in cell free lysates. *J Cell Sci*, **112**(12): 1947–56.
- SMITH, G. A., AND PORTNOY, D. A. 1997. How the *Listeria monocytogenes* ActA protein converts actin polymerization into a motile force. *Trends Microbiol*, **5**(7): 272–6.
- SMITH, G. A., PORTNOY, D. A., AND THERIOT, J. A. 1995a. Asymmetric distribution of the *Listeria monocytogenes* ActA protein is required and sufficient to direct actin-based motility. *Mol Microbiol*, **17**(5): 945–51.
- SMITH, G. A., MARQUIS, H., JONES, S., JOHNSTON, N. C., PORTNOY, D. A., AND GOLDFINE, H. 1995b. The two distinct phospholipases C of *Listeria monocytogenes* have overlapping roles in escape from a vacuole and cell-to-cell spread. *Infect Immun*, **63**(11): 4231–7.
- SMITH, G. A., THERIOT, J. A., AND PORTNOY, D. A. 1996. The tandem repeat domain in the *Listeria monocytogenes* ActA protein controls the rate of actin-based motility, the percentage of moving bacteria, and the localization of vasodilator-stimulated phosphoprotein and profilin. *J Cell Biol*, **135**(3): 647–60.
- SOBEL, A. 1991. Stathmin: a relay phosphoprotein for multiple signal transduction? *Trends Biochem Sci*, **16**(8): 301–5.
- SOBEL, A., AND TASHJIAN JR., A. H. 1983. Distinct patterns of cytoplasmic protein phosphorylation related to regulation of synthesis and release of prolactin by GH cells. *J Biol Chem*, **258**(17): 10312–24.
- SPANGBERG, K., GOOBAR-LARSSON, L., WAHREN-HERLENIUS, M., AND SCHWARTZ, S. 1999. The La protein from human liver cells interacts specifically with the U-rich region in the Hepatitis C virus 3' untranslated region. *J Hum Virol*, **2**(5): 296–307.
- STEFANO, J. E. 1984. Purified lupus antigen La recognizes an oligouridylylate stretch common to the 3' termini of RNA polymerase III transcripts. *Cell*, **36**(1): 145–54.
- STINS, M. F., PRASADARAO, N. V., IBRIC, L., WASS, C. A., LUCKETT, P., AND KIM, K. S. 1994. Binding characteristics of S fimbriated *Escherichia coli* to isolated brain microvascular endothelial cells. *Am J Pathol*, **145**(5): 1228–36.
- SVITKIN, Y. V., MEEROVITCH, K., LEE, H. S., DHOLAKIA, J. N., KENAN, D. J., AGOL, V. I., AND SONENBERG, N. 1994. Internal translation initiation on Poliovirus RNA: further characterization of La function in Poliovirus translation *in vitro*. *J Virol*, **68**(3): 1544–50.
- SWANSON, J. A., AND BAER, S. C. 1995. Phagocytosis by zippers and triggers. *Trends Cell Biol*, **5**: 89–93.
- TAN, E. M. 1989. Antinuclear antibodies: diagnostic markers for autoimmune diseases and probes for cell biology. *Adv Immunol*, **44**: 93–151.
- THERIOT, J. A., MITCHISON, T. J., TILNEY, L. G., AND PORTNOY, D. A. 1992. The rate of actin-based motility of intracellular *Listeria monocytogenes* equals the rate of actin polymerization. *Nature*, **357**(6375): 257–60.
- THERIOT, J. A., ROSENBLATT, J., PORTNOY, D. A., GOLDSCHMIDT-CLERMONT, P. J., AND MITCHISON, T. J. 1994. Involvement of profilin in the actin-based motility of *L. monocytogenes* in cells and in cell-free extracts. *Cell*, **76**(3): 505–17.
- TILNEY, L. G., AND PORTNOY, D. A. 1989. Actin filaments and the growth, movement, and spread of the intracellular bacterial parasite, *Listeria monocytogenes*. *J Cell Biol*, **109**(4 Pt 1): 1597–608.
- TRÖSTER, H., METZGER, T. E., SEMSEI, I., SCHWEMMLE, M., WINTERPACHT, A., ZABEL, B., AND BACHMANN, M. 1994. One gene, two transcripts: isolation of an alternative transcript encoding for the autoantigen La/SS-B from a cDNA library of a patient with primary Sjögrens' syndrome. *J Exp Med*, **180**(6): 2059–67.
- TRÖSTER, H., BARTSCH, H., KLEIN, R., METZGER, T. E., POLLAK, G., SEMSEI, I., SCHWEMMLE, M., PRULJN, G. J., VAN VENROOLJ, W. J., AND BACHMANN, M. 1995. Activation of a murine autoreactive B cell by immunization with human recombinant autoantigen La/SS-B: characterization of the autoepitope. *J Autoimmun*, **8**(6): 825–42.
- VASILIEV, J. M. 1991. Polarization of pseudopodial activities: cytoskeletal mechanisms. *J Cell Sci*, **98**(Pt 1): 1–4.

- VÁZQUES-BOLAND, J. A., KOCKS, C., DRAMSI, S., OHAYON, H., GEOFFROY, C., MENGAUD, J., AND COSSART, P. 1992. Nucleotide sequence of the lecithinase operon of *Listeria monocytogenes* and possible role of lecithinase in cell-to-cell spread. *Infect Immun*, **60**(1): 219–30.
- WALCZAK, C. E. 2000. Microtubule dynamics and tubulin interacting proteins. *Curr Opin Cell Biol*, **12**(1): 52–6.
- WALKER, R. A., O'BRIEN, E. T., PRYER, N. K., SOBOEIRO, M. F., VOTER, W. A., ERICKSON, H. P., AND SALMON, E. D. 1988. Dynamic instability of individual microtubules analyzed by video light microscopy: rate constants and transition frequencies. *J Cell Biol*, **107**(4): 1437–48.
- WATERMAN-STORER, C. M., AND SALMON, E. 1999. Positive feedback interactions between microtubule and actin dynamics during cell motility. *Curr Opin Cell Biol*, **11**(1): 61–7.
- WATERMAN-STORER, C. M., WORTHYLAKE, R. A., LIU, B. P., BURRIDGE, K., AND SALMON, E. D. 1999. Microtubule growth activates Rac1 to promote lamellipodial protrusion in fibroblasts. *Nat Cell Biol*, **1**(1): 45–50.
- WEISSINGER, E. M., EISSNER, G., GRAMMER, C., FACKLER, S., HAEFNER, B., YOON, L. S., LU, K. S., BAZAROV, A., SEDIVY, J. M., MISCHAK, H., AND KOLCH, W. 1997. Inhibition of the Raf-1 kinase by cyclic AMP agonists causes apoptosis of v-abl-transformed cells. *Mol Cell Biol*, **17**(6): 3229–41.
- WELCH, M. D., IWAMATSU, A., AND MITCHISON, T. J. 1997a. Actin polymerization is induced by Arp2/3 protein complex at the surface of *Listeria monocytogenes*. *Nature*, **385**(6613): 265–9.
- WELCH, M. D., DEPACE, A. H., VERMA, S., IWAMATSU, A., AND MITCHISON, T. J. 1997b. The human Arp2/3 complex is composed of evolutionarily conserved subunits and is localized to cellular regions of dynamic actin filament assembly. *J Cell Biol*, **138**(2): 375–84.
- WELCH, M. D., ROSENBLATT, J., SKOBLE, J., PORTNOY, D. A., AND MITCHISON, T. J. 1998. Interaction of human Arp2/3 complex and the *Listeria monocytogenes* ActA protein in actin filament nucleation. *Science*, **281**(5373): 105–8.
- WENZ, A. 1995. *Charakterisierung einiger cDNA-Klone, die mit Antikörpern gegen das Kernprotein La/SS-B positiv reagieren*. Doktorarbeit, Johannes Gutenberg Universität, Mainz.
- WILLIAMS, J. M., CHEN, G.-C., ZHU, L., AND REST, R. F. 1998. Using the yeast two-hybrid system to identify human epithelial cell proteins that bind gonococcal Opa proteins: intracellular gonococci bind pyruvate kinase via their Opa proteins and require host pyruvate for growth. *Mol Microbiol*, **27**(1): 171–86.
- WILUSZ, J., KURILLA, M. G., AND KEENE, J. D. 1983. A host protein (La) binds to a unique species of minus-sense leader RNA during replication of Vesicular stomatitis virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **80**(19): 5827–31.
- WOODS, D., PARRY, D., CHERWINSKI, H., BOSCH, E., LEES, E., AND MCMAHON, M. 1997. Raf-induced proliferation or cell cycle arrest is determined by the level of Raf activity with arrest mediated by p21Cip1. *Mol Cell Biol*, **17**(9): 5598–611.
- WU, X., KOCHER, B., WEI, Q., AND HAMMER 3rd, J. A. 1998. Myosin Va associates with microtubule-rich domains in both interphase and dividing cells. *Cell Motil Cytoskeleton*, **40**(3): 286–303.
- YOO, C. J., AND WOLIN, S. L. 1997. The yeast La protein is required for the 3' endonucleolytic cleavage that matures tRNA precursors. *Cell*, **89**(3): 393–402.
- ZHANG, Q., MAGNUSSON, M. K., AND MOSHER, D. F. 1997. Lysophosphatidic acid and microtubule-destabilizing agents stimulate fibronectin matrix assembly through Rho-dependent actin stress fiber formation and cell contraction. *Mol Biol Cell*, **8**(8): 1415–25.
- ZUMBIHL, R., AEPFELBACHER, M., ANDOR, A., JACOBI, C. A., RUCKDESCHEL, K., ROUOT, B., AND HEESEMANN, J. 1999. The Cytotoxin YopT of *Yersinia enterocolitica* Induces Modification and Cellular Redistribution of the Small GTP-binding Protein RhoA. *J Biol Chem*, **274**(41): 29289–93.

A Anhang

A.1 Nukleotidsequenzen der pPC67-cDNA Inserts

A.1.1 cDNAs der AIPs

Die Nukleotidsequenzen der drei AIPs beginnen jeweils mit dem ersten Triplet des cDNA-Inserts unmittelbar nach der Adapter-Sequenz (vgl. Abb. 5A).

```
pPC67-15:      1 CGGGATAAAGATTTGATAGAGTCGCTCTCTGAGGACCGAGCTCGTTTGCTTGAAGAGAAG 60
                R D K D L I E S L S E D R A R L L E E K
(Acc-Nr.      61 AAGCAGCTTGAAGAGGAAGTGAATAAAGTCCGCACTAGCAGTTTTCTTTCTCAGCACCT 120
AJ242720)     K Q L E E E V S K L R T S S F L S S A P
                121 GTGGCTGCAGCCCCAGAGCTCTATGGTGCCTGTGCACCTGAGCTCCAGGGGAGCCAGAG 180
                V A A A P E L Y G A C A P E L P G E P E
                181 AGATCAGTCATGGAGACGGCAGATGAAGGAAGACTGGATTCGCAATGGAGACAAGCATG 240
                R S V M E T A D E G R L D S A M E T S M
                241 ATGTCTGTCCAAGAAAACATGTTATCTGAAGAGAACGAGAGGATCATGCTCCTAGAACGG 300
                M S V Q E N M L S E E N E R I M L L E R
                301 ACATTGCAGTTGAAAAGAAGAAGAAAACAAGCGGTTAAATCAAAGACTGATGTCTCAGAGT 360
                T L Q L K E E E N K R L N Q R L M S Q S
                361 TTGTCCTCAGTCTCTTCAAGGCATTCTGAAAAAATAGCCATTAGAGATTTTCAGGTGGGA 420
                L S S V S S R H S E K I A I R D F Q V G
                421 GATTTGGTTCTCATCCTAGATGAGCGGCACGACAATTATGTATTGTTACTGTTAGT 480
                D L V L I I L D E R H D N Y V L F T V S
                481 CCTACTTTATATTTTCTGCACTCAGAGTCTCTTCTGCCCCTGGATCTCAAACCAGCTTCA 540
                P T L Y F L H S E S L P A L D L K P A S
                541 GGTGCATCTAGAAGACCCTGGGTCTTGGGAAAAGTAATGGAAAAGGAATACTGTCAAGCC 600
                G A S R R P W V L G K V M E K E Y C Q A
                601 AAAAAGGCACAAAACAGATTTAAAGTTCCTTTGGGGACAAAAGTTTACAGAGTGAAAGCT 660
                K K A Q N R F K V P L G T K F Y R V K A
                661 GTGTCATGGAATAAGAAAAGTATAGCCACAGAAGAAATCTCTACATCTCATACCATTTTTG 720
                V S W N K K V *
                721 ATTTGTCCTCCAGTCTGATAAACTACTCTAAAAACAGCTGGCCATTGTTGGGTTTTTTTT 780
                781 TTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTTACAAAAGTCAACATAACAATATACTTCATTGG 840
                841 TGGACTGCACCTTACCTTTTAAAGTGGCTACATCTTAGGAACAATAAATTTATAAAATTCA 900
                901 AAAAAAAAAAAAAAAAAAATGGCGGCCGACCGCTGGAGCTTTGGACTTCTTCGCCAGAGG 960
                961 TTTGGTCAGTCTCCAATCAAGGTTGTCGGCTTGTC
```

```
pPC67-18/     1 GTCCACGTGAGCGGCGCGGCCGAGGTGTCCGCCAGCCCCGACCGGGCGCTGGTGACCGTG 60
pPC67-70:     V H V S G A A E V S A S P D R A L V T V
                61 CGAGTGAGCAGCACCAAGGAGGTGTCCGCCAGGCCAAGAAGAGTGTGTGTCGCCGCCCTG 120
(Acc-Nr.      R V S S T K E V S A E A K K S V C R R L
AJ242722)    121 GACTACATCAGCAGAGCCTCCAGCAGAGGGTTTCAGGCAGAAAATGTAAGTGTGACA 180
                D Y I T Q S L Q Q Q G F Q A E N V T V T
                181 AAGAACATTAGAAGAGTAGAAAATGCGTATCGCATGGAAGCCGAGGTCTGCATTACATT 240
                K N I R R V E N A Y R M E A E V C I T F
                241 ACTGAATTCGAAAAATGCAAAAATTTGTAAGTCTTCTGGTTGAAAAACTAGATAGCTCT 300
                T E F G K M Q N I C N F L V E K L D S S
                301 GTTGTCTACAGCCACCTGAGTTCTATCACACCAGGTTCTGTTGAGAATCTTCGGCGG 360
                V V I S P P E F Y H T P G S V E N L R R
```

```

361 CAGGCCTGTCTGGTTGCTGTTGAGAATGCATGGCGCAAAGCTCAAGAAGTCTGTGACCTC 420
    Q A C L V A V E N A W R K A Q E V C D L
421 GTTGGCCAAACTCTGGGAAAACCTTTACTAATCAAAGAAGAAGAAAACAAAAGACTGGGAA 480
    V G Q T L G K P L L I K E E E T K D W E
481 GGCCAAACGGATGATCATCAGTTATCCAGACTGCCAGGCACATTAAGTGTACAACAGAAA 540
    G Q T D D H Q L S R L P G T L T V Q Q K
541 ATCAAAAAGTCAACCATCCATGCATCTTGAAGGTGTTTACTTCTTTGAGGTAAAAGGA 600
    I K S A T I H A S S K V F I T F E V K G
601 AAAGAGAAGAAAAAAGCATCTTTAAAATTCTAACTAAAACATGATGTGTCTGTACTTT 660
    K E K K K K H L *
661 TAAATCTGTTTTTATGACATTTTACAGTGCTTCTTTCTGTCTCGGACATACATATTGTAT 720
721 GGCATATTCAGTAAGCCTCAGTAAAATCTGCCACTTTTTGAACATAATGTTCCATCTATG 780
781 AGG

```

```

pPC67-37: 1 GGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGCGGCCGCTCAGGCTAGAGGTTGGCTGGTTGCTGAACGC 60
    G E R E R E R A A A Q A R G W L V A E R
(Acc-Nr. 61 TGCCCCAGTGCCGGTCCGGCCATGGCGGAGCCCGACCCTTGGTCTCGGGGAGCTCGCG 120
AJ242721) C P S A G R A M G E P D P L V S G Q L A
121 GCCCCGGGAGCTGGTGTGCTGGCGGGCTGGGGATGGACTGCGAGTGGCTGCAGCTGGAG 180
    A R R S W C L R R L G M D C E W L Q L E
181 GCTGGGACTGAGGTGACCATAGGACGGGGACTTAGTGTACATACCAGCTGATATCAAAG 240
    A G T E V T I G R G L S V T Y Q L I S K
241 GTTTGCCTCTGATGATTTCCCGAAGCCACTGTGTTCTGAAGCAGAATCCTGAGGGACAG 300
    V C P L M I S R S H C V L K Q N P E G Q
301 TGGACCATTATGGACAATAAGAGTCTGAATGGTGTGGCTGAACAGAGAACGTCTGGCA 360
    W T I M D N K S L N G V W L N R E R L A
361 CCATTACAGGGTTATTGCATCCGTAAGGGAGACCATATCCAGCTCGGTGTGCCGCTGGAA 420
    P L Q G Y C I R K G D H I Q L G V P L E
421 AGCAGGGAGAGCGGAGAGTATGAATACGAAGTCATTGAAGAAGACTGGGAGAGTCTGGCT 480
    S R E T A E Y E Y E V I E E D W E S L A
481 CCCTGCCTTGCCCCGAAGAATGACCAGAGAATGGAAAAACATAAAGGCTCGAGAATAAG 540
    P C L A P K N D Q R M E K H K G S R T K
541 AGGAAATTCAGTTCGCCTGGGTTAGAGAATCTCCAGCCGAGGGCTCCTCAGATCTCAGA 600
    R K F S S P G L E N L P A E G S S D L R
601 TGCCCAGTGGCTAATGTGCCAGTAAACCCATTGAGCCAGAGAAGTGCATGGCAAAGGT 660
    C P L A N V A S K P I E P E K L H G K G
661 GACGCATCGAGTCAGTCCCTGGGATGCTTGTGTCTGGGCTGACTTCTCTGAAGGCGAGT 720
    D A S S Q S L G C L C P G L T S L K A S
721 GAGAGGGCCCGGGCTCATGCTTGTCTCTTCCAAAGGTCCTGGAAGTCTCAGTTGTC 780
    E R A A G L M A L L F Q R S W N S V V
781 CTAAGAAGCAGAAGGCCTGCAGCCATCAGCATCTCAGAACAGCTTAGAACTGTTAAG 840
    L R S R R P A D H Q H L R T A *
841 TGACCATGTCCAGGATGCTGAAGCTGAAACACAGATGCAGGAGAAGCAGATAGCTGTCCT 900
901 AAACGTCAAGAGACAGACTCGGAAGGGAGCTCAAAGAAGA

```

A.1.2 Inserts der falsch-positiven Plasmide

Die folgenden Sequenzen stammen von Inserts der pPC67-cDNA-Plasmide, die aus den Hefeklonen isoliert wurden, welche nach Transformation der Genbank beide Reportergene aktiviert hatten, aber nach der Passage in *E. coli* und Rücktransformation in die Hefestämme das *lacZ*-Gen nicht mehr exprimierten. Alle Sequenzen beginnen einheitlich mit dem Threonin T₈₈₅ der GAL4-TA Sequenz.

```

pPC67-4: 1 ACCCACGCGTCCGGAGAGAGAGAGAGAGAGAGCGGCCGCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT 60
    T H A S G E R E R E R A A A L S L S L S
61 CCGGACGCGTGGGTCAACATTTTGAAGAGCAGACTCATAGCACCACCCACCCTGAGA 120
    P D A W V N I L K E Q T H S T H P P L R
121 ATCCATCTTCATGGCCAACCTGCGTACCCTGAGACCACCCACCCACATCATCTGAG 180
    I H L H G Q L C L T R E T T T H I I L E
181 CCAAGCCTTACCCCGGATGACTTCATC
    P S L Y P G M T S

```

pPC67-5: 1 ACCCACGCGTCCGGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGCGGCCCATTTTTTTTTTTTTTTT 60
T H A S G E R E R E R A A A I F F F F F
61 TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGGAAAAAAAAAAAA 120
F F F F F F F F F F F F F F F G K K K K
121 AAAAAAGCGGCCCGCCCGGGGGGACCTTTGGCACTTTTCCCAAAGTTGGG
K K A A P P R G G P L A L F P Q R L

pPC67-6: 1 ACCCCGGACATCAGACCTGGTGAGGAGAGGCTTCCCTCAGGTGCTCGGGAAGCTGGATGC 60
T P D I R P G E E R L P S G A R E A G C
61 ACAGTTAGCCCTTTGTTGAACTTGTTCAGCTAGCCCTTCTAGAAGTGCTTCCAAG 120
T G *
121 CCTGGCCTTGGAGCTGCTTGAGAGCACCTATCCACAGTGAGGGTAGGGTTGTTACTTTA 180
181 TTTCTTTTCATAAAAATCACTCCAATGGGAAGCACCTGGAAACGCTAAGAAATTAAGTGC 240
241 GTTTGAAATCCTCCAGGCATAGAGAAAGGAGCATTATGGAACCCACAAATCTCTTGTG 300
301 CACCCAAATAAAACTGTGCATTCTTGTATGTAGTTGCCCTCGTGAATGTGTGTGAG 360
361 ATT

pPC67-39: 1 ACCCACGCGTCCGGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGCGGCCCATTTTTTTTTTTTAAATTT 60
T H A S G E R E R E R A A A I F F F *
61 TCTCCTGTTTCTGGCCCTCCATCCTTTCTATTTTGTGCTTTTCCAGGGAGCCCCAG 120
121 ACCCTCCTCCTGACAGGAAAGAGAAATGTGCCAAGGGACTCCATTGGCTGTCTAAATCCT 180
181 ATTTAATATCCCTACTCACTAGGCTCCAAGGGTGTGGCTGGCATGGAGCCATGGTGGCAG 240
241 AGGCCTTCAAACACACAGCAGGGTGGCCAAGCTCAATAAACTAATCAATGGCCAATCCA 300
301 GCCCTGTGGGTTTTTACAAGATGATCCGTGAATTCCTGATAAGGAGACTTGGTGAAGACA 360
361 GTCTCTTTCCAGAGGTCGGGGTCA

pPC67-46: 1 ACCCACGCGTCCGGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGCGGCCCATTTTTTTTTTTTTTTTAAA 60
T H A S G E R E R E R P P F F F F F F K
61 AGATTTATTTATAATATGTAGGTGACTGTAGCTGTCTTCAGACACTCCAGAAGAGGGTG 120
R F I Y N M *
121 TCAGATCTTGTTACAGATGGTTGTGAGCTACCATGTAGTTGCTGGAATTTGAACTCCAGA 180
181 CCTTGGAAGAGCAGTCAGTGTCTTAACCACTGAGCCATCTCTCCATCTCAATTTAAC 240
241 TGAGATTAATTTCTGTATCAGTATGAAACTACATTAAGTGAACTTC

pPC67-54: 1 ACCCACGCGTCCGGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGCGGCCCATTTTTTTTTTTTTTTTTT 60
T H A S G E R E R E R A A A I F F F F F
61 TGCCGTAATAATGTTGCTTTATTAGTCTTTGCTGTGGGGGTGCGAGTACATTTCTTT 120
C R T N V A L L V L C C W G C E Y I F F
121 TGCAGCACCAGATCTTAAACTGGGCTACAGTC
C S T R S *

pPC67-56: 1 ACCCCGGCCCCACGCTCCGGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGCGGCCCATTTTTTTTTTTT 60
T P G P R V R R E R E R E S G R H F F F
61 TTTTCTACTCAGGCTTTATTCAAAGACCAAGGTACAAGTGCAAGGGAGAGAAGAAGG 120
F S Y S G F I Q R P R G T S A R E R R R
121 GCATGGCCAGAAGGCAAGCCCGCAGAAGGCAGCTTTAAC
A W P E G K P R R R Q L *

pPC67-59: 1 ACCCACGCGTCCGGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGCGGCCCATTTTTTTTTTTTTTTTTT 60
T H A S G E R E R E R A A A I F F F F F
61 TATTCAGAGTAATAACTTTATTCCAAATCACTTTTACAGCAACAGTCAGTGTAGATCA 120
Y S E *
121 TTTGTTAAACACAATACTATATGGACATTCACAGACAGGAAGCTAAGCTAAGCTGAT 180
181 TTGTGTCCCTCCCCCACCCTCAAAATCACCAAAGAAATCATGGGACTTGCAAGCACTGG 240
241 AGATCATGCCAGCACAGTAACGGCACAGGCTACAGTTCATCAGGAGAGAGTGGCCGCCA 300
301 CCGCGTGGAGCTTTGGACTTCTTCGCCAGAGGTTTGGCAAGTCTCCAATCAAGTTG

pPC67-61: 1 ACCCACGCGTCCGCGGACGCGTGGAGCTGTTCAAGCGCATCTCGGAGCAATTCAGTCCCA 60
T H A S A D A W S C S S A S R S N S L P
61 TGTTCCGGCGCAAGGCTTTCCTGCACTGGTACACGGGTGAGGGCATGGACGAGATGGAGT 120
C S G A R L S C T G T R V R A W T R W S
121 TCACCGAGGGGAGAGCAACATGAATGACCTGTTGTCTGAGTACCAGCAGTACCAGGATG 180
S P R R R A T *
181 CCACGGCTGATGAGCAGGGCGAGTTCGAGGAGGAGGGGTGAAGATGAGGCTTGAGAAC 240
241 TTCTCAGATACAGTGTGCACCCTTAGTGAACCTTCTGTTGTCTCCAGCATGGTCTTTCTA 300
301 TTTGTAAATTATGGTGCTCAGATTGCCTCTGTCAGAAATTCAGTGTGATGTAATAGTGT 360
361 GAACCTCTTAAGATCACAGTATTGTCTCAGAA

pPC67-68: 1 ACCCCACGCGTCCGGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGCGGCCGCAATTTTTTTTTTTTTTTT 60
T P R V R R E R E R E S G R H F F F F F
61 TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAAAAATAAAAAGGTTTTTA 120
F F F F F F F F F F F F L K N *
121 AATGGAAACCAACCCCAAAAAAAAAAACC

pPC67-69: 1 ACCCACGCCACGCGTCCGCGGACGCGTGGGTGCTTGTGAGTACCTACATGCATCTTGGT 60
T H A T R P R T R G C L S V T Y M H L G
61 CTGGTCTTAGTGGCTAGTCTTCCACTCTGAAAGCAAAGGTCTATCTATCTGTAAGGG 120
L V L S G *
121 CTCTCTACACACCCAGAGGCTTAGCTTGACAGTTCACACTCAAGTGTCTGTGAGAA 180
181 TCAATCCAGAGCTTCTCCCTCAAATAGTGAACCTTGTCTCCCGCTGGTCCCAAGGCTC 240
241 CCCTTAGTTAAGTTTCTCATGGCTCCCGCACATCCCGTAATCTGATCCAAGCCAGC 300
301 TATCTCTGCTAATAAAGGTTCCATTT

pPC67-71: 1 ACGTAGTCTAGAGCGCGCCACCGCGGTGGAGCTTGGACTTCTTCGCCAGAGGTTT 60
T L V L E R P P P R W S F G L L R Q R F
61 GGTCAAGTCTCAATCAAGGTTGTCGGCTTGTCTACCTTCCAGAAATTTACGAAAAGAT 120
G Q V S N Q G C R L V Y L A R N L R K D
121 GGAAAAGGTCAAATCGTTGGTAGATACGTTGTTGACTTCTAAATAAGCGAATTTCTT 180
G K G S N R W *
181 ATGATTCATGATTTTTATTATAAATAAGTTATAACAACAATAAGTGTATACAAATTAT 240
241 AAAGTGACTCTTAGGTTTTAAACGAAAATTTCTTATTCTTGAGTAACTCTTCTCCTGCAG 300
301 CTCAGCGCTTGTCTCAGGTATAGCATGAGGTCCGCTCTTATTGACCACCTCTACC 360
361 GCCATGCCCGAGCATAATGCCTGC

pPC67-74: 1 ACCCCGGGCGAGTCTTGGCAGATATGACCGCGCTGCATGTGCATACGGGGGACTCGTACT 60
T P G S S W Q I *
61 TCAACATCATCTTGGTGGACTTTGAGAGCGAGGACATGGATGTGGAGCGGGCCCTGCGTG 120
121 CGGCTCAGTACCTCGGTACCAGTACTTGAACGAACTGAAACTTCGAGCGCTCTGCAG 180
181 GCCTGCAAACTGGAGTGGATGCCGTGGAGACCCAGCAGCATCGTTTTCTCTGTGACC 240
241 TGCACATCCACTCCACCTAATATCCTGGACAGCATCCGCAAGCATTGCGTGGAGGGCA 300
301 AGCTGGCCTTCGCCCTGTGGTATGCGTCTGGGCTGTGGAAGCTACCGTGGGACCCACA 360
361 TG

pPC76-76: 1 ACCCCGGGCGAACCCTCTATCTACTATTGGAGCCTGAGCGGGAATAGTGGTACTGCAC 60
T P A E P S I Y Y S E P E R E *
61 TAAGTATTTAATTCGAGCAGAATTAGGTCAACCAGGTGCACTTTTAGGAGATGACCAAA 120
121 TTTACAATGTTATCGTAACTGCCATGCTTTTGTATAATTTCTTCATAGTAATACCAA 180
181 TAATAATTGGAGGCTTTGGAACTGACTTGTCCCACTAATAATCGGAGCCCCAGATATAG 240
241 CATTCCACGAATAAATAATAAAGTTTTTGTACTCCTACCACCATCATTTCTCCTCTCC 300
301 TAGCATCATCAATAGTAGAAGCAGGAGCAGGAACAGGATGAACAGTCTACCCACCTCTAG 360
361 CCGGAAATCTAGCCATGCAGGAGCATCAGTAGACCTAACA

A.2 Primärstrukturdaten von LaXp180

A.2.1 Das offene Leseraster von LaXp180

Das offene Leseraster von LaXp180 wurde von der publizierten Nukleotidsequenz des Klons KIAA0203 (Acc.-Nr. D86958) abgeleitet.

```
 1 MKLYVFLVNT GTTLTFDTEL TVQTVADLKH AIQSKYKIAI QHQVLVNGG ECMAADRRVC   60
61 TYSAGTDTNP IFLFNKEMIL CDRPPAIPKT TFSTENDMEI KVEESLMMPA VFHTVASRTQ  120
121 LALEMYEVAK KLCSFCEGLV HDEHLQHGGW AAIMANLEDC SNSYQKLLFK FESIYSNYLQ  180
181 SIEDIKLKLTL HLGTAHSVMA KIPLLECLTR HSYRECLGRL DSLPEHEDSE KAETKRSTEL  240
241 VLSPDMPRTT NESLLTSFPK SVEHVSPDTA DAESGKEIRE SCQSTVHQDQD ETTIDTKDGD  300
301 LPFFNVSLLD WINVQDRPND VESLVRKCFD SMSRLDPRII RPFIAECRQT IAKLDNQNMK  360
361 AIKGLEDRLY ALDQMIASCG RLVNEQKELA QGFLANQKRA ENLKDASVLP DLCLSHANQL  420
421 MIMLQNHKRL LDIKQKCTTA KQELANLHV RLKWCDFVML HADQDGEKLQ ALLRLVIELL  480
481 ERVKIVEALS TVPQMYCLAV VEVVRRKMF I KHYREWAGAL VKDGKRLYEA EKSKRESFGK  540
541 LFRKSFLRNR LFRGLDSWPP SFCTQKPRKF DCELPDISLK DLQFLQSFPC SEVQPFLRVP  600
601 LLCDFEPLHQ HVLALHNLVK AAQSLDEMSQ TITDLLSEQK ASVSQTSPQS ASSPRMESTA  660
661 GITTTTSPRT PPPLTVQDPL CPAVCPLEEL SPDSIDAHTF DFETIPHPNI EQTIHQVSLD  720
721 LDSLAESPES DFMSAVNEFV IEENLSSPNP ISDPQSPERM VESLYSSVIN AIDSRRMQDT  780
781 NVCCKEDFGD HTSLNVQLER CRVVAQDSHF SIQTIKEDLC HFRTFVQKEQ CDFSNSLKCT  840
841 AVEIRNIIEK VKCSLEITLK EKHQKELLSL KNEYEGKLDG LIKETEENEN KIKKLGELV   900
901 CLEEVLNKND NEFALVKHEK EAVICLQNEK DQKLEMENI MHSQNCEIKE LKQSREIVLE   960
961 DLKKLHVEND EKLQLLRAEL QSLEQSHLKE LEDTLQVRHI QEFEKVMTDH RVSLEELKKE  1020
1021 NQQIINQIQE SHAEIIQEKE KQLQELKLV SDLSDRCKL EVELALKEAE TDEIKILLEE  1080
1081 SRAQQKETLK SLLEQETENL RTEISKLNQK IQDNNENYQV GLAELRTLMT IEKDQCISEL  1140
1141 ISRHEESNI LKAELNKVTS LHNQAFIEK NLKEQIIEIQ SKLDSELSAL ERQKDEKITQ  1200
1201 QEEKYEAIQ NLEKDRQKLV SSQEQRDREL IQKLNCEKDE AIQTALKEFK LEREVVEKEL  1260
1261 LEKVKHLENQ IAKSPAIDST RGDSSSLVAE LQEKLQEEKA KFLEQLEEQE KRKNEEMQNV  1320
1321 RTSLIAEQQT NFNTVLTREK MRKENIINDL SDKLKSTMQQ QERDKDLIES LSEDARLLE  1380
1381 EKKKLEEEVS KLRSSSFVPS PYVATAPELY GACAPELPG SDRSAVETAD EGRVDSAMET  1440
1441 SMMSVQENIH MLSEKQRIM LLERTLQLKE EENKRLNQL MSQSMSSVSS RHSEKTAIRD  1500
1501 FQVGDVLVII LDERHDNYVL FTVSPTLYFL HSESLPALDL KPASGASRRP VWLGKVMKEK  1560
1561 YCQAKKAQNR FKVPLGTFY RVKAVSWNKK V
```

A.2.2 Aminosäurezusammensetzung

Ala (A):	85	5.3%	Leu (L):	195	12.3%
Arg (R):	77	4.8%	Lys (K):	134	8.4%
Asn (N):	67	4.2%	Met (M):	39	2.5%
Asp (D):	86	5.4%	Phe (F):	48	3.0%
Cys (C):	37	2.3%	Pro (P):	53	3.3%
Gln (Q):	103	6.5%	Ser (S):	127	8.0%
Glu (E):	185	11.6%	Thr (T):	78	4.9%
Gly (G):	33	2.1%	Trp (W):	7	0.4%
His (H):	40	2.5%	Tyr (Y):	22	1.4%
Ile (I):	83	5.2%	Val (V):	92	5.8%

A.2.3 Sequenzmotive

Putative N-Glykosylierungsstellen:

251-254 NESL 305-308 NVSL 744-747 NLSS

Putative Phosphorylierungsstellen der cAMP- und cGMP-abhängigen Proteinkinase:

235-238 KRST 534-537 KRES

Putative Phosphorylierungsstellen der Proteinkinase C:

212-214 SYR	229-231 SEK	234-236 TKR	274-276 SGK
439-441 TAK	533-535 SKR	564-566 TQK	578-580 SLK
836-838 SLK	869-871 SLK	653-655 SPR	667-669 SPR
653-655 SPR	667-669 SPR	774-776 SRR	814-816 TIK
578-580 SLK	836-838 SLK	869-871 SLK	858-860 TLK
1493-1495 SEK	1547-1549 SRR		

Putative Phosphorylierungsstellen der Caseinkinase II:

24-27 TVAD	94-97 TEND	134-137 SFCE	181-184 SIED
212-215 SYRE	222-225 SLPE	249-252 TTNE	274-277 SGKE
292-295 TTID	307-310 SLLD	333-336 SRLD	533-536 SKRE
578-581 SLKD	624-627 SLDE	631-634 TITD	675-678 TVQD
723-726 SLAE	814-817 TIKE	840-843 TAVE	858-861 TLKE
1013-1016 SLEE	1031-1034 SHAE	1091-1094 SLLE	1142-1145 SRHE
1181-1184 SKLD	1188-1191 SALE	1199-1202 TQQE	1221-1224 SSQE
1280-1283 TRGD	1370-1373 SLSE	1405-1408 TAPE	1424-1427 SAVE
1428-1431 TADE	1436-1439 SAME	1444-1447 SVQE	

Putative Phosphorylierungsstellen der Tyrosinkinase:

363-370 KGLEDRLY	1555-1561 KVMEKEY
------------------	-------------------

Putative N-Myristoylierungsstellen:

11-16 GTTLTF	193-198 GTAVSV	661-666 GITTTT
--------------	----------------	----------------

Putative Amidierungsstelle:

523-526 DGKR

Motiv zum Verankern in der Zellwand:

1281-1283 RGD

Leucin-Zipper-Motiv:

1371-1392 LSEDRARLLEEKKKLEEEVSKL

Publikationen

- PFEUFFER, T., GOEBEL, W., LAUBINGER, J., BACHMANN, M., AND KUHN, M. 2000. LaXp180, a mammalian ActA-binding protein, identified with the yeast two-hybrid system, co-localizes with intracellular *Listeria monocytogenes*. *Cell Microbiol*, im Druck.
- KUHN, M., PFEUFFER, T., GREIFFENBERG, L., AND GOEBEL, W. 1999. Host cell signal transduction during *Listeria monocytogenes* infection. *Arch Biochem Biophys*, **372**(1): 166–72.
- ENGELBRECHT, F., GREIFFENBERG, L., DANIELS, J. D., UND PFEUFFER, T. 2000. Wie fakultativ intrazelluläre Bakterien Krankheit auslösen - Eine Darstellung aus zellulärer und molekularer Sicht. *Biologie in unserer Zeit*. Angenommen.

Curriculum Vitae

Thilo Pfeuffer

* 14. August 1970 in Bad Neustadt/Saale

Schule:

1976 - 1981 Grund- und Hauptschule in Wollbach

1981 - 1990 Rhön-Gymnasium in Bad Neustadt/Saale

Abschluss: Abitur

Wehrdienst:

07/1990 - 06/1991 2. PzGrenBtl. 351 in Mellrichstadt

Studium:

11/1991 - 09/1996 Studium der Biologie an der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg mit Hauptfach Mikrobiologie und den Nebenfächern Zell- und Entwicklungsbiologie und Biochemie

11/1993 Vordiplomprüfung

11/1995 - 09/1996 Diplomarbeit am Lehrstuhl für Mikrobiologie über „Untersuchungen zur Interaktion von Wirtszellproteinen mit Virulenzfaktoren von *Listeria monocytogenes*“.

09/1996 Diplomprüfung

Promotion:

11/1996 - 05/2000 am Lehrstuhl für Mikrobiologie der Universität Würzburg über „Interaktion des Proteins ActA von *Listeria monocytogenes* mit dem Wirtszellprotein LaXp180“.