
BAYERISCHE JULIUS-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT WÜRZBURG

FAKULTÄT FÜR BIOLOGIE

LEHRSTUHL FÜR MIKROBIOLOGIE



**Einfluss niedermolekularer Protein-Tyrosin-Phosphatasen von
Listeria monocytogenes auf die listerielle Genexpression und
Virulenz**

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

vorgelegt von

Barbara Gareiß

aus Stuttgart

Würzburg, 2006

Eingereicht am:

02. August 2006

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender:

Prof. Dr. M. Müller

1. Gutachter:

Prof. Dr. Jürgen Kreft

2. Gutachter:

Prof. Dr. Roland Benz

Tag des Promotionskolloquiums:

17. Oktober 2006

Doktorurkunde ausgehändigt am:

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

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

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

Würzburg,

Der experimentelle Teil dieser Arbeit wurde von August 2002 bis Mai 2006 am Lehrstuhl für Mikrobiologie (Prof. W. Goebel) am Theodor-Boveri-Institut für Biowissenschaften der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg durchgeführt.

VIELEN DANK!

Mein herzlicher Dank geht an Herrn Prof. Dr. Jürgen Kreft für die ausgezeichnete Betreuung dieser Arbeit und das herzliche Arbeitsklima in seiner Arbeitsgruppe. Seine ständige Hilfsbereitschaft und Unterstützung haben erheblich zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen.

Vielen Dank auch an Herrn Prof. Benz für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Prof. Werner Goebel für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes sowie die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit.

Ein herzliches Dankeschön gilt auch „SiWe“ (Silke Fregin) und Victor Weidmann für die herzliche Atmosphäre im Labor und die Mithilfe bei zahlreichen Versuchen. Ein Dankeschön geht auch an Nicolai Ondrusch, der diese Arbeit teilweise fortführen wird.

Danke auch an alle übrigen Mitarbeiter des Lehrstuhls für die Unterstützung und das angenehme Arbeitsklima.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Biju Joseph für die Hilfe bei den Microarray-Experimenten, bei Andrea Spory und Jenni Schär für die Unterstützung bei den 2D-Gel-Versuchen, bei Stefanie Müller-Altrock und Norman Mauder für die Anleitung und Hilfe bei der Affinitätschromatographie und schließlich bei unseren beiden „Spülfrauen“ Frau Steinbrecher und Frau Stapf. Ohne sie wäre das Arbeiten am Lehrstuhl ungleich schwerer.

Nicht unerwähnt bleiben sollen hier auch Stefanie Link und Alexa Frentzen für die „Unterhaltung zwischendurch“. Ein herzlicher Dank geht auch an Eleonore Appel für die Organisation diverser Vertragsverlängerungen und vieles mehr.

Ein ganz besonderer Dank geht an meine Familie, insbesondere an meine Eltern für die Unterstützung während des gesamten Studiums und für ihr immer währendes Interesse für meine Arbeit.

Mein tiefster Dank gilt Martin, der mich in allen Phasen dieser Arbeit unermüdlich unterstützt und immer wieder aufs Neue – besonders in der Endphase der Arbeit - aufgemuntert und motiviert hat.

Inhaltsverzeichnis

Zielsetzung	1
1 Zusammenfassung	2
Summary	6
2 Einleitung	9
2.1 Motivation zur Arbeit mit und Erforschung von <i>Listeria</i>	9
2.2 Allgemeine Mikrobiologie der Gattung <i>Listeria</i>	9
2.3 Pathogenese	10
2.4 Infektionszyklus und Virulenzfaktoren von <i>L. monocytogenes</i>	11
2.4.1 Eindringen in die Wirtszelle	13
2.4.2 Überleben im Phagosom	17
2.4.3 Vermehrung und Verbreitung im Cytoplasma	19
2.4.4 Zell-zu-Zell-Ausbreitung	21
2.4.5 Organisation der Virulenzgene von <i>L. monocytogenes</i>	22
2.4.6 Kontrolle der Virulenzgene durch PrfA	23
2.5 Protein-Tyrosin-Phosphatasen bei Prokaryonten – eine Einführung	27
2.5.1 Prokaryontische Protein-O-Kinasen	28
2.5.2 Prokaryontische Protein-O-Phosphatasen	29
2.5.3 Protein-Tyrosin-Phosphatasen in <i>Listeria monocytogenes</i>	32
3 Material	35
3.1 Geräte	35
3.2 Verbrauchsmaterial	35
3.3 Medien und Agarplatten	36
3.4 Antibiotika	36
3.5 Bakterienstämme	36
3.6 Plasmide	37
3.7 Oligonukleotide	37
3.8 Größen- und Molekulargewichtsstandards	39
3.9 Kits	40
4 Methoden	41
4.1 Molekulargenetische Methoden	41
4.1.1 Isolierung chromosomaler DNA aus <i>Listeria</i>	41
4.1.2 Isolierung von Plasmid-DNA	41
4.1.3 Herstellung von Bakterien-Zelllysat	41

4.1.4	Reinigung von DNA-----	42
4.1.5	Konzentrationsbestimmung chromosomaler DNA -----	42
4.1.6	Elektrophoretische Auftrennung von DNA -----	42
4.1.7	Polymerase Chain Reaction (PCR) -----	43
4.1.8	Restriktionsverdau von DNA -----	46
4.1.9	Ligation von DNA-Fragmenten-----	47
4.1.10	Transformation in <i>E. coli</i> -----	47
4.1.11	Elektroporation in Listerien (140) -----	49
4.1.12	Mutagenese durch homologe Rekombination (192) -----	49
4.1.13	Herstellung von Glycerinkulturen-----	50
4.1.14	Isolierung von RNA aus <i>Listeria</i> -----	51
4.1.15	Konzentrationsbestimmung von RNA-----	51
4.1.16	Reverse Transkription und PCR mit cDNA -----	52
4.1.17	Reverse Transkription von RNA für Microarray-Experimente -----	52
4.1.18	Gesamttranskriptionsprofilierung durch Microarray-Technologie -----	53
4.2	Proteinbiochemische Methoden -----	54
4.2.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) -----	54
4.2.2	Western Blot-----	55
4.2.3	Overlay Blot Assay-----	56
4.2.4	Gewinnung von Gesamtzellproteinen-----	56
4.2.5	Proteinbestimmung nach Bradford-----	57
4.2.6	Überproduktion von Proteinen mit dem IPTG-induzierbaren pQE30- -----	57
4.2.7	Affinitätschromatographie mittels ÄKTA™prime -----	58
4.2.8	Zweidimensionale Proteingelelektrophorese -----	60
4.2.9	Auftrennung der Proteine in der zweiten Dimension durch SDS- -----	61
4.2.11	Proteinfärbung mit kolloidalem Coomassie -----	64
4.2.12	Analyse der 2D-Gele-----	64
4.3	Arbeiten mit Bakterien -----	65
4.3.1	Wachstumskurven -----	65
4.3.2	Wachstum unter Stressbedingungen -----	65
4.3.3	Empfindlichkeit gegenüber Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)-----	65
4.3.4	Motilitätstest-----	66
4.4	Zellkultur -----	66
4.4.1	Herstellung von Bakterienaliquots -----	67
4.4.2	Auftauen und Einfrieren eukaryontischer Zellen (53)-----	67
4.4.3	Subkultivierung eukaryontischer Zellen -----	68

4.4.4	Bestimmung der Lebendzellzahl (LZZ) -----	68
4.4.5	Invasionsassay von <i>L. monocytogenes</i> in Caco-2-Zellen -----	68
4.4.6	Untersuchung der frühen Assoziation von Bakterien mit Wirtszellen -----	70
5	Ergebnisse -----	71
5.1	Versuche zur Replikation der Phosphatase-Mutanten $\Delta ptp-1$, $\Delta ptp-2$ und $\Delta ptp-1/2$ in BHI-Medium unter verschiedenen Bedingungen -----	71
5.2	Versuche zur Assoziation, Invasion und intrazellulärer Replikation in Caco-2- Epithelzellen -----	72
5.2.1	Invasion und intrazelluläre Replikation -----	72
5.2.2	Versuch zur frühen Assoziation an Caco-2-Zellen -----	74
5.3	Gesamttranskriptionsprofilierung mittels DNA-Microarrays -----	75
5.4	Vergleich der „in vitro“ Expression verschiedener durch Ptp-1 bzw. Ptp-2 regulierter Gene mittels Realtime-RT-PCR -----	80
5.4.1	Vergleich der Transkription der PrfA-abhängigen Virulenzgene (LIPI-1) -----	81
5.4.2	Vergleich der Transkription der Internaline -----	83
5.4.3	Vergleich der Transkription verschiedener durch die Microarray-Experimente identifizierter Zielgene der PTPs -----	86
5.5	Motilitätstest der <i>ptp</i> -Mutanten auf Weichagar -----	89
5.6	Vergleich der „in vivo“ Expression verschiedener durch Ptp-1 bzw. Ptp-2 regulierter Gene mittels Realtime-RT-PCR -----	91
5.6.1	Vergleich der Transkription von <i>ptp-1</i> und <i>ptp-2</i> -----	91
5.6.2	Vergleich der intrazellulären Transkription der PrfA-abhängigen Virulenzgene (LIPI-1) -----	91
5.6.3	Vergleich der intrazellulären Transkription der Internaline -----	93
5.6.4	Vergleich der intrazellulären Transkription der Gene <i>lmo0554</i> , <i>0555</i> , <i>0722</i> , <i>0723</i> , <i>0782</i> , <i>0783</i> , <i>0784</i> , <i>1421</i> , <i>1433</i> sowie <i>opuCABCD</i> -----	95
5.6.5	Vergleich der intrazellulären Transkription von <i>ptp-1</i> und <i>ptp-2</i> -----	98
5.6.6	Vergleich der intrazellulären Transkription von <i>rsbR</i> und <i>rsbW</i> -----	99
5.6.7	Vergleich der Expression von <i>ptp-1</i> und <i>ptp-2</i> unter dem Einfluss von SigB und PrfA -----	100
5.7	<i>In silico</i> Analyse der Promotorregionen der durch Ptp-1 bzw. Ptp-2 regulierten Gene -----	101
5.8	Gesamtproteomprofilierung mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese -----	102
5.8.1	Vergleich des Proteoms von <i>L. monocytogenes</i> EGDe WT und $\Delta ptp-1$ -----	102
5.8.2	Vergleich des Proteoms von <i>L. monocytogenes</i> EGDe WT und $\Delta ptp-2$ -----	103
5.8.3	Vergleich des Proteoms von <i>L. monocytogenes</i> EGDe WT und $\Delta ptp-1/2$ -----	103

5.9	Überexpression und Aufreinigung von Ptp-1 und Ptp-2 -----	106
5.9.1	Aufreinigung von Ptp-1 -----	107
5.9.2	Aufreinigung von Ptp-2 -----	108
6	Diskussion -----	109
6.1	Versuche zur Replikation der Phosphatase-Mutanten $\Delta ptp-1$, $\Delta ptp-2$ und $\Delta ptp-1/2$ in BHI-Medium unter verschiedenen Stressbedingungen -----	109
6.2	Assoziation, Invasion und intrazelluläre Replikation in Caco-2-Epithelzellen -----	109
6.3	Gesamttranskriptionsprofilierung mittels DNA-Microarrays -----	110
6.4	Vergleich der Expression ausgewählter durch Ptp-1 bzw. Ptp-2 regulierter Gene	111
6.5	Vergleich der Proteinprofile -----	118
6.6	Mögliche Wechselwirkungen zwischen Ptp-1 und Ptp-2 -----	120
6.7	Überexpression und Aufreinigung von Ptp-1 und Ptp-2 als His-Tag-Fusionsproteine -----	121
7	Literaturverzeichnis -----	122
8	Anhang -----	133
8.1	Chromosomale Organisation von Ptp-1 -----	133
8.2	Proteinsequenz Ptp-1 -----	133
8.3	Chromosomale Organisation von Ptp-2 -----	133
8.4	Proteinsequenz Ptp-2 -----	134
8.5	Abkürzungen -----	134
9	Lebenslauf -----	137

Zielsetzung

Im Rahmen des „*Listeria* genome sequencing projects“ konnten zwei Gene für niedermolekulare Protein-Tyrosin-Phosphatasen (LMW-PTPs) identifiziert werden. Diese sind an unterschiedlichen Stellen des Genoms von *Listeria monocytogenes* lokalisiert. Für verschiedene PTPs existieren Hinweise auf eine Beteiligung am Virulenzgeschehen (9, 18, 108, 137, 168). LMW-PTPs gram-negativer Bakterien sind an der Synthese und dem Export von Exopolysacchariden beteiligt und somit auch an der Vermittlung des Wirtszellkontakts. Einige andere PTPs werden in die Wirtszelle transportiert und treten dort in Wechselwirkung mit Proteinen der Signaltransduktionskaskade der Wirtszelle.

Die in *L. monocytogenes* identifizierten LMW-PTPs könnten somit für diese Bakterienart als Virulenzfaktoren dienen.

Im Rahmen der Diplomarbeit von Petra Herrmann wurden Deletionsmutanten der beiden einzelnen Genloci sowie eine Doppelmutante mit Deletionen in beiden Genloci hergestellt. Alle drei Mutanten erwiesen sich als lebensfähig. Die Charakterisierung der Mutanten hinsichtlich des Einflusses der Deletionen auf den Verlauf der Infektion von humanen HepG2-Leberepithelzellen zeigte, dass die Invasivität der Mutanten im Vergleich zum Wildtyp deutlich herabgesetzt ist. Man nimmt an, dass die Mutationen vor allem den eigentlichen Invasionsvorgang negativ beeinflussen, wobei hier bezüglich Adhäsion und Invasion wenigstens teilweise dieselben Faktoren beteiligt sein könnten.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten die Auswirkungen der Mutationen sowohl auf der Transkriptions- als auch auf der Proteinebene näher charakterisiert werden. Zudem sollten die beiden Proteine Ptp-1 und Ptp-2 mittels His-Tag aufgereinigt und hinsichtlich Interaktionen untersucht werden.

1 Zusammenfassung

Einfluss niedermolekularer Protein-Tyrosin-Phosphatasen von *Listeria monocytogenes* auf die listerielle Genexpression und Virulenz

Listerien sind weit verbreite Umweltkeime. Die Krankheitserreger unter ihnen, vor allem *L. monocytogenes*, gelangen über kontaminierte Nahrungs- oder Futtermittel in den Verdauungstrakt von Mensch und Tier und können das vielgestaltige Krankheitsbild einer „Listeriose“ verursachen. Neben ihrer Bedeutung als Lebensmittelkontaminanten sind die krankheitserregenden Vertreter der Gattung, vor allem *L. monocytogenes*, weltweit bearbeitete Modellorganismen für die Gruppe fakultativ intrazellulärer Pathogene. Die meisten der Virulenzfaktoren pathogener Listerien, vor allem die des „PrfA-abhängigen Virulenz-Genclusters LIPI-1“, konnten bereits eingehend charakterisiert werden. Eindeutig ist die Transkription der LIPI-1 Gene entscheidend von der Expression und Aktivität des PrfA-Regulatorproteins abhängig. Jedoch sind bezüglich der Expressions- und Aktivitätsregulation dieser und vieler weiterer Virulenzfaktoren noch viele Fragen offen.

Mittlerweile ist gesichert, dass die reversible Phosphorylierung/Dephosphorylierung von Proteinen nicht nur bei Eukaryonten, sondern auch bei Prokaryonten ein zentraler Mechanismus zur Steuerung von Proteinaktivitäten ist. Aufgrund ihrer chemischen Reaktivität sind dabei vor allem Serin-, Threonin-, Histidin-, Aspartat- sowie Tyrosin-Reste in Proteinen betroffen. Bakterielle Protein-Tyrosin-Phosphatasen dienen – ebenso wie ihre eukaryontischen Gegenstücke – zusammen mit den entsprechenden Proteinkinasen, der Aktivitätsregulation von Enzymen, aber auch von Transkriptionsfaktoren usw. Niedermolekulare (d. h. Molekulargewicht 15-17 kDa) Protein-Tyrosin-Phosphatasen (LMW-PTPs) sind nachweislich bei verschiedenen Bakterien an der Produktion und am Export von Exopolysacchariden beteiligt, die auch als Virulenzfaktoren dienen können. LMW-PTPs findet man sowohl bei *Bacteria* als auch bei *Archaea*. Zu den charakterisierten Proteinen dieser Art zählen PtpA von *Streptomyces coelicolor* und Ptp von *Acinetobacter johnsonii*. Vor allem bei gram-negativen Mikroorganismen ist eine Regulation der Zusammensetzung der Polysaccharidkapsel durch ein Autokinase-PTP-Paar konserviert, dies konnte auch bei dem gram-positiven *Staphylococcus aureus* beobachtet werden. Auch in *Bacillus subtilis* existieren zwei LMW-PTPs (YwIE und YfkJ), die jedoch an der Resistenz gegen Ethanol und somit wohl allgemein an der Stressantwort beteiligt sind. Beide Bakterienarten sind phylogenetisch mit Listerien verwandt.

Niedermolekulare Tyrosin-Phosphatasen sind folglich auch in gram-positiven Bakterien an Signaltransduktions- und Transportprozessen beteiligt. Unbekannt war, ob sie auch eine Rolle in der Expression von Virulenz-assoziierten Genen (z.B. für Zell-Zell-Kontakt, Replikation in Wirtszellen, Motilität, Stress-Antwort usw.) in dem Human- und Tierpathogen *L. monocytogenes* spielen.

Im Rahmen des „*Listeria* Genome Sequencing Projects“ wurden bei *L. monocytogenes* EGDe zwei, auf dem Genom weit voneinander entfernte, Gene identifiziert, die für niedermolekulare PTPs codieren: *ptp-1* (Imo0938) und *ptp-2* (Imo2540). Im Rahmen einer Diplomarbeit wurden von Petra Herrmann (dieser Lehrstuhl) Einfach- bzw. Doppel-Deletionsmutanten in den genannten Genen hergestellt und mit deren vorläufiger Charakterisierung begonnen.

In der vorliegenden Arbeit wurden diese Mutanten eingehend charakterisiert, vor allem hinsichtlich des Einflusses der Mutationen auf bakterielle Invasion in eukaryontische Wirtszellen, Vermehrung darin, die generelle und spezifische Genexpression (Transkription und Proteinsynthese) „*in vitro*“ und „*in vivo*“, sowie auf Motilität.

Wachstumsuntersuchungen sowohl in nährstoffreichen BHI-Medium (Brain Heart Infusion) als auch in Minimalmedium hatten in vorhergehenden Untersuchungen keinen Unterschied in der Replikation zwischen *L. monocytogenes* EGDe Wildtyp (WT) und den Mutanten Δ *ptp-1*, Δ *ptp-2* und Δ *ptp-1/2* ergeben. Infektionsversuche zur Ermittlung des Adhäsionspotentials der Mutanten ergaben eine abgeschwächte Adhärenz und Invasion der *ptp*-Mutanten, was mit dem negativen Einfluss der *ptp*-Mutation auf die Internalin-Expression (Internaline sind listerielle Oberflächenproteine, welche die bakterielle Aufnahme in nicht-phagocytische Wirtszellen ermöglichen) übereinstimmt (s. u.).

Mittels Hybridisierung von cDNA (d. h. einer Repräsentation der unter den jeweiligen Bedingungen bzw. in WT oder Mutanten transkribierten mRNA) an DNA-Microarrays, welche molekulare Sonden für das gesamte *L. monocytogenes*-Genom umfassten, wurde nach Zielgenen gesucht, deren Transkription durch die beiden Phosphatasen beeinflusst wird. Durch diese erste „globale“ Analyse wurden die Gene eingegrenzt, welche i) signifikant reguliert waren und gleichzeitig ii) für bakterielle Replikation und/oder Virulenz wichtig sein könnten. Das Transkriptionsprofil der betreffenden Gene wurde dann durch die spezifischere Methode der „quantitativen Real Time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (qRT-PCR)“ verifiziert. Dies sowohl „*in vitro*“ (d. h. nach Wachstum in BHI Medium) als auch „*in vivo*“ (d. h. nach Infektion von für *Listeria* auch im natürlichen Infektionsverlauf wichtigen eukaryontischen Wirtszellen, Caco-2 Darmepithelzellen).

Die Haupt-Ergebnisse waren:

In Microarray-Analysen erwiesen sich die Gene der Internalin-Gruppe *inA*, *inB*, *inC*, *inG*, *inH* und *inE* als Ptp-reguliert, d.h. meist abgeschwächt in den Mutanten.

Die Transkription der Gene des „PrfA-abhängigen Virulenz-Genclusters LIPI-1 (*plcA*, *prfA*, *hly*, *mpl*, *actA*, *plcB*)“ erfolgt – außer für *prfA* selbst – *in vitro* in den *ptp*-Mutanten stärker als im Wildtyp. Es ist jedoch bekannt, dass hierfür nicht nur die Transkription des *prfA*-Gens, sondern auch die Aktivität des PrfA-Proteins wichtig ist. *In vivo* lässt sich nur für das wichtige *plcA*-Gen eine deutliche Transkriptionssteigerung in den *ptp*-Mutanten zeigen. Die übrigen LIPI-1 Gene zeigen nur eine geringfügig erhöhte Transkription im Vergleich zum Wildtyp. Dies zusammen könnte den Phänotyp der *ptp*-Mutanten, d.h. verringerte Invasivität, aber normale intrazelluläre Vermehrung, erklären.

Weiterhin zeigten sich die Gene für ein Mannose-spezifisches PTS-System (Imo0781 bis Imo0784), die Gene für den OpuC-Transporter (*opuCABCD*) sowie die Gene Imo0554, *dtpT* (Imo0555, als Di-, Tri-Peptid-Transporter annotiert), Imo0722, *mcp* (Imo0723, ein essentielles Chemotaxis-Protein), Imo1421 (*opuBA*) und Imo1433 als Ptp-reguliert.

Die abgeschwächte Expression von *MCP* (*methyl accepting chemotaxis protein*) in den *ptp*-Mutanten verursacht eine im Vergleich zum Wildtyp deutlich reduzierte Beweglichkeit, wie ein Motilitätstest auf Weichagar ergab. So zeigte sich der Wildtyp im Schwimmtest sowohl bei 24°C als auch bei 37°C beweglich, wohingegen die Mutanten immer unbeweglich waren.

Transkriptionsuntersuchungen mittels der spezifischeren Methode der qRT-PCR ergaben, dass alle aufgeführten Gene – mit Ausnahme von *inC*, *inG* und *inE* – *in vitro* in den untersuchten Deletionsmutanten zum Teil deutlich schwächer transkribiert wurden als im Wildtyp. *In vivo* konnte für *inA*, *inB* und *inC* eine Transkriptionssteigerung in den Mutanten und für *inG*, *inH* und *inE* eine verringerte Transkription gemessen werden. Alle übrigen Gene (Imo0554, *dtpT*, Imo0722, *MCP*, Imo0782, Imo0783, Imo0784, Imo1421, Imo1433 sowie *opuCABCD*) wurden *in vivo* in den *ptp*-Mutanten deutlich schwächer transkribiert als im Wildtyp. Die verringerte Transkription des Osmoprotektant-Transporters *opuCABCD* korrelierte jedoch erstaunlicherweise phänotypisch nicht mit verringerter Stress-Resistenz.

Da nicht nur Gen-Transkription, sondern vor allem auch Translation und somit die Menge eines Proteins für den physiologischen Zustand einer Zelle entscheidend sind, wurden die Transkriptionsprofile mit Proteinprofilen korreliert:

Durch vergleichende Proteom-Analysen mittels 2D-Gelelektrophorese konnten spezifische Stoffwechselproteine (PflA, Imo1254, Imo0722, Imo0913, Imo2695, Imo0539, Imo1437, Imo2067, Imo0669, Imo2205), der ABC-Transporter OpuCA, Regulatoren der Aktivität des Stress-Sigma-Faktors SigB (RbsR und RsbW), sowie zwei Proteine unbekannter Funktion (SepA, Imo0799) als unter „steady state“ Bedingungen und auf Proteinebene als Ptp-reguliert identifiziert werden. Die physiologische Bedeutung der teilweisen Unterschiede zwischen Gentranskription und Proteinmenge bedarf sicher weiterer Untersuchungen.

Wie eingangs erwähnt, stehen die essentiellen Virulenzfaktoren von *L. monocytogenes* bekannter Maßen primär unter der Kontrolle des Transkriptionsaktivators PrfA. Weiterhin wurde in mehreren Untersuchungen von anderer Seite ein Einfluss des Stress-Sigmafaktors SigB nachgewiesen.

Hier konnte gezeigt werden, dass die Transkription von *ptp-1* und *ptp-2* in isogenen *sigB*-Mutanten erhöht, in *prfA*-Mutanten dagegen erniedrigt ist. Im Promoterbereich von *ptp-1* bzw. *ptp-2* konnten jedoch keine Bindungsmotive für PrfA („PrfA-Boxen“), wohl aber solche für SigB identifiziert werden. Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass die *ptp*s Teil eines sehr komplexen und noch weitgehend unverstandenen Regulationsnetzwerks in *L. monocytogenes* sind.

Bemerkenswert war in allen Untersuchungen, dass die Deletion nur eines der beiden *ptp*-Gene (sowie die Doppel-Deletion) im Wesentlichen (d. h. im Rahmen der experimentellen

Schwankungsbreite) den gleichen Einfluss auf die Genexpression zeigte. Die einfachste Erklärung, nämlich dass Deletion eines der *ptp*-Gene die Expression des zweiten Gens blockiert, konnte ausgeschlossen werden.

Daher ist eine physikalisch/funktionelle Interaktion der beiden Ptp-Proteine anzunehmen. Zur Klärung dieser Frage wurden Ptp-1 und Ptp-2 als His-Tag-Fusionsproteine in *E. coli* überexprimiert und aufgereinigt, gefolgt von der Generierung entsprechender Antikörper. Erste Bindungsstudien mittels eines so genannten „Overlay Blots“ ergaben tatsächlich eine Interaktion zwischen Ptp-1 und Ptp-2, was die oben erwähnte, vernünftige Hypothese bestätigt. Hier sind jedoch noch weitere Untersuchungen erforderlich.

Summary

Influence of low molecular weight protein tyrosine phosphatases of *L. monocytogenes* on listerial gene expression and virulence

Listeriae are widely spread environmental bacteria. The pathogens among them, particularly *L. monocytogenes*, via contaminated food or feeds reach the digestive tract of humans and animals and can cause the multiform disease listeriosis. Apart from its relevance as food contaminants the disease-causing representatives – especially *L. monocytogenes* – are model organisms for the group of facultative intracellular pathogens. Most virulence factors of pathogenic *Listeria*, above all those of the “PrfA-dependent virulence gene cluster LIPI-1” could be characterized in detail so far. The transcription of the LIPI-1 genes is definitely dependent on the expression and activity of the PrfA regulator protein. However there are still many questions concerning the regulation of expression and activity of these and many other virulence factors. Meanwhile it is accepted that reversible phosphorylation / dephosphorylation of proteins is a central mechanism for the control of protein activities both in eukaryotes and in prokaryotes. Due to their chemical reactivity, serine, threonine, aspartate, histidine and tyrosine residues in proteins are affected hereby. Bacterial protein tyrosine phosphatases mediate – as well as their eukaryotic counterparts – together with their corresponding protein kinases the activity regulation of enzymes and of transcription factors etc. Low molecular weight (i.e. molecular weight of 15-17 kDa) protein tyrosine phosphatases (LMW-PTPs) are involved in production and export of exopolysaccharides – also serving as virulence factors - of different bacteria. One can find LMW-PTPs in *Bacteria* as well as in *Archaea*. Among the characterized proteins of this kind are PtpA of *Streptomyces coelicolor* and Ptp of *Acinetobacter johnsonii*. Particularly within gram negative organisms a regulation of the composition of the polysaccharide capsule is conserved by a autokinase/PTP pair, also observed in the gram-positive *Staphylococcus aureus*. In *Bacillus subtilis* there are also two LMW-PTPs (YwlE and YfkJ), which are involved in resistance against ethanol, being part of the general stress response. Both bacterial species are phylogenetically related to *Listeria*.

Low molecular weight protein tyrosine phosphatases are therefore involved in signal transduction and transport processes also in gram-positive bacteria. It was unknown whether they also play a role in the expression of virulence associated genes (e.g. cell-to-cell spread, replication within host cells, motility, stress response etc.) in the human and animal pathogen *L. monocytogenes*.

As a result of the “*Listeria* Genome Sequencing Project” two genes, located far away from each other on the genome, were identified that encode for low molecular weight protein tyrosine phosphatases: *ptp-1* (lmo0938) and *ptp-2* (lmo2540). In the context of her diploma thesis Petra Herrmann constructed single and double deletion mutants in the mentioned genes and started with their characterization.

In the present work, these mutants were characterized much more in detail, especially regarding the influence of these mutations on bacterial invasion in eukaryotic host cells, intracellular replication, the general and specific gene expression (transcription and protein synthesis) *in vitro* and *in vivo*, as well as their motility.

Growth analysis in preceding investigations both in nutrient-rich BHI medium (Brain Heart Infusion) and in minimal medium showed no differences in replication between *L. monocytogenes* EGDe wild type (WT) and the mutants $\Delta ptp-1$, $\Delta ptp-2$ und $\Delta ptp-1/2$. Infection studies for the determination of the adhesion potential of the mutants showed a decreased adherence and invasion of the *ptp* mutants, representing the negative influence of the *ptp* mutants on the expression of internalins (internalins are listerial surface proteins, which allow the bacterial uptake into non-phagocytic host cells) (see below).

By hybridization of cDNA (i.e. a representation the mRNA transcribed under the respective conditions and/or in WT versus mutants) to DNA microarrays - containing molecular probes for the whole genome of *L. monocytogenes* – genes were identified whose transcription is affected by the two phosphatases. By this first "global" analysis genes have been filtered out that i) were significantly regulated and ii) could be essential for bacterial replication and/or virulence. Afterwards the transcription profiles of the respective genes have been verified by the more specific method of "quantitative Real Time Reverse Transcription PCR (qRT-PCR)" – both "*in vitro*" (i.e. after growth in BHI medium) and "*in vivo*" (i.e. after infection of Caco-2 epithelial cells of the intestine, which are also important for the natural infection process of *Listeria*).

The main results were:

Microarray analysis of the genes of the internalin group proved to be regulated by the *ptp*s, i.e. usually alleviated within the mutants.

In vitro transcription of the "PrfA dependent virulence gene cluster LIPI-1 (*plcA*, *prfA*, *hly*, *mpl*, *actA*, *plcB*) occurred – except *prfA* itself – stronger in the *ptp* mutants than in the wild type. It is, however, well-known that not only the transcription of the *prfA* gene but also the activity of the PrfA protein are important. *In vivo*, a stronger transcription could only be shown for the *plcA* gene in the *ptp* mutants. All other LIPI-1 genes only showed a faint increased transcription compared to the wild type. Taken together, all results could explain the phenotype of the *ptp* mutants, i.e. the reduced invasiveness but normal intracellular replication.

Furthermore the genes for the mannose-specific PTS system (lmo0781 to lmo0784), the genes for the *opuC* transporter (*opuCABCD*) as well as the genes lmo0554, *dtpT* (lmo0555, annotated as a di-tripeptide transporter), lmo0722, *mcp* (lmo0723, an essential chemotaxis protein), lmo1421 and lmo1433 were *ptp*-regulated.

The decreased expression of MCP (*methyl accepting chemotaxis protein*) in the *ptp* mutants causes a reduced motility in comparison to the wild type – as shown by motility assays on soft agar. The wild type appeared to be motile in the swimming test both at 24°C and at 37°C, whereas the mutants remained immotile.

Transcriptional analysis by means of the more specific method of “quantitative Real time RT-PCR” (qRT-PCR) showed that all of the listed genes – except *inC*, *inG* and *inE* – were partially transcribed weaker in the mutants than in the wild type. While the transcription of *inA*, *inB* and *inC* was enhanced, the transcription of *inG*, *inH* and *inE* was reduced *in vivo*. All remaining genes (Imo0554, *dtpT*, Imo0722, *mcp*, Imo0782, Imo0783, Imo0784, Imo1421, Imo1433 as well as *opuCABCD*) were *in vivo* clearly more weakly transcribed in the *ptp* mutants than in the wild type. Surprisingly the reduced transcription of the *opuC* gene did phenotypically not correlate with a reduced salt stress resistance.

Since not only gene transcription, but primarily also translation and therefore the amount of a protein are crucial for the physiological state of a cell, the transcription profiles were correlated with protein profiles:

Specific metabolism proteins (PflA, Imo1254, Imo0722, Imo0913, Imo2695, Imo0539, Imo1437, Imo2067, Imo0669, Imo2205), the ABC transporter OpuCA, regulators of the activity of the stress sigma factor SigB (RbsR and RsbW), as well as two proteins of unknown function (SepA, Imo0799) could be identified by comparative proteome (under “steady” state conditions) analyses by 2-D gel electrophoresis as Ptp-regulated. Definitely the physiological relevance of the partial differences between gene transcription and protein amount needs further investigations.

As mentioned at the beginning, the essential virulence factors of *L. monocytogenes* are known to be primarily under the control of the transcriptional activator PrfA. Furthermore an influence of the stress sigma factor SigB was proved in several investigations by others.

Here it could be shown that the transcription of *ptp-1* and *ptp-2* is increased in an isogenic *sigB* mutant, but is reduced in the context of *prfA* mutants. The promoter regions of *ptp-1* and respectively *ptp-2* do not contain a binding motif for PrfA (“*prfA* boxes”) but they exhibit binding sites for SigB. Taken together these results show, that the Ptps are part of a complex and largely not understood regulation network in *L. monocytogenes*.

It was noteworthy in all investigations that the deletion of only one of the two *ptp* genes (as well as the double deletion) basically showed the same influence on gene expression (i.e. within the normal experimental variation). The easiest explanation, namely that deletion one of the *ptp* genes blocks the expression of the second gene could be excluded.

Hence, a physical / functional interaction of both Ptp proteins is assumed. To elucidate this, Ptp-1 and Ptp-2 were over expressed as His-tagged fusion proteins in *E. coli*, purified and followed by the generation of specific antibodies. First binding studies by the means of a so-called “overlay blot” exhibited an interaction between Ptp-1 and Ptp-2 what confirms the reasonable hypothesis mentioned above. Nevertheless, other investigations are necessary here.

2 Einleitung

2.1 Motivation zur Arbeit mit und Erforschung von *Listeria*

Bakterien der Gattung *Listeria* besitzen eine weite Verbreitung im Umfeld des Menschen und können durch Lebensmittel übertragen werden. Sie halten und vermehren sich gut auf feuchten, abgestorbenen, aber auch auf lebenden Pflanzen und sind ebenso in verdorbenem Silofutter zu finden. Besonders Milchprodukte sowie Salat und Rohgemüse sind häufig mit Listerien kontaminiert. Allerdings gehört die weit überwiegende Anzahl der vorhandenen Listerien zu den apathogenen Arten.

Auch Tiere nehmen Listerien auf und beherbergen sie in ihrem Darm, von wo sie wieder in die Umgebung weitergegeben werden können. Tierische Produkte wie Milch und Fleisch können daher sowohl fäkal als auch über die Umwelt kontaminiert sein.

Die Kontamination anderer Lebensmittel kann auf verschiedenen Stufen der Lebensmittelgewinnung und –Bearbeitung erfolgen. Normalerweise werden Listerien z.B. beim Pasteurisieren abgetötet, jedoch können sich bei mangelnder Hygiene nach der Wärmebehandlung erneute Kontaminationsmöglichkeiten ergeben.

Die Weltgesundheitsorganisation WHO stellte in einem Bericht des Jahres 1997 fest, dass von insgesamt 52 Millionen verstorbenen Personen des Jahres 1996 ca. 33% durch Infektionskrankheiten umgekommen sind. Damit rangieren Infektionskrankheiten noch vor Herz-Kreislauf-Erkrankungen als Todesursache. Erreger sind eukaryontische Protozoen und Pilze, subzelluläre Objekte wie Prionen, Viroide und Viren, metazoische Tiere wie Helminthen und Arthropoden und prokaryontische Bakterien.

Die Inzidenz der Listeriose liegt weltweit bei ca. 6/106/Jahr (45, 110). Allerdings werden in Deutschland nur konnatale Listeriosen und meningitidische Verlaufsformen erfasst. 5-10% der Normalbevölkerung sind gesunde Träger, bei denen der Erreger im Stuhl nachgewiesen werden kann. Die Mortalitätsrate von 30% (67) und das Risiko für immunsupprimierte Personen machen auf *L. monocytogenes* aufmerksam und rechtfertigen eine intensive Forschung am Virulenzverhalten und der Pathogenese von *L. monocytogenes*.

2.2 Allgemeine Mikrobiologie der Gattung *Listeria*

Listerien kommen in der Natur ubiquitär vor und können daher sowohl aus Pflanzenmaterial, Wasser- und Bodenproben isoliert werden, sind aber auch im Gastrointestinaltrakt des Menschen und verschiedener Tiere (Schaf, Ziege) zu finden.

Ungefähr 10% der Bevölkerung tragen *Listeria monocytogenes* als Bestandteil ihrer Darmflora, ohne dass dies zu Beeinträchtigungen ihrer Gesundheit führt (63). Als natürliches Habitat gilt heute verfaulendes Pflanzenmaterial, wo *Listeria* spp. saprophytisch lebt (45, 75, 165, 180).

Listerien werden morphologisch als stäbchenförmig beschrieben, besitzen die typische Zellwand gram-positiver Bakterien und sind nicht zur Sporenbildung befähigt. Ihre Energiegewinnung erfolgt fakultativ anaerob. Die Bakterien sind durch ihre peritriche Begeißelung zu einer charakteristischen Beweglichkeit bei Wachstum in Temperaturbereichen von 20 bis 25°C befähigt. Bei optimalen Wachstumstemperaturen von 30 – 37°C ist die Flagellinproduktion stark reduziert und es lässt sich keine Bewegung mehr feststellen (141, 163).

Die Gattung *Listeria* umfasst derzeit sechs Arten: Die zu den pathogenen Keimen zählenden Arten *L. monocytogenes* und *L. ivanovii*, und als nicht pathogene Vertreter *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri* und *L. grayi*. *L. monocytogenes* gilt als potentieller Krankheitserreger für Mensch und Tier, wohingegen *L. ivanovii* bis auf Einzelfälle ausschließlich tierpathogen ist. Beide Spezies gehören zu den fakultativ intrazellulären Bakterien, die in der Lage sind eukaryontische Wirtszellen zu infizieren und sich in diesen zu vermehren. Als nächste Verwandte der Gattung *Listeria* sind die Gattungen *Bacillus* und *Brochothrix* zu nennen. Die Gattung *Listeria* zeigt charakteristische biochemische (Fermentation verschiedener Zucker, Säurebildung) und hämolytische Eigenschaften, die eine Klassifizierung ermöglichen (26, 165). Listerien sind in der Lage extreme Umweltbedingungen zu tolerieren. Sie können in einem Temperaturbereich von –0,4°C bis 50°C (78, 186), bei NaCl-Konzentrationen bis 10% und bei pH-Werten von 5,5 bis 9,6 wachsen. Sie überleben sogar NaCl-Konzentrationen von bis zu 20% und längere Perioden des Trocknens und Gefrierens mit anschließendem Auftauen (63, 74, 164, 165).

Aufgrund ihrer Fähigkeit, konventionelle Methoden der Nahrungsmittelkonservierung überleben zu können, stellen Listerien eine nicht zu unterschätzende Gefahr als potentiell pathogene Nahrungsmittelkeime dar.

Listerien lassen sich über 16S-rRNA-Analyse, DNA-DNA-Hybridisierung mit Listerien-spezifischen Sonden, Antikörperdetektion oder DNA-Amplifikation mittels PCR nachweisen (15, 17, 94, 163).

2.3 Pathogenese

1926 wurde von Murray et al. (132) erstmals eine Listeriose in Labortieren beschrieben. Aufgrund der charakteristischen Vermehrung von Monozyten im Blut infizierter Kaninchen und Meerschweinchen wurde der die Krankheit auslösende Organismus *Bacterium monocytogenes* genannt und erhielt 1940 zu Ehren von Joseph Baron Lister (75, 142) seinen heutigen Namen. *Listeria monocytogenes* ist jedoch nicht nur tierpathogen, sondern verursacht als einzige Art auch die humane Listeriose. 1929 gelang es erst mal diesen Erreger aus infizierten Schafen und Menschen zu isolieren und zu beschreiben (63). *Listeria monocytogenes* verursacht als human- und tierpathogener Keim bei Säugetieren (v. a. bei Schafen) Fehlgeburten, neonatale Sepsis und Meningoenzephalitis (sog. „circling disease“). Dasselbe gilt auch für *L. ivanovii*, der als tierpathogener Keim allerdings nicht den Menschen als Wirt nutzen kann (72, 165). Es können hierbei auch gesunde Tiere als

Überträger auftreten. Nur in einzelnen und seltenen Fällen konnten *L. ivanovii* und *L. seeligeri* aus an Listeriose erkrankten menschlichen Patienten isoliert werden.

Die humane Listeriose gilt als seltene Erkrankung mit sporadischem Auftreten bei gesunden Menschen. Sie ist jedoch durch eine hohe Mortalitätsrate (v. a. bei Meningitiden, weltweit geschätzt 30%) gekennzeichnet (57, 63). In den letzten 20 Jahren konnte in den Industriestaaten, v. a. in Europa, ein beträchtlicher Anstieg der Listeriose-Fälle beobachtet werden (45, 74). Von den 13 bekannten *L. monocytogenes*-Serotypen verursachen vor allem die Serotypen 1/2a, 1/2b und 4b häufig Listeriose bei Menschen.

Eine Infektion mit pathogenen Listerien (Listeriose) erfolgt in der Regel über kontaminierte Lebensmittel wie Milchprodukte, ungekochtes Gemüse, Fleisch, Geflügel oder Salate (45, 74).

Listerien sind klassische Opportunisten. Die meisten Infektionen bleiben klinisch stumm. Erst wenn mit Nahrungsmitteln zahlreiche Erreger (10⁶-10⁹) in den Magen-Darm-Trakt gelangen, können bei immunkompetenten Personen Symptome auftreten, die einem grippalen Infekt ähneln. Bei massiver Infektion werden Symptome einer Gastroenteritis beobachtet. Im hohen Alter, in der Schwangerschaft und bei Säuglingen kann sich die Listeriose als Sepsis und / oder Meningoenzephalitis manifestieren. In der Schwangerschaft besteht durch die Möglichkeit einer intrauterinen Infektion des Fötus die Gefahr von spontanen Fehl- oder Totgeburten (4, 158). Zu den weiteren Risikogruppen gehören schwangere Frauen, Neugeborene und immunsupprimierte Personen, wie auch ältere Menschen, Alkoholiker, Diabetiker und Krebspatienten. In den letzten Jahren lässt sich ein Anstieg an immunsupprimierten Personen mit erhöhtem Listerienrisiko feststellen. Dieses Phänomen ist auf den erfolgreichen Einsatz von Immunsuppressiva bei Krebsbehandlungen, Organtransplantationen und durch das gehäufte Auftreten von AIDS-Infektionen zurückzuführen (57, 136, 163).

Zur Therapie einer Listeriose werden Penicilline (Amoxicillin) sowie Co-trimoxazol, manchmal in Kombination mit Aminoglykosiden, eingesetzt (163, 166). Praktisch einsetzbare Impfstoffe für den Menschen gibt es bislang nicht und auch die Diagnostik der Listerien gestaltet sich schwierig, da sie besondere stoffwechselphysiologische Besonderheiten besitzen (94).

2.4 Infektionszyklus und Virulenzfaktoren von *L. monocytogenes*

Pathogene Listerien (*L. monocytogenes* und *L. ivanovii*) werden in die Gruppe der fakultativ intrazellulären Bakterien eingestuft. Dieser Gruppe, zu denen auch andere Vertreter wie z.B. *Mycobacterium*, *Salmonella*, *Shigella*, *Legionella* und *Yersinia* gehören, ist die Fähigkeit gemeinsam, in eukaryontische Wirtszellen einzudringen, dort zu überleben, sich zu vermehren und über die Zellgrenzen hinweg auszubreiten. Diese

Lebensweise ist jedoch nicht obligat und krankheitserregende Bakterien sind auch in der freien Natur anzutreffen (21, 28, 94).

Die Gattung *Listeria* eignet sich aufgrund ihrer leichten Kultivierbarkeit im Labor und der geringen Virulenz gegenüber gesunden Personen gut als Modellsystem für die Untersuchung von Infektions- und Vermehrungsstrategien fakultativ intrazellulärer Bakterien. Zudem ermöglicht das Vorkommen sowohl pathogener als auch apathogener Arten innerhalb der Gattung vergleichende Untersuchungen.

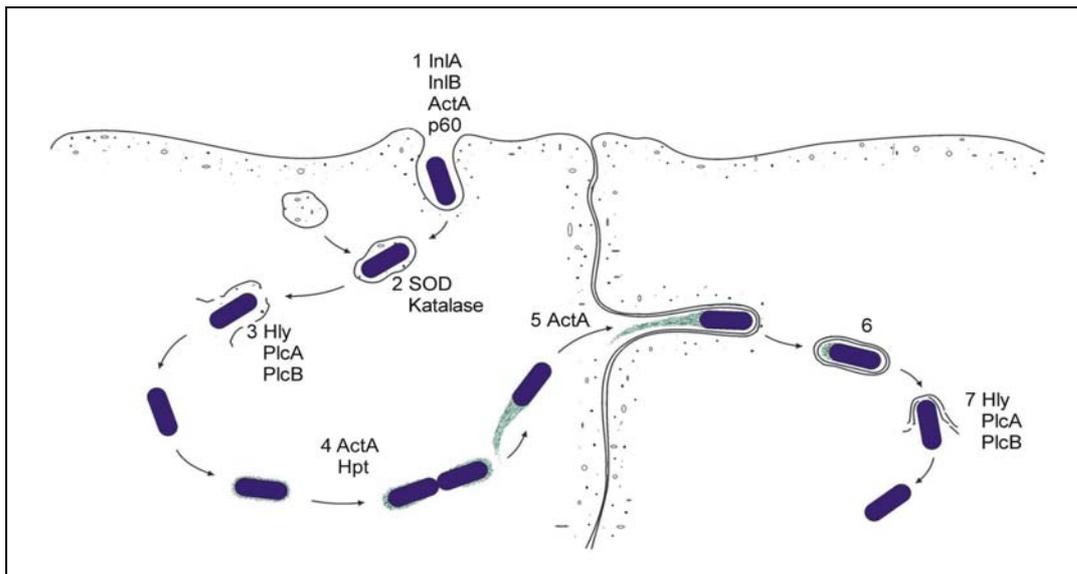


Abb. 1: Der Infektionszyklus von *L. monocytogenes* (modifiz. nach Tilney und Portnoy, 1989; Kreft, 1995; übernommen von S. Altmann, 2002)

Der Infektionszyklus von *L. monocytogenes* (29) ist bislang am Detailliertesten untersucht und beschrieben worden (s. Abb. 1):

Als bevorzugte Wirtszellen für *L. monocytogenes* gelten Makrophagen, doch konnten die Bakterien auch schon in vielen anderen eukaryontischen Zelltypen wie Epithelzellen, Fibroblasten, Hepatozyten, Enterozyten und dendritischen Zellen beobachtet werden. Während Makrophagen *L. monocytogenes* aktiv aufnehmen, wird die Endocytose der Bakterien in nicht professionell phagozytische Zellen durch bakterienspezifische Produkte herbeigeführt.

Pathogene Listerien gelangen in den meisten Fällen durch kontaminierte Nahrung über die Oralroute in den Darm (54). Hier adhären sie an Epithelzellen und werden über induzierte Phagozytose aufgenommen. Das Bakterium liegt nun intrazellulär im Phagosom vor. Hier müssen die Bakterien zunächst antibakterielle Abwehrmechanismen der Wirtszelle („oxidativer burst“, evtl. Verschmelzung mit Lysosom zum Phagolysosom) überstehen, bevor es nach ca. 30 Minuten durch Sekretion von Listeriolysin O, einem porenbildenden Cytolysin, zur Auflösung der phagosomalen Membran kommt. Das Bakterium liegt nun intracytoplasmatisch vor und vermehrt sich dort mit einer Verdopplungszeit von ca. 1 Stunde (55). Listerien sind in der Lage wirtszelleigenes Aktin zu polymerisieren und sich dadurch in der Zelle fortzubewegen. Es kommt zur Ausbildung

eines Aktinschweifes an einem Pol der Listerienzelle. Durch das fortwährende Einfügen von Aktinmonomeren zwischen Schweif und Bakterium ist eine Bewegung innerhalb der Wirtszelle mit konstanter Geschwindigkeit (ca. 1 $\mu\text{m/s}$) möglich (31, 159). Gelangt das Bakterium hierbei an die Zellperipherie, induziert der Kontakt mit der Cytoplasmamembran die Ausbildung einer Pseudopodien-artigen Ausstülpung, die sich in den Bereich der benachbarten Zelle erstreckt und von dieser phagozytiert wird. Das Bakterium ist hier zunächst von einer Doppelmembran umgeben, die lysiert werden muss, um einen neuen Vermehrungszyklus starten zu können. Dieser Vermehrungs- und Ausbreitungsweg innerhalb der Zelle ermöglicht es den Kontakt mit extrazellulärem Milieu zu umgehen. Auf diese Weise entkommen die pathogenen Bakterien den extrazellulären Abwehrmechanismen des Wirts (178).

Beim Menschen verläuft die Infektionsroute normalerweise über den Gastrointestinaltrakt. Nach oraler Aufnahme kontaminierter Lebensmittel gelangt *L. monocytogenes* in den Darm, wo es vermutlich in verschiedene Darmzelltypen, wie die M-Zellen der Peyer'schen Platten und Darmepithelzellen eindringt (113, 148). Die pathogenen Bakterien überschreiten anschließend die Darmbarriere und werden in der darunter liegenden Lamina propria von phagozytischen Zellen aufgenommen. Eine Ausbreitung im ganzen Körper verläuft über die Blutbahn, wobei Leber und Milz als bevorzugte Orte für eine Primärinfektion dienen. Schließlich können Listerien die Plazenta oder die Blut-Hirn-Schranke passieren und einen Abort, eine Infektion des Fötus oder die für eine Meningitis typischen Symptome hervorrufen.

2.4.1 Eindringen in die Wirtszelle

L. monocytogenes benötigt verschiedene bakterielle Faktoren, um in nicht-professionelle Phagozyten, wie z.B. Epithelzellen einzudringen. Zu diesen Faktoren gehören die sog. Internaline und die Proteine ActA und p60.

Internaline

Die Internaline werden in einer Multigenfamilie eingeordnet, zu der derzeit neun Internaline zählen: Internalin A und B (54), Internalin C (37, 44) sowie die Internaline C2, D, E, F, G und H (40, 44, 149).

Verschiedene dieser Internaline sind an der Invasion von *L. monocytogenes* in nicht-professionell phagozytierende Zellen wie Darmepithelzellen beteiligt. Über die Expression verschiedener Internaline scheint *L. monocytogenes* in unterschiedliche Zelltypen eindringen zu können (98, 103).

Die Internaline weisen eine klassische Signalsequenz gefolgt von einer Leucin-reichen Repeatregion (LRR) auf. Diese umfasst 15 Repeats von je 22 Aminosäuren. Eine

nachfolgende Interrepeatregion (IR) trennt die LRR-Region von einer zweiten Repeatregion, die auch als Region B bezeichnet wird. Das C-terminale Ende weist ein LPXTG-Motiv auf, das als Ziel für die Sortase A und zur kovalenten Bindung an das Peptidoglykan-Gerüst der Zellwand dient. Sowohl die LRR-Region als auch die IR-Region sind notwendig aber auch ausreichend um ein Eindringen von *L. monocytogenes* in menschliche Epithelzellen zu vermitteln (42).

Die C-terminale Region besitzt strukturelle Homologien zu verschiedenen Oberflächenproteinen Gram-positiver Kokken, die zur Gruppe der Adhäsine gerechnet werden (41, 54).

Internalin A (InIA), das vom *inA*-Gen kodiert wird, ist ein 88 kDa schweres Oberflächenprotein, das für das Eindringen in Epithelzellen notwendig ist. Die Bedeutung von InIA für den Infektionszyklus von *L. monocytogenes* wird durch die Beobachtung unterstrichen, dass *inA*-negative Mutanten nicht mehr in der Lage sind an Caco-2-Zellen zu adhären und in diese einzudringen. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die nicht-invasive, apathogene Art *L. innocua* nach Transformation mit dem *inA*-Gen die Fähigkeit erhielt, in Caco-2-Zellen einzudringen (54).

Als spezifischer Rezeptor für InIA dient E-Cadherin auf der Oberfläche eukaryontischer Wirtszellen. E-Cadherin ist ein Ca²⁺-abhängiges Glykoprotein, das vor allem in epithelialen Geweben (Haut, Leber, Intestinaltrakt) exprimiert wird und eine Ca²⁺-abhängige Zell-Zell-Adhäsion vermittelt. Die beiden ersten extrazellulären Domänen von E-Cadherin stellen den direkten Kontakt von benachbarten Zellen her. Die intrazelluläre Domäne verankert durch Interaktion mit Cateninen den Komplex am Aktin-Cytoskelett der Wirtszelle. Zur bakteriellen Anheftung genügt die Ektodomäne von E-Cadherin (42). Allerdings ist für das Eindringen des Bakteriums die intracytoplasmatische Domäne – hier vor allem die letzten 35 Aminosäuren – unbedingt notwendig.

Die Interaktion zwischen Internalin A und E-Cadherin erfordert die Erkennung eines Prolinrestes an Position 16 der ersten extrazellulären Domäne (EC1) von E-Cadherin. Maus-E-Cadherin besitzt an dieser Stelle einen Glutamatrest und erlaubt so kein InternalinA-abhängiges Eindringen von *L. monocytogenes* (104). Eine transgene Maus, die menschliches E-Cadherin im Darm exprimiert, ermöglicht eine Infektion durch *L. monocytogenes* (105). Die Kristallstruktur des Komplexes zwischen der N-terminalen InIA-Domäne und der EC1-Domäne von E-Cadherin zeigt, dass die LRR-Region von InIA das menschliche EC1 umschließt und spezifisch erkennt (162).

Internalin B (InIB) weist bei einer Länge von 630 Aminosäuren ein Molekulargewicht von 65 kDa auf und zeigt große strukturelle Homologie zu InIA. Allerdings fehlt das für andere Internaline typische LPXTG-Motiv. Bei Untersuchungen *inB*-negativer Mutanten wurde gezeigt, dass InIB notwendig für die Aufnahme von *L. monocytogenes* in Hepatozyten und nicht-epitheliale Zellen ist (11, 38, 64). Diese Mutanten sind grundsätzlich in ihrer Virulenz abgeschwächt und sind auch nicht mehr in der Lage in einige Epithelzelllinien einzudringen (109).

Die N-terminale Region von InIB weist eine Signalsequenz auf, die von sieben LRR-Repeats, einer IR-Region und einem B-Repeat gefolgt werden. Am C-Terminus sind drei Tandemrepeats von ungefähr 80 Aminosäuren lokalisiert. Diese beginnen mit einem GW-

Sequenzmotiv und vermitteln die Anheftung von InIB an die bakterielle Zellwand durch nicht-kovalente Bindungen mit den Lipoteichonsäuren (76).

Die durch InIB ausgelöste effiziente Aufnahme in epitheliale Zellen erfolgt über die Aktivierung einer Phosphatidylinositol (PI) 3-Kinase (70). Um Invasivität in die nicht-invasive Art *L. innocua* oder auch in Latexbeads zu übertragen genügt die LRR-Region von InIB (13). An der Interaktion mit Zielzellen sind auch die GW-Komponenten und das B-Repeat beteiligt. Aufgrund der Kristallstrukturen der LRR-Domänen (117), der LRR-/IR-Domänen (161) und des Gesamtlängenproteins InIB (116) wird vermutet, dass InIB mit mehreren Liganden interagieren kann.

Als Hauptrezeptor für InIB auf der Wirtszelloberfläche dient der Hepatozytenwachstumsfaktor HGFR oder Met (167). Met zählt zur Familie der Tyrosinkinase-Rezeptoren und wird als großes Protein synthetisiert, das zur Reifung an der Zelloberfläche in eine α - und eine β -Untereinheit gespalten wird.

InIB bindet Met an der konkaven Oberfläche der LRR-Region, was zur Phosphorylierung von Met führt (167). Die Adapterproteine Cb1, Gab1 und Shc werden rekrutiert bzw. phosphoryliert (71) und es kommt zur Aktivierung der PI-3-Kinase (70).

Für eine bestmögliche Aktivierung von Met ist die Anwesenheit von Glycosaminoglykanen (GAGs) auf der Oberfläche eukaryontischer Zellen notwendig. Diese GAGs erhöhen die InIB-vermittelte Aufnahme in Zielzellen, daneben ist Heparin in der Lage inIB von der bakteriellen Oberfläche zu lösen (77). Die Interaktion zwischen den GAGs und InIB wird durch die GW-Domänen vermittelt (77) und man kann davon ausgehen, dass N- und C-terminaler Teil von InIB während der Invasion zusammenwirken. Möglicherweise spielt sowohl die oberflächenassoziierte als auch die gelöste Form von InIB eine Rolle bei der Invasion.

Auch der Komplementrezeptor C1q (gC1q-R)/p32 kann als Rezeptor für InIB dienen (12). Auch in diesem Fall binden die GW-Module von InIB spezifisch an gC1q-R, was eine Freisetzung von InIB von der bakteriellen Oberfläche voraussetzt (116).

Die Interaktion von InIB mit Zielzellen aktiviert den Ras mitogen-activated protein (MAP) Kinase-Signalweg in Epithelzellen und die Aktivierung von NF- κ B in Makrophagen (114) über Ras, die PI3-Kinase und Akt (115).

Ein weiteres Mitglied der Multigenfamilie ist Internalin C (InIC oder IrpA), welches mit 30 kDa bedeutend kleiner ist als die Internaline A und B. InIC ist ein sekretorisches Protein, die Zellwandbindungssequenz fehlt und es wird ausschließlich im Kulturüberstand gefunden. Wird das *inC*-Gen durch Deletion ausgeschaltet, resultiert zwar eine verringerte Virulenz im Mausmodell, die Mutanten sind jedoch invasiv und zeigen ein normales intrazelluläres Überleben. InIC spielt deshalb vermutlich nicht bei der Invasion direkt, sondern erst in einer späteren Phase der Infektion eine Rolle (44).

Die weiteren Internaline C2, D, E, F, G und H weisen alle Charakteristika der Multigenfamilie auf. Sie besitzen eine N-terminale Signalsequenz, zwei Repeatregionen (LRR und B) und eine Zellwandbindungssequenz am C-Terminus. Diese Internaline sind auf drei chromosomale Loci verteilt, wovon zwei jeweils drei Internaline enthalten und in zwei verschiedenen *L. monocytogenes* EGD-Isolaten identifiziert wurden. Die Invasion in

Säugerzelllinien wird durch eine Deletion des *i-inGHE* Genclusters beeinflusst (7). Im Mausmodell konnte in Leber und Milz eine um 3 und 2,5 log₁₀ verringerte Anzahl der *i-inGHE*-Mutanten festgestellt werden (149). Eine Deletion des homologen *i-inC2DE*-Genclusters und die eines zusätzlichen *i-inF*-Gens hatte im zweiten EGD-Isolat keine Auswirkungen auf die Invasion. Hier wurden allerdings im Mausmodell keine Abweichungen vom Wildtyp festgestellt werden (40). Ein weiterer Unterschied zum *i-inAB*-Gencluster zeigt sich darin, dass diese großen Internaline C2, D, E, F, G und H nicht vom Transkriptionsfaktor PrfA des Virulenzgenclusters reguliert werden.

Ami

Das Gen *ami* kodiert für ein 917 Aminosäuren langes Protein, dessen N-terminale Domäne der des Atl-Autolysins von *Staphylococcus aureus* ähnlich ist. Am C-Terminus befindet sich eine Zellwand-Ankerdomäne aus bis zu acht GW-Modulen (11). *Ami*-negativ-Mutanten sind in ihrer Virulenz abgeschwächt (128), was auf eine Beteiligung am Virulenzgeschehen von *L. monocytogenes* hindeutet. In einer $\Delta inAB$ -Mutante wird *Ami* mit der Adhäsion an Zielzellen in Verbindung gebracht. Die Zellwandanker-Domäne reicht in diesem Fall aus, um die Adhäsionsfunktion von *ami*-Mutanten vor einem $\Delta inAB$ -Hintergrund wieder herzustellen (128). Vermutlich dienten Autolysine / Adhäsine als primitive Kolonisierungsfaktoren, die es Bakterien möglich machten mit Oberflächen zu interagieren, die analoge Moleküle ihrer natürlichen Rezeptoren (Teichonsäuren oder Lipoteichonsäuren) exprimieren (42).

p60-Protein

Ein weiterer bakterieller Faktor, der an der Invasion von nicht-professionellen phagozytischen Zellen beteiligt ist, ist das 60 kDa schwere Protein p60, das vom *iap*-Gen (*i*nvasion-*a*ssociated-*p*rotein) kodiert wird. Das p60-Protein ist ein basisches Protein, das eine hohe positive Ladung besitzt. Das Protein wird hauptsächlich ins Medium sekretiert, kommt aber auch oberflächengebunden vor (93).

Spontan auftretende Rau-Mutanten sind durch eine raue Kolonieoberfläche und eine stark verminderte p60-Produktion gekennzeichnet. Die Adhärenz und Invasivität in verschiedene Zelltypen ist herabgesetzt. Die sog. R-Mutanten bilden während ihres Wachstums lange Zellketten aus, in denen die Bakterien durch Doppelsepten getrennt sind. Bei Zugabe von partiell gereinigtem p60 zerfallen diese Ketten in Einzelzellen, deren Invasivität sich nicht mehr vom Wildtyp unterscheidet (97).

P60 enthält eine klassische N-terminale Signalsequenz, die von einer Region mit einer SH3-Domäne gefolgt wird. Der zentrale Teil von p60 enthält eine Reihe von Threonin-Asparagin-Resten (16). Der C-terminale Teil besitzt eine Domäne mit Mureinhydrolase-Aktivität (191). Die variable Region ist charakteristisch für jede Listerienart, weshalb p60 bzw. das *iap*-Gen zur schnellen Identifizierung einzelner Listerienspezies mittels

immunologischer Methoden oder PCR herangezogen werden kann. Durch die Auswahl geeigneter Primerkombinationen entstehen PCR-Produkte unterschiedlicher Größe, die sich spezifisch jeder Art zuordnen lassen (15).

FbpA

FbpA kodiert für ein 570 Aminosäuren langes Protein mit Homologien zu Fibronectin-Bindungssproteinen aus *S. pneumoniae*, *S. pyogenes* und *S. gordonii* (42). FbpA aus *Listeria* besitzt kein typisches Signalpeptid und wird an der Oberfläche exprimiert (39). Der SecA2-Signalweg nutzt FbpA als Substrat. Das gereinigte Protein bindet an auf Mikrotiterplatten immobilisiertes menschliches Fibronectin und trägt zur Adhärenz bei. FbpA scheint auch die Expression von Listeriolysin O und Internalin B auf posttranskriptioneller Ebene zu beeinflussen (39). Dies deutet darauf hin, dass FbpA auch als Chaperon dienen könnte und so den Abbau einiger Virulenz-Assoziierter Proteine verhindert.

ActA

Verantwortlich für das Aktin-vermittelte bakterielle Bewegungsvermögen und die Ausbreitung von Zelle zu Zelle ist ActA, ein listerielles Oberflächenprotein. ActA vermittelt als bakterieller Ligand die Erkennung des HSPG-Rezeptors auf verschiedenen Wirtszellen (3, 173). Heparansulfat-Proteoglykane (HSPG) sind Bestandteile der extrazellulären Matrix und der Plasmamembran mit ubiquitärer Verbreitung in eukaryontischen Zellen. Aufgrund der veränderten HS-Erkennung zeigen ActA-Mutanten eine abgeschwächte Adhärenz und Invasivität. Ein vollständiger Defekt tritt jedoch nicht auf (3).

2.4.2 Überleben im Phagosom

Virulente Listerien liegen nach dem Eindringen in die eukaryontische Wirtszelle im Phagosom vor, wo sie antibakteriellen Abwehrstrategien ausgesetzt sind. Sie besitzen aber durch eigene Abwehrmechanismen (z.B. Superoxid-Dismutase, Katalase) die Fähigkeit diesen Angriff zu überleben. Sie überstehen auch die Verschmelzung des Phagosoms mit Lysosomen und sind schließlich in der Lage aus dem Phagolysosom zu entkommen.

Superoxid-Dismutase und Katalase

L. monocytogenes ist nach der Aufnahme ins Phagosom, besonders aber nach der lysosomalen Fusion einer Vielzahl antibakterieller Abwehrmechanismen des Wirts ausgesetzt. Dazu gehören die Ansäuerung des Phagosom und die Bildung großer Mengen reaktiver Sauerstoffmetabolite (z.B. H_2O_2 , O^{2-} , $OH\cdot$ und $HOCl$), die normalerweise innerhalb kurzer Zeit zur Abtötung avirulenter Bakterien führen. Durch das Vorhandensein der Enzyme Superoxid-Dismutase (SOD) und Katalase können Listerien diese toxischen Sauerstoffverbindungen in unschädliche Endprodukte umwandeln (Brehm et al., 1992; Kreft, 1992). Aufgrund ihrer Funktion zur Verteidigung gegen antibakterielle Abwehrmechanismen der Wirtszelle, können diese Enzyme als mögliche Virulenzfaktoren von *Listeria* angesehen werden (21).

Transposon-induzierte, Katalase-negative Mutanten zeigen im Mausmodell jedoch keine abgeschwächte Virulenz. Die Katalase-Defizienz wird im Vergleich zu Katalase-positiven Stämmen jedoch durch eine erhöhte Superoxid-Dismutase-Produktion kompensiert. (102). Eine deutliche Virulenzminderung wird bei einer Katalase- und SOD-negativen Mutante beobachtet.

Listeriolysin O

Listeriolysin O (LLO) ist ein extrazelluläres, porenbildendes Hämolyisin, das zur Familie der SH-aktivierbaren Zytolysine gehört. Streptolysin O (SLO) aus *Streptococcus pyogenes* stellt hier den Prototyp dar (2, 58). Die Synthese von Listeriolysin O ermöglicht *L. monocytogenes* aus dem Phagolysosom der eukaryontischen Wirtszelle zu entkommen. LLO besitzt ein Molekulargewicht von 58,6 kDa und wird vom *prfA*-regulierten Gen *hly* kodiert (107, 123). Listeriolysin O spielt als essentieller Virulenzfaktor vermutlich eine Schlüsselrolle beim Entkommen von *Listeria* aus dem Phagolysosom infizierter Zellen (28, 55). Nach Aufnahme in die eukaryontische Wirtszelle wird innerhalb der ersten 30 Minuten die phagosomale Membran durch LLO zerstört. Eine vergleichbare Rolle scheint LLO auch bei der Ausbreitung von Zelle zu Zelle zu übernehmen (2, 94).

Durch Transposon-Inaktivierung des *hly*-Gens in pathogenen *L. monocytogenes*-Stämmen geht deren hämolytische Aktivität verloren (28). Weitere Auswirkungen dieser Inaktivierung sind ein avirulenter Phänotyp im Mausinfektionsmodell, sowie der Verlust der Fähigkeit in kultivierten Zelllinien zu wachsen. Die Überlebensrate dieser Mutanten ist deutlich verringert, wohingegen ihre Aufnahme in eukaryontische Wirtszellen unverändert bleibt (99). Listeriolysin O ist somit essentiell für das Überleben von *Listeria* in infizierten Zellen, wird jedoch für die Invasion nicht benötigt.

Phosphatidylinositol-spezifische Phospholipase C

Die Phosphatidylinositol-spezifische Phospholipase C (PI-PLC) stellt ein weiteres listeriell Protein dar, das vermutlich am Entkommen aus dem Phagosom beteiligt ist. PI-PLC ist ein 36,3 kDa schweres, sekretiertes Protein, das eine hohe Substratspezifität für Phosphatidylinositol aufweist. Es wird vom *plcA*-Gen kodiert und unterliegt der Regulation durch PrfA.

Durch in-frame-Deletionsmutationen resultiert im Vergleich zum Wildtyp eine leicht abgeschwächte Virulenz im Mausinfektionsmodell und ein weniger effizientes Entkommen aus dem Phagosom (19). Die Zerstörung des Phagosoms wird vermutlich durch das Zusammenwirken von PI-PLC und LLO ermöglicht. Die Phospholipase könnte den Zugang zur phagosomalen Membran und damit die Lyse des Phagosoms durch LLO erleichtern (166).

2.4.3 Vermehrung und Verbreitung im Cytoplasma

Nach Auflösung der phagosomalen Membran sind Listerien in der Lage sich im Wirtszellcytoplasma mit einer Verdopplungszeit von ca. 1 Stunde zu vermehren (55). Während des Wachstums sind die Listerien zunächst von einer diffusen Wolke wirtszelleigenen Aktins umgeben. Dieses wird nach ungefähr 2 Stunden in eine kometenschweifähnliche Struktur an einem Zellpol umgelagert. Mittels dieser Aktinschweife ist eine intra- und interzelluläre Bewegung und Verbreitung möglich. Auf diese Weise werden auch benachbarte Zellen infiziert.

ActA

Verantwortlich für die Fortbewegungsfähigkeit der Listerien im Cytoplasma der Wirtszelle ist ActA, ein listeriell Oberflächenprotein. Durch dieses Protein wird auch die Ausbreitung der Bakterien von Zelle zu Zelle vermittelt.

Das Protein wird vom *actA*-Gen kodiert und stellt ein 76 kDa schweres Protein dar, das überwiegend oberflächengebunden vorliegt, jedoch auch im Kulturüberstand nachgewiesen werden kann. Typische Charakteristika von ActA sind ein N-terminales Signalpeptid und eine C-terminal lokalisierte hydrophobe Region, die als Membrananker dient (36, 90, 181). ActA ist über die hydrophobe Region in der bakteriellen Membran verankert und ragt ins Cytoplasma der Wirtszelle hinein, wo es möglicherweise zu Wechselwirkungen mit Bestandteilen des Cytoskeletts kommen kann (91, 135). Es konnte gezeigt werden, dass ActA im Cytoplasma eukaryontischer Zellen phosphoryliert wird, weiteres ist jedoch noch nicht bekannt (14).

Nach dem Entkommen aus dem Phagolysosom werden die Listerien von einem Saum aus zellulären Aktinfilamenten umgeben, die nach ungefähr 2 Stunden zu einem kometenartigen Schweif („comet tail“) reorganisiert werden (178). Hierbei scheint das Oberflächenprotein ActA der einzige listerielle Faktor zu sein, der für die Rekrutierung der Aktinfilamente der Wirtszelle benötigt wird (143). Untersuchungen an *actA*-Mutanten haben gezeigt, dass diese nicht mehr zur Anhäufung von Wirtzellaktin auf der Bakterienoberfläche befähigt sind. Eine Bewegung im Cytoplasma ist bei diesen Mutanten nicht mehr möglich, da keine Aktinschweife mehr ausgebildet werden können. Solche Mutanten wachsen deshalb in Mikrokolonien. Außerdem zeigt sich bei solchen mutierten Listerien eine abgeschwächte Virulenz, da auch keine Zell-zu-Zell-Ausbreitung mehr möglich ist (36, 90).

Mittels des Aktinschweifes ist eine Fortbewegung im Cytoplasma möglich. Dies geschieht durch kontinuierliche Einlagerung von Aktinmonomeren am Schweif, wodurch das Bakterium in Richtung des ActA-freien Zellpols vorwärts geschoben wird. Die intrazelluläre Fortbewegungsgeschwindigkeit ist dabei proportional zur Rate der Aktinpolymerisation bzw. zur Länge des Aktinschweifes und kann Werte bis 1,5 $\mu\text{m/s}$ erreichen (131, 159, 176). Es ist noch nicht klar, ob ActA die Aktinpolymerisation durch direkte Interaktion mit Wirtzellaktin bewirkt oder indirekt über einen zellulären Nukleator wirkt (176, 177). Neue Experimente, die zeigten, dass die N-terminalen 264 Aminosäuren des Proteins mit dem Arp2/3-Komplex interagieren, liefern einen wichtigen Hinweis auf den Mechanismus durch den ActA die Aktinpolymerisation induziert. Durch diese Interaktion steigt die Aktinpolymerisationsrate stark an. Deshalb stellt Arp2/3 einen essentiellen Wirtsfaktor der durch Aktin vermittelten Mobilität dar (187, 188).

Hpt

Bislang ist wenig über die Nährstoffanforderungen von *Listeria* bekannt. Auch weiß man nicht, welche Mechanismen zur Nährstoff-Aufnahme im Wirtszellcytoplasma dienen. *L. monocytogenes* nutzt Glucose-1-Phosphat als Kohlenstoffquelle, welches im Cytoplasma frei zugänglich ist. Die Aufnahme von Glucose-1-Phosphat wird durch die *prfA*-abhängige Expression eines Hexose-Phosphat-Transporters (Hpt) ermöglicht, was sowohl die intrazelluläre Replikation der Bakterien ermöglicht als auch die Proliferation in Organen der Maus benötigt wird (25). Als Homolog in Eukaryonten findet man den Glucose-6-Phosphat-Transporter (G6P), der für die Aufnahme von Glucose-6-Phosphat aus dem Cytosol in das Endoplasmatische Retikulum verantwortlich ist.

2.4.4 Zell-zu-Zell-Ausbreitung

Die Aktin-vermittelte Bewegung der Listerien im Cytoplasma ermöglicht auch die Ausbreitung in benachbarte Zellen. Gelangen die Bakterien an die Peripherie der Zelle, werden sie über pseudopodienartige Ausstülpungen der Nachbarzelle endozytiert und gelangen so – umhüllt von einer Doppelmembran – in eine neue Wirtszelle. Listerien sind jedoch in der Lage auch diese Doppelmembran aufzulösen und dadurch wieder ins Cytoplasma zu gelangen. Hier kann nun ein neuer Vermehrungs- und Verbreitungszyklus stattfinden.

Lecithinase

Die Lecithinase stellt neben der beschriebenen PI-PLC (→ 2.3.2) eine weitere Phospholipase von *L. monocytogenes* dar. Das *plcB*-Gen kodiert ein 33 kDa schweres Proenzym (inaktive Form) und weist Homologien zu den Phosphatidylcholin-spezifischen Phospholipasen C (PC-PLC) von *Bacillus cereus* und *Clostridium perfringens* auf. Die PC-PLC von *L. monocytogenes* hydrolysiert nicht nur Phosphatidylcholin (Lecithin), sondern auch Phosphatidylserin, Phosphatidylethanolamin und in geringem Maß Sphingomyelin (181). Das Enzym wird als inaktives Proenzym (33 kDa) sekretiert und durch eine listerielle Metalloprotease in die aktive Form (29 kDa) überführt (135, 146, 152).

In-frame-Deletionsmutanten zeigen auch hier eine abgeschwächte Virulenz und sind nicht mehr in der Lage sich in benachbarte Zellen auszubreiten. Es lässt sich eine Anhäufung von Bakterien in Doppelmembran-Vesikeln beobachten, wohingegen sich beim Entkommen aus dem primären Phagolysosom keine Unterschiede zum Wildtyp erkennen lassen (169, 181). Die Fähigkeit der Listerien sich nach der Zell-zu-Zell-Ausbreitung aus Doppelmembran-Vesikeln befreien zu können, um einen neuen Vermehrungs- und Verbreitungszyklus zu starten, scheint teilweise auf der Lecithinase-Aktivität zu beruhen.

Metalloprotease

Das *mpl*-Gen von *L. monocytogenes* codiert ein 57,4 kDa schweres, Zn-abhängiges Enzym, die Metalloprotease. Sie besitzt eine N-terminale Signalsequenz und weist große Homologien zu sekretierten Metalloproteasen anderer Bakterien auf. Im Kulturüberstand findet man ein 60 kDa großes Mpl-Produkt, das wahrscheinlich eine inaktive Proform der Protease darstellt (34, 120).

Bei Untersuchungen von Transposoninsertions-Mutanten im *mpl*-Gen konnte gezeigt werden, dass diese sowohl eine verringerte Virulenz als auch eine geringere Lecithinaseproduktion aufweisen. Auch lässt sich im Kulturüberstand dieser Mutanten nur noch die 33 kDa-schwere Form des Lecithinasepolypeptids finden.

Dies legt die Vermutung nahe, dass die Metalloprotease für die Reifung der PC-PLC benötigt wird und diese erst nach proteolytischer Spaltung der inaktiven 33 kDa-Form in das aktive 29 kDa-Enzym überführt (120, 152). Diese Annahme konnte durch Komplementationsstudien bestätigt werden (146).

Die Zn-abhängige Metalloprotease ist also durch ihre Wirkung auf die Lecithinase am Virulenzverhalten von *L. monocytogenes* beteiligt.

2.4.5 Organisation der Virulenzgene von *L. monocytogenes*

Für die erfolgreiche Invasion, das Überleben innerhalb eukaryontischer Wirtszellen und die Ausbreitung im infizierten Organismus benötigt *Listeria monocytogenes* eine Reihe von Virulenzfaktoren (s. Abb. 1), die größtenteils in einem Virulenzgencluster (s. Abb.2) angeordnet sind (Portnoy et al., 1992). Die koordinierte Expression dieser Virulenz-assoziierten Gene wird durch den positiven Regulationsfaktor *prfA* kontrolliert, der selbst Bestandteil des Clusters ist (22).

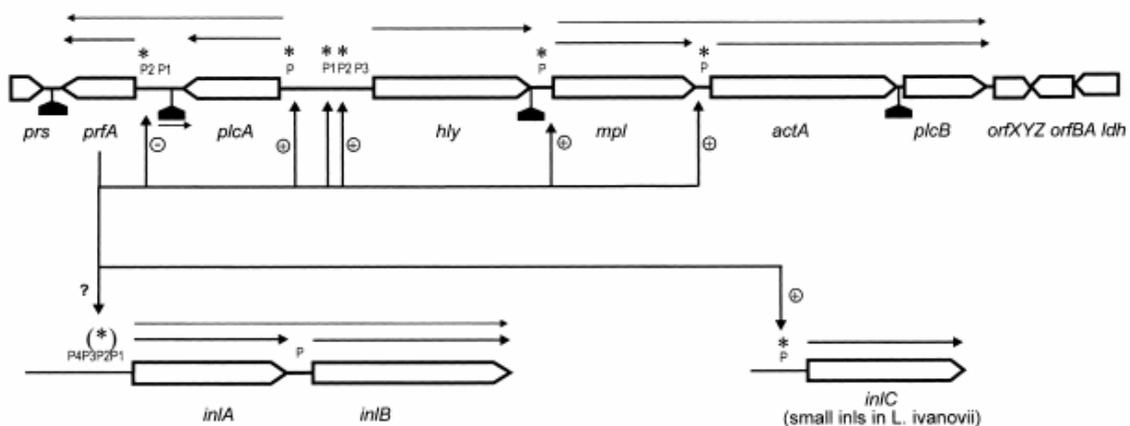


Abb. 2: Das Virulenzgencluster von *L. monocytogenes* (95);

P=Promotor; **(*)**= Promotor enthält *prfA*-Box; die Pfeile zeigen die verschiedenen Transkripte; **(+)** bzw. **(-)**= Transkriptionsinduktion bzw. -repression

Die meisten Virulenzgene von *L. monocytogenes* befinden sich in einer 9,6 kb großen, chromosomalen Region, dem sog. Virulenzgencluster (145). Dieser Bereich besteht neben dem Gen *hly* aus dem *plcA-prfA*-Operon und dem 5,7 kb großen Lecithinase-Operon, das die Gene *mpl*, *actA* und *plcB* sowie drei weitere offene Leseraster (ORFX und -Z) unbekannter Funktion enthält (181). Da dieses Virulenzgencluster eine kompakte genetische Einheit darstellt und Merkmale einer Pathogenitätsinsel besitzt, wird es mittlerweile als *Listeria* Pathogenitätsinsel 1 (LIPI-1) bezeichnet (96, 180).

Der gesamte Bereich wird von zwei Haushaltsgenen flankiert: stromaufwärts von *prfA* liegt das Gen *prs*, das für eine Phosphoribosyl-Pyrophosphat-Synthetase codiert (60), stromaufwärts vom Lecithinase-Operon wird eine Lactatdehydrogenase vom Gen *ldh* codiert (181).

Neben dem im Virulenzgencluster befindlichen Genen werden noch weitere listerielle Gene durch PrfA reguliert. Hierzu zählen unter anderem diverse Internalingene, die jedoch in anderen Bereichen des Chromosoms liegen.

Die transkriptionelle Organisation der PrfA-kontrollierten Gene sieht folgendermaßen aus (22, 119): *plcA* wird entweder monocistronisch oder zusammen mit *prfA* bicistronisch transkribiert. Das Gen *hly* wird von zwei PrfA-abhängigen Promotoren in monocistronische mRNA überführt. Allerdings existiert auch ein PrfA-unabhängiger Promotor, der zur Produktion geringer Mengen an *hly*-Transkript führt (35). Die Gene des Lecithinase-Operons (*mpl*, *actA*, *plcB*, ORFX und Z) werden gemeinsam und in gleicher Richtung wie *hly* transkribiert. Neben der polycistronischen mRNA unter Kontrolle des *mpl*-Promotors findet man jedoch auch ein monocistronisches *mpl*-Transkript und eine bicistronische mRNA für *actA* und *plcB* (10).

Die Internaline A und B sind in einem Operon organisiert, das außerhalb des Virulenzgenclusters liegt. Ihre Transkription erfolgt in Form monocistronischer *inA*- und bicistronischer *inA/B*-mRNA über mehrere Promotoren, die nur zum Teil PrfA-abhängig sind. Zusätzlich erfolgt eine Transkriptionsregulation über die Wachstumstemperatur und – Phase, sowie über das Wachstumsmedium (BHI bzw. MEM) (41, 44, 109). Das Gen *inC* wird als monocistronische mRNA von einem PrfA-abhängigen Promotor und möglicherweise auch PrfA-unabhängig transkribiert. Hier wird die *inC*-Synthese bei Wachstum in MEM induziert.

Die Regulation des *iap*-Gens erfolgt im Gegensatz zu den oben erwähnten listeriellen Virulenzfaktoren nicht durch PrfA, sondern posttranskriptionell durch einen bisher unbekanntem Mechanismus (15, 92).

2.4.6 Kontrolle der Virulenzgene durch PrfA

Durch Untersuchungen an avirulenten Mutanten, die intakte, aber nicht transkribierte Virulenzgene besitzen, wurde ein DNA-Bereich in unmittelbarer Nähe des Virulenzgenclusters charakterisiert, der die Expression einer Reihe von Virulenz-assoziierten Genen kontrolliert (22, 120). Dieses pleiotrope Regulatorprotein, das als positiver Transkriptionsfaktor PrfA bezeichnet wird, ist ein 27,1 kDa schweres Protein und wird von dem im Virulenzgencluster liegenden Gen *prfA* codiert (22, 107).

PrfA weist signifikante Homologien zur Crp-Fnr-Familie globaler Transkriptionsregulatoren auf (68, 100) und ist ein site-spezifisches DNA-Bindungsprotein mit putativem Helix-Turn-Helix-Motiv (51, 52).

Die von PrfA-regulierten Virulenzgene haben eine charakteristische Gemeinsamkeit: sie besitzen in der –35-Region ihrer Promotoren eine 14 bp große konservierte,

palindromische DNA-Sequenz, die sog. PrfA-Box (5'-TTAACA NN TGTAA mit NN = AA, TT-3'), die essentiell für die Erkennung durch das Regulatorprotein ist (36, 41, 122). In dieser Konsensussequenz finden sich nur leichte Abweichungen. Die PrfA-Boxen der Gene *hly* und *plcA* entsprechen dem oben beschriebenen Palindrom, bei den Genen *actA*, *mpl* und *inC* findet man einen, bei *inA* zwei Basenaustausche.

PrfA aktiviert durch Bindung an diese Zielsequenz und direkte Interaktion mit der RNA-Polymerase die Expression der Virulenzgene. Die Bindungsaffinität von PrfA wird durch die Konsensussequenzen der PrfA-Box beeinflusst und ist umso größer, je genauer das Palindrom mit der oben genannten DNA-Sequenz übereinstimmt. Auf diesem Weg kann durch unterschiedliche Bindungsstärke von PrfA eine zeitliche Aktivierung von Virulenzgenen erfolgen. Gene mit hoher Affinität der Promotoren (z.B. *hly* und *plcB*) werden schon bei niedrigen PrfA-Konzentrationen aktiviert, Promotoren mit geringerer Affinität (z.B. *mpl* und *actA*) erfordern höhere Konzentrationen an PrfA (10, 52, 121).

Mittlerweile konnte ein Modell aufgestellt werden, wie die Regulation über PrfA ablaufen könnte (95). Man geht davon aus, dass PrfA in zwei Zuständen vorliegen kann (funktionell aktiv und inaktiv) und von dem einen in den anderen Zustand über Bindung eines bisher unbekanntes Cofaktors überführt werden kann. Dieser Cofaktor scheint für die Übermittlung von Umweltsignalen zu dienen und so die Regulation der Virulenzgene über PrfA zu beeinflussen (155, 180, 182). Zudem ist in diesem Modell PrfA ständig, wenn auch nur in geringen Mengen, im Cytoplasma der Bakterien vorhanden.

PrfA bildet zusammen mit *plcA* das *prfA-plcA*-Operon und wird entweder konstitutiv von seinem eigenen Promotor aus oder bicistronisch zusammen mit *plcA* über dessen Promotor cotranskribiert. PrfA stimuliert als positiver Regulator die Transkription von *plcA* und fördert somit durch Cotranskription mit *plcA* seine eigene Synthese (Autoregulation) (106, 120). Die Expression des *prfA*-Gens erfolgt von drei Promotoren aus. Die Promotoren P1 und P2 befinden sich in der intergenischen Region zwischen *plcA* und *prfA* und sind trotz unterschiedlicher Regulation *in vivo* redundant. Weitere Transkription erfolgt über den *plcA*-Promotor durch die Bildung der bicistronischen *plcA-prfA*-mRNA (50, 51).

Liegt kein Cofaktor vor, ist PrfA inaktiv und wird über die konstitutiven Promotoren P1 und P2 in der intergenischen Region zwischen *plcA* und *prfA* schwach transkribiert und es ist nur eine geringe Menge an PrfA-Protein vorhanden. Die Konzentration an intrazellulärem Cofaktor steigt, wenn *L. monocytogenes* entsprechende Signale aus der Umwelt erhält, was eine Aktivierung von PrfA hervorruft. PrfA kann nun mit erhöhter Affinität an die PrfA-Boxen in PrfA-regulierten Promotoren binden und induziert die Transkription der PrfA-abhängigen Virulenzgene. Zusätzlich wird über das vermehrt gebildete bicistronische *plcA-prfA*-Transkript durch positive Autoregulation noch mehr PrfA-Protein gebildet, was eine erhöhte Synthese der Virulenzgene zur Folge hat. Diese Transkriptionsaktivierung findet so lange statt wie der Cofaktor im bakteriellen Cytoplasma vorhanden ist, kann aber auch schnell inaktiviert werden, wenn geeignete Umweltsignale (und damit der Cofaktor) fehlen (180, 182).

Die Expression der Virulenzgene ist bei Wachstum in der Natur, dem natürlichen Habitat von *L. monocytogenes* nicht essentiell. Eine Transkription der Virulenzgene wird erst bei

Infektion eines geeigneten Wirts nötig. *L. monocytogenes* besitzt deshalb Mechanismen, um die Genexpression den gegebenen Umweltbedingungen anzupassen. Folgende Faktoren können die Transkription von *prfA* und den PrfA-abhängigen Virulenzgenen beeinflussen: Als Umwelteinfluss, der die Expression von *prfA* induzieren kann, ist die Temperatur zu nennen. Bei 20°C (in der Natur) findet man nur eine schwache Transkription der PrfA-abhängigen Virulenzgene, wohingegen bei 37°C (der Temperatur im Säugetierwirt) die Expression der Virulenzgene aktiviert wird. Für die Temperaturkontrolle der Transkription von *prfA* (und in der Folge aller PrfA-abhängigen Virulenzgene) ist ein so genanntes „RNA-Thermometer“ verantwortlich (73). Auch das Nährstoffangebot beeinflusst die Genexpression von *L. monocytogenes*. Im sehr reichen Medium BHI (Brain Heart Infusion) findet bei 37°C nur eine schwache Transkription der Virulenzgene statt, verglichen mit einem BHI-Medium, dem Aktivkohle zugesetzt wurde. Es kommt hier zu einem normalen Wachstum der Bakterien, die Expression der Virulenzgene ist aber stark erhöht (154-157). Eine verstärkte Expression der Virulenzgene kann auch beobachtet werden, wenn man in BHI-gewachsene *L. monocytogenes* in das Zellkulturmedium MEM überführt, in dem allerdings kein Wachstum der Bakterien stattfindet (10, 171).

Obwohl in den letzten Jahren zahlreiche Erkenntnisse über die Expression, Aktivität und Struktur des zentralen Virulenzregulators PrfA pathogener Listerien erhalten wurden (111, 112, 127, 183) ist der Mechanismus der Expression, Wirkung und Aktivitätskontrolle dieses Proteins noch nicht in allen Einzelheiten aufgeklärt.

HPr

Die HPr-Kinase / Phosphatase ist ein 34,9 kDa großes Protein, das viele katalytische und regulatorische Funktionen übernimmt. Die Hauptfunktion liegt jedoch in ihrer Aktivität als Phosphocarrier innerhalb des Phosphoenolpyruvat-vermittelten Phosphotransferasesystems (PEP:PTS). Dieses System katalysiert die Aufnahme und gleichzeitige Phosphorylierung verschiedenster Zucker und ihrer Derivate. Für seine katalytische Funktion wird HPr durch PEP und das Enzym I phosphoryliert, überträgt die Phosphatgruppe anschließend auf EIIA und von dort aus auf EIIB. Das zucker-spezifische integrale Membranprotein EIIC bindet den Zucker, der daraufhin durch P-EIIB phosphoryliert wird. Der phosphorylierte Zucker wird anschließend in das Cytoplasma freigelassen (siehe Abb. 3).

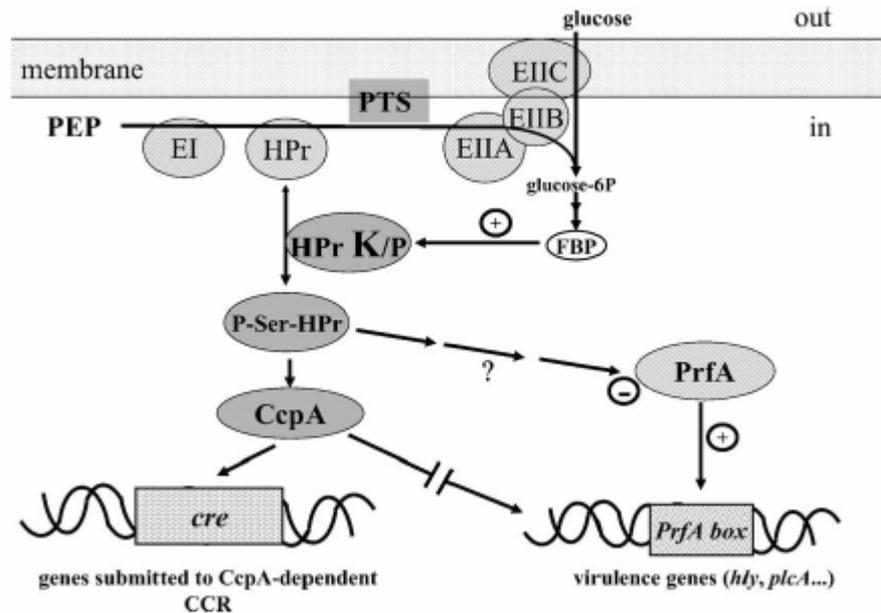


Abb. 3: Schematische Darstellung der PTS-katalysierten Zuckeraufnahme in *L. monocytogenes* (32)

Die HPr-Kinase / Phosphorylase (HPr-K/P) reguliert auch die Kohlenstoff-Katabolit-Repression (KKR) bei gram-positiven Bakterien, indem sie sowohl die ATP- als auch die Pyrophosphat-abhängige Phosphorylierung von HPr an Serin46 vermittelt. Auch die Dephosphorylierung von HPr-Ser46-P wird durch HPr-K/P katalysiert. HPr-Ser46-P fungiert durch Interaktion mit *ccpA* als Korepressor der KKR. Der *ccpA*-HPr-Ser46-P-Komplex kann nachfolgend an Operatorsequenzen (sog. *cre*-Boxen) bestimmter Katabolit-regulierter Transkriptionseinheiten binden (144). HPr-K/P kontrolliert so indirekt die Transkription von etwa 10% aller Gene gram-positiver Bakterien.

Inzwischen weiß man, dass HPr - an Ser46 phosphoryliert - auch die Aktivität von PrfA inhibiert (66). Diese Hemmung wird durch schnell metabolisierbare Kohlenstoffquellen wie Glukose, Fruktose und andere Zucker vermittelt und erfolgt über einen Katabolit-Repressor (*ccpA*)- unabhängigen Mechanismus (32). P-Ser-HPr fungiert als Ko-Repressor bei der Kohlenstoff-Katabolit-Repression und inhibiert die PrfA-Aktivität. Auch der Ausfall von *ccpA* (catabolite control protein A) hemmt die PrfA-Aktivität, da in Folge des Ausfalls P-Ser-HPr angehäuft wird. Auch bei gram-negativen Bakterien konnte ein Zusammenhang zwischen P-Ser-HPr und der Virulenz nachgewiesen werden (32).

Die beiden entgegengesetzten Aktivitäten von HPr-K/P werden durch intrazelluläre Stoffwechselprodukte reguliert, die ihre Konzentration in Abhängigkeit von An- bzw. Abwesenheit bestimmter Zucker wie Glukose oder Fruktose im Nährmedium ändern (144).

Die Struktur von HPr-K/P ähnelt der von Kinasen, welche bestimmte niedermolekulare Substrate wie Nucleoside, Nucleotide oder auch Oxalacetat phosphorylieren.

L. monocytogenes ist in der Lage über komplexe Regulationsmechanismen auf Umweltreize zu reagieren und die Expression der Virulenzgene über die Regulation von PrfA entsprechend den Anforderungen anzupassen.

2.5 Protein-Tyrosin-Phosphatasen bei Prokaryonten – eine Einführung

Die Regulation von Proteinaktivitäten geschieht sowohl in Eukaryonten als auch in Prokaryonten unter anderem über Phosphorylierung an Tyrosin-, Serin/Threonin- als auch Histidin-Resten. Hiervon betroffen sind sowohl Enzyme als auch regulatorische Proteine. Umfassende Untersuchungen der Protein-Phosphorylierung bei Eukaryonten zeigten vielseitige und feine Mechanismen der Aktivitätskontrolle (83, 118).

Es konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung an Serin- bzw. Threonin-Resten an vielen verschiedenen zellulären Prozessen beteiligt ist, wie z. B. dem Sekundärmetabolismus, der oxidativen Stressantwort sowie verschiedener Stoffwechselprozesse wie der Purinbiosynthese, dem Zuckertransport und -metabolismus, der Sporulation und Biofilmbildung und der Kohlenstoff-Katabolit-Repression (30). Zusätzlich spielt die Protein-Phosphorylierung auch eine wesentliche Rolle in der Virulenz pathogener Bakterien.

Über Protein-Phosphorylierungs-Prozesse bei Prokaryonten war zunächst wenig bekannt. Ende der 70er Jahre entdeckten Garnak und Reeves (56), dass die Aktivität der Isocitrat-Dehydrogenase von *E. coli* durch Serin-Phosphorylierung reguliert wird. Die Entdeckung von Zwei-Komponenten-Systemen in Bakterien Mitte der 80er Jahre (43) zeigte, dass Protein-Phosphorylierung nicht nur auf wenige Organismen beschränkt ist, sondern vielmehr als gängiger Mechanismus zur Aktivitätsregulation von Proteinen dient. In einem Zwei-Komponenten-System wird eine Histidinkinase an einem konservierten Histidin autophosphoryliert und überträgt die Phosphatgruppe anschließend auf einen konservierten Aspartat-Rest des zugehörigen Response-Regulators.

Bei Eukaryonten erfolgt die Regulation von Proteinaktivitäten häufig über Phosphorylierung von Serin-, Threonin- und Tyrosin-Resten (O-Phosphorylierung) (1, 172), und es wurde zunächst angenommen, dass Prokaryonten in dieser Hinsicht wenig mit „höheren“ Organismen gemeinsam haben. In den letzten Jahren wurden jedoch zahlreiche Übereinstimmungen zwischen den Proteinkinasen und Proteinphosphatasen eukaryontischer und prokaryontischer Organismen gefunden. Biochemische, molekulargenetische und genomische Analysen zeigten, dass prokaryontische Organismen Homologe der vorherrschenden Familie von Protein-O-Kinasen der Eukaryonten besitzen und zugleich konnten in Eukaryonten Proteine identifiziert werden, die den prokaryontischen Histidin-Kinasen und Phosphoaspartyl-Responseregulatoren ähneln.

Insgesamt ist klar geworden, dass die reversible Phosphorylierung/Dephosphorylierung zur Aktivitätskontrolle von Proteinen ein auch bei Prokaryonten weit verbreiteter Mechanismus ist (33).

2.5.1 Prokaryontische Protein-O-Kinasen

In Prokaryonten zunächst nur vier Klassen von Protein-O-Kinasen, die für die Phosphorylierung von Serin-, Threonin- und Tyrosinresten verantwortlich sind, gefunden:

1. Protein-Kinasen mit Homologien zu cAMP-abhängigen Protein-Kinasen bei Eukaryonten (83, 193).
2. Abkömmlinge von Histidin-Kinasen (43, 82)
3. die Hpr-Kinase (144, 153)
4. AceK, die Isocitrat-Dehydrogenase-Kinase / Phosphatase (82, 101)

Inzwischen hat sich dieses Spektrum sehr erweitert, so wurden kürzlich eine Ser/Thr-Phosphatase von *L. monocytogenes* bzw. eine Tyr-Phosphatase von *B. subtilis* charakterisiert (5, 124, 125).

Darüber hinaus zeigte sich, dass auch in einigen Transkriptionskontroll- und Signaltransduktionswegen von Bakterien Protein-Kinasen und -Phosphatasen involviert sind, welche nicht die kanonischen Aminosäure-Signaturen besitzen. Dies gilt beispielsweise für das Stress-relevante CtsR-Operon (86, 87), das Regulationsnetzwerk des alternativen Sigma-Faktors SigB (179) und für schon vorstehend genannten Zwei-Komponenten-Systeme.

Erst kürzlich wurde gezeigt, dass verschiedene Einzelstrang-DNA-bindende Proteine, sog. SSBs (single-stranded DNA binding proteins), verschiedenster Bakterienarten an bestimmten Tyrosinresten phosphoryliert und somit posttranslational modifiziert werden (126). Diese SSBs übernehmen eine entscheidende Rolle bei der DNA-Reparatur, der Rekombination und Replikation. Für die Protein-Tyrosin-Kinase YwqD von *Bacillus subtilis* konnte gezeigt werden, dass sie zwei verschiedene SSBs von *B. subtilis* (BsSSB und YwpH) an Tyr-82 phosphoryliert. Eine Dephosphorylierung erfolgt hier über die Protein-Tyrosin-Phosphatase YwqE (126).

2.5.2 Prokaryontische Protein-O-Phosphatasen

Bislang kennt man fünf verschiedene Familien prokaryontischer O-Phosphatasen. Die Ende der 70er Jahre entdeckte AceK (Isocitrat-Dehydrogenase-Kinase / Phosphatase) greift an einem Serinrest im aktiven Zentrum der Isocitratdehydrogenase (IDH) an und konnte bislang nur in Prokaryonten identifiziert werden.

Zu den übrigen Familien der Protein-Phosphatasen zählen die PPP- und PPM-Familien der Protein-Serin/Threonin-Phosphatasen sowie die niedermolekularen (low MW) und die konventionellen Familien der Protein-Tyrosin-Phosphatasen (PTPs). Vertreter all dieser Familien wurden erstmals in Eukaryonten entdeckt und charakterisiert (84).

Unter den konventionellen PTPs findet man so genannte „doppelspezifische“ Protein-Phosphatasen (DSPs; „dual specific phosphatases“), die in der Lage sind Phosphorylgruppen von Serin-, Threonin- und Tyrosinresten zu hydrolysieren. Beide Familien der PTPs tragen das charakteristische CX₅R-Sequenzmotiv, das das aktive Zentrum dieser Phosphatasen bildet. Der Unterschied zwischen den konventionellen PTPs und den niedermolekularen PTPs besteht hauptsächlich in der Aminosäureanordnung und der Länge der katalytischen Domäne (168).

Die meisten prokaryontischen Protein-O-Phosphatasen dienen – wie ihre eukaryontischen Gegenstücke – der Regulation der Proteinfunktion. In einigen pathogenen Bakterien existieren jedoch auch Protein-O-Phosphatasen, die als molekulare Geschosse dienen (9, 79). Diese Enzyme, die zur Familie der konventionellen PTPs gehören, werden in die Wirtszelle sezerniert, wodurch die Initiation und der Fortschritt der Infektion unterstützt werden. Dies geschieht meist durch Störung des Phosphorylierungs-Status und damit der Funktion der Wirtszellproteine. Cyanobakterien bestreiten einen alternativen Weg. Durch Entwicklung spezifischer Inhibitoren der PPP-Phosphatasen, wie zum Beispiel Microcystin LR werden die Phosphorylierungsnetzwerke anderer Organismen angegriffen. Diese Inhibitoren vermitteln eine hohe Toxizität und Mortalität gegenüber Mensch und Tier (20). Die Spezifität stellt einen weiteren Unterschied zwischen pro- und eukaryontischen Protein-O-Phosphatasen dar. Während eukaryontische Enzyme eine äußerste Substratspezifität aufweisen, tritt bei Prokaryonten eine höhere Frequenz von Doppelspezifität beziehungsweise Multifunktionalität auf (84). Auch besitzen Prokaryonten meist nur sehr wenige Protein-O-Phosphatasen; Eukaryonten hingegen weisen meist mehrere Vertreter der verschiedenen Familien von Protein-O-Phosphatasen auf.

Die konventionellen Protein-Tyrosin-Phosphatasen

Die Enzyme, die über Jahre hinweg als Protein-Tyrosin-Phosphatasen, bzw. PTPs, bezeichnet wurden, bilden in Wirklichkeit eine ganze Reihe verschiedener Enzymfamilien allerdings mit dem selben katalytischen Mechanismus (46, 150). An diesem Mechanismus ist das Sequenzmotiv Cys-Xaa5-Arg im katalytischen Zentrum beteiligt. Hier fungiert die Thiolgruppe als Nucleophil um ein Phosphocysteinyl-Intermediat auszubilden (194). In

einigem Abstand zum aktiven Zentrum ist ein Aspartat-Rest lokalisiert, der als Protonendonator bzw. -akzeptor fungiert (193). Die Lokalisation der Erkennungssequenz innerhalb der katalytischen Domäne und ihre Position relativ zu dem Aspartat-Rest gehören zu den auffälligsten Unterschieden zwischen den niedermolekularen und den konventionellen PTPs (46).

Die ungefähr 230 Aminosäuren lange katalytische Domäne der konventionellen PTPs trägt das Cys-Xaa5-Arg-Motiv in zentraler Position. N-terminal von dem nucleophilen Cystein liegt ein Histidinrest, das Arginin wird C-terminal von einem Serin- oder Threoninrest flankiert [siehe Abbildung 4] (84).

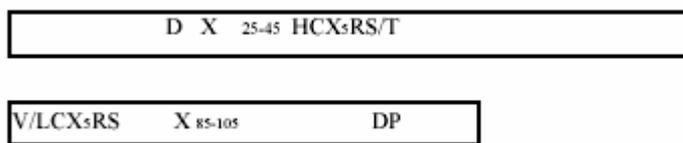


Abb. 4 Unterschiedliche Merkmale der katalyt. Domäne von konventionellen (oben) und niedermolekularen PTPs (unten)

Beispiele für konventionelle PTPs stellen YopH von *Yersinia pseudotuberculosis* und SptP von *Salmonella typhimurium* dar. Diese beiden Proteine werden exportiert / sekretiert und interagieren außerhalb der Bakterienzelle mit der Signaltransduktion der Wirtszellen. Es zeigte sich, dass die Phosphataseaktivität dieser Proteine eine entscheidende Rolle im Virulenzverhalten von *Yersinia* und *Salmonella* spielt (9).

Niedermolekulare Protein-Tyrosin-Phosphatasen (LMW-PTPs)

Niedermolekulare Protein-Tyrosin-Phosphatasen (LMW-PTPs) existieren weit verbreitet sowohl in Eukaryonten als auch in Prokaryonten und übernehmen hier wichtige Funktionen in zellulären Prozessen.

Bei niedermolekularen PTPs ist das Cys-Xaa5-Arg-Motiv sehr nahe am N-Terminus der katalytischen Domäne lokalisiert, die mit ungefähr 140 Aminosäuren oder weniger auch viel kürzer ist als bei den konventionellen PTPs. 80 bis 110 Aminosäurereste von der C-terminalen Seite des katalytischen Cysteins liegt der essentielle Aspartatrest (168).

Niedermolekulare PTPs sind an der Produktion und am Export von Exopolysacchariden (ESP) beteiligt. Solche ESPs stellen einen wichtigen Virulenzfaktor vieler Tier- und Pflanzenpathogenen dar, indem sie durch Kapselbildung Pathogene vor Phagozytose schützen (139). Zusätzlich vermutet man, dass die ESPs auch auf anderer Art und Weise zur Virulenz beitragen: In *Erwinia amylovora* und *Ralstonia solanacearum* scheint das ESP

für die anfängliche Adhäsion dieser Pathogene an das Gewebe der Pflanzenzelle notwendig zu sein (18, 27).

LMW-PTPs sind sowohl bei *Bacteria* als auch bei *Archaea* zu finden. Bislang sind nur wenige dieser Proteine charakterisiert. Dazu zählen PtpA von *Streptomyces coelicolor* und Ptp von *Acinetobacter johnsonii* (61, 108). Ptp von *A. johnsonii* dephosphoryliert die transmembrane Autokinase Ptk, die die Synthese des Hauptbestandteils der Polysaccharidkapsel reguliert (62). Generell konnte gezeigt werden, dass die Regulation der Zusammensetzung der Polysaccharidkapsel durch ein Autokinase-PTP-Paar, codiert durch *cps* oder *cps*-ähnliche Operonstrukturen, bei gram-negativen Mikroorganismen konserviert ist (185). Sowohl Wzb von *E. coli* als auch eine LMW-PTP von *Klebsiella pneumoniae* dephosphoryliert eine Tyrosin-Autokinase, die die Kapselzusammensetzung reguliert (147, 184).

Auch in gram-positiven Organismen findet man LMW-PTPs, jedoch ist nicht bekannt, ob diese ähnliche Funktionen übernehmen wie ihre gram-negativen Homologe. Die Regulation der Kapselzusammensetzung in *Streptococcus pneumoniae* und *Staphylococcus aureus* wird ebenfalls durch ein Autokinase / PTP-Paar reguliert (6, 130, 160). Jedoch konnte gezeigt werden, dass die LMW-PTP von *S. pneumoniae* zur Familie der Mn^{2+} -abhängigen PTPs gehört (129) und nicht zu den LMW-PTPs.

Die erste aus *Bacillus subtilis* identifizierte PTP YwqE gehört ebenfalls zu den Mn^{2+} -abhängigen PTPs und wird vom *cps*-Operon codiert (133). Innerhalb dieses Operons dephosphoryliert YwqE die Autokinase YwqD und YwqF, eine UDP-Glucose-Dehydrogenase. In *Bacillus subtilis* existieren zwei weitere LMW-PTPs (YwIE und YfkJ). Beide sind an der Resistenz gegen Ethanol und somit an der Stressantwort beteiligt (133).

Niedermolekulare Tyrosin-Phosphatasen können somit – vermittelt durch membranständige Proteinkinasen – an Signaltransduktions- oder Transportprozessen beteiligt sein. Es ist anzunehmen, dass noch weitere PTPs existieren, die am Virulenz-assoziierten Zellkontakt zwischen Pathogen und Wirtszelle beteiligt sind.

2.5.3 Protein-Tyrosin-Phosphatasen in *Listeria monocytogenes*

In *L. monocytogenes* existieren zwei niedermolekulare PTPs, die beide signifikante Homologien zu LMW-PTPs anderer Arten (*Bacillus*, *E. coli*, Mensch) aufweisen.

Ptp-1 (Imo0938):

Ptp-1 ist ein 151 Aminosäurereste langes Protein, das in der Region zwischen 973,5 bis 976,0 kb codiert wird (siehe Abb. 5). Es wird von Lmo0937 und Lmo0939 eingerahmt. Oberhalb von Lmo0939 befindet sich Lmo0940.

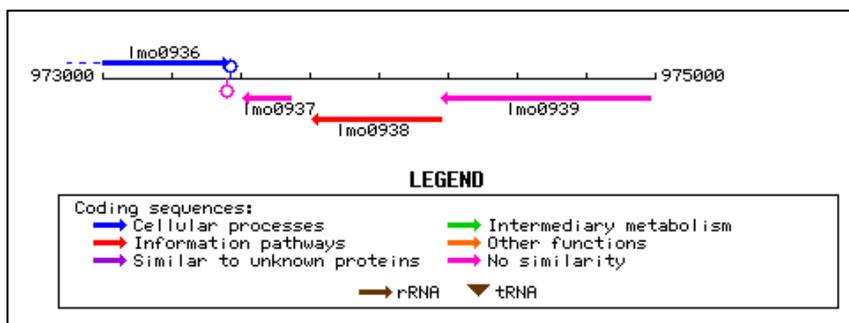


Abb. 5: Lage von *ptp-1* (*Imo0938*) im Genom von *Listeria monocytogenes*

Ptp-1 weist signifikante Homologien zu putativen LMW-PTPs aus der *Bacillus*-Gruppe (*B. anthracis* 48% Identität / 68% Ähnlichkeit; *B. subtilis* YfkJ 43 / 62% und YwIE 25 / 41%), von *N. meningitidis* (44 / 61%) und auch von Eukaryonten (*Rattus norvegicus* 46 / 61%) auf. Ptp-1 gilt nach der „N-Regel“ als stabil in *E. coli* und auch in Eukaryonten und besitzt keine abspaltbare N-terminale Signalsequenz. Mit einem pH-Wert von 6,5 gilt es als leicht sauer. Neben der PTP-Signatur wurden eine putative cAMP- und cGMP-abhängige Proteinkinase-Phosphorylierungsstelle, sowie eine Proteinkinase C-, eine Caseinkinase II- und eine Tyrosinkinase-Phosphorylierungsstelle identifiziert.

Zu jeder Phosphatase gehört normalerweise auch eine Kinase. Diese werden in *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* und auch in *E. coli* nah benachbart zu den jeweiligen Phosphatasen codiert (133). Dies ist in *L. monocytogenes* nicht der Fall. Auch ist hier bislang nicht bekannt, welche der auf dem Genom vorhandenen Proteinkinasen ein Paar mit Ptp-1 bzw. Ptp-2 bilden könnte.

3 Material

3.1 Geräte

Autoklaven
Brutschränke
Elektrophoresekammern
Elektroporationsgerät
Feinwaage
Grobwaage
Heizblock
Klettphotometer
Kühlzentrifuge
Magnetrührer
Mikroskope
Mikrowellengerät
Minizentrifuge
Netzgerät
PCR-Gerät
Real-time PCR-Gerät
pH-Meter
Photometer
Schüttelinkubatoren
Speedvac-Konzentrator
Sterilbänke
UV-Fotoanlage
Vortex

Webeco
Heräus, Memmert
Institutswerkstatt
BioRad Gene Pulser
Sartorius
Sartorius
Liebisch
Summerson
Beckmann
Hartenstein, Heidolph
Zeiss, Leitz
Siemens
Eppendorf Zentrifuge 5415C
BioRad Model 1000/500
Techne Progene
MJ Research
Metrohm, Herisau E 512
Pharmacia LKB, Ultrospec III
Heidolph, REAX 2000
Eppendorf concentrator 5301
Heräus
Mitsubishi
Heidolph REAX 2000

3.2 Verbrauchsmaterial

Chemikalien

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

Enzyme

Die verwendeten Enzyme stammten von den Firmen Appligene, Boehringer, Gibco-BRL, New England Biolabs, MBI-Fermentas, Pharmacia, Promega und Stratagene.

3.3 Medien und Agarplatten

Die Medien bzw. Agarplatten werden nach den aufgeführten Rezepten zusammengestellt und autoklaviert (20 min. bei 120°C). Nach dem Abkühlen auf unter 50°C werden Zusätze wie Antibiotika zugesetzt und die Agarplatten gegossen.

<u>LB-Medium:</u>	Select-Peptide	10,0 g
	Yeast-Extrakt	5,0 g
	NaCl	10,0 g
		ad 1000ml H ₂ O _{dest}

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

<u>BHI-Medium:</u>	BHI	37,0 g
		ad 1000ml H ₂ O _{dest}

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

3.4 Antibiotika

Antibiotika werden entweder in Ethanol und/oder H₂O_{dest} gelöst. Antibiotika, die ausschließlich in H₂O_{dest} aufgenommen werden, müssen sterilfiltriert werden. Die Antibiotikallösungen werden bei -20°C gelagert.

Antibiotikum	Stammlösung	Endkonz.	Selektion
Erythromycin	100 mg/ml in 100% EtOH	600 µg/ml 5 µg/ml	E. coli L. monocytogenes
Ampicillin	100 mg/ml in H ₂ O _{steril}	100 µg/µl	E. coli
Chloramphenicol	10 mg/ml in 50% EtOH	20 µg/ml	E. coli

3.5 Bakterienstämme

L. monocytogenes Sv 1/2a EGDe: Acc. No. ATCC BAA-679
 schwach hämolytisch (Hly^{+/+}); pathogen
 Herkunft: Hahn, Berlin
 für das „*Listeria* genome sequencing project“ verwendeter
 Ausgangsstamm
 Genomsequenz verfügbar unter: <http://genolist.pasteur.fr/ListiList>

L. monocytogenes Sv 1/2a EGDe schwach hämolytisch (Hly^{+/+}); pathogen

Δptp-1:

L. monocytogenes Sv 1/2a EGDe schwach hämolytisch (Hly^{+/+}); pathogen

Δptp-2:

L. monocytogenes Sv 1/2a EGDe schwach hämolytisch (Hly^{+/+}); pathogen

Δptp-1/2:

Herkunft: P. Herrmann, Würzburg

- E. coli TG1:*** repA+, Kan^R, sup E Δhsd-5 thi Δ (lac-proAB);
F' [traD36 pro AB+ lac1q lacZ ΔM15]
Herkunft E. Maguin, Ph.D. „Institut National de la Recherche Agronomique“, Frankreich
- E. coli DH5α:*** F-, end A1, hsdR 17, supE44, thi-1, rec A1, gyr A96, rel A1
Herkunft Bethesda Res. Lab. (BRL)
- E. coli M15:*** pREP4; Amp^R, Kan^R; Nal^R, Str^R, rif, lac, ara, recA, Uvr ,F, ara,gal, mtl; Villarejo et al., 1974
Herkunft: Lehrstuhl für Mikrobiologie, Universität Würzburg
- E. coli XL1blue:*** supE44, hsdR17, recA1, endA1, gyrA46, thi, relA1, lac-, F' ,[proAB, lacIq, lacZ, DeltaM15, Tu (tetr)] ; Bullock et al., 1987
Herkunft: Lehrstuhl für Mikrobiologie, Universität Würzburg

3.6 Plasmide

- pG⁺ Host4:*** Mutageneseplasmid (4,6 kb); pGK12-Derivat; besitzt gram-positiven, temperatursensitiven Origin aus pVE6002 (bei 28°C aktiv, über 37,5°C inaktiv);
verfügt über eine „broad-host-range“ in gram-positiven Bakterien, kann aber auch in *E. coli* replizieren
Multiple cloning site aus pBluescript, Em^R aus pE 194
Herkunft: E. Maquin, PH.D. “Institut Nationale de la Recherche Agronomique“, Frankreich
- pQE-30:*** Expressionsplasmid (3,4 kb) zur Überexpression von N-terminalen His-tag-Proteinen mit IPTG-induzierbarem Promotor ; Amp^R
Herkunft: Qiagen (Hilden, Germany)

3.7 Oligonukleotide

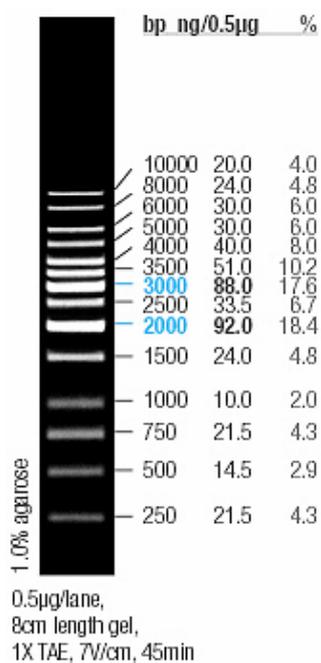
Bezeichnung	Sequenz [5' --> 3']	Zielgen
inIA-qRT-F	TGT GAC TGG CGC TTT AAT TG	inIA
inIA-qRT-R	TCC AAT AGT GAC AGG TTG GCT A	inIA
inIB-qRT-F	AAA AGC AAG ATT TCA TGG GAG A	inIB
inIB-qRT-R	TCG GAG GTT TAG GTG CAG TT	inIB
inIC-qRT-F	GCC TAG CGA ATG CAG TGA A	inIC
inIC-qRT-R	CCC GCA AGA GAT TGA ATG TT	inIC
inIG-qRT-F	TTG GGT GTA TCT TCC AAT CAG A	inIG
inIG-qRT-R	TAA CTG TGT CAA TCC TGA AAG TGG	inIG
inIH-qRT-F	GGG TTA CAA AGC ATA AAA ACG C	inIH
inIH-qRT-R	GCG GGC TTA TAT TGG TTA TTT G	inIH
inIE-qRT-F	CGC TTG CAA AAT TAC CCA AC	inIE
inIE-qRT-R	AAA TAC GGG TTG GTT GGT GA	inIE
opuCA-qRT-F	AAA CTG GCA GAC CGT ATC GT	opuCA
opuCA-qRT-R	TCG CTT CGA TTA AGC GAT CT	opuCA
opuCB-qRT-F	TTC AAG AAA ACG GCC ATA ACT T	opuCB

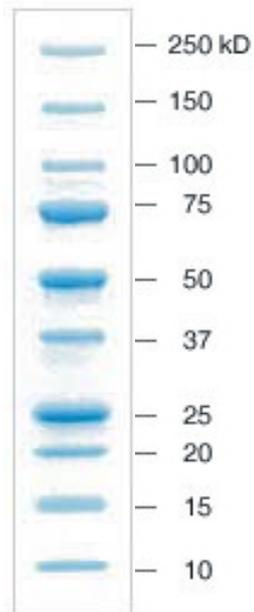
Bezeichnung	Sequenz [5' --> 3']	Zielgen
opuCB-qRT-R	TAC TTT TGG TGA ACG CGT GA	opuCB
opuCC-qRT-F	CAG ATT TAG TTG GTC CGC TAG G	opuCC
opuCC-qRT-R	CGT ATT CGC AAA ACC GTA AGA	opuCC
opuCD-qRT-F	CTT ACG GAG TTA TCT TCG CAG C	opuCD
opuCD-qRT-R	ATT GCT AGT GCC GGA ATT GT	opuCD
rpoB-qRT-F	CAC CCT GAA GCT CCA TTT GT	rpoB
rpoB-qRT-R	ACA CGA CGA ACC CAG ATT TC	rpoB
0782-qRT-F	TAT TTC GCT TGC GAT TCC TC	lmo0782
0782-qRT-R	TCG AGA CTC CGC AGA TTA CC	lmo0782
0783-qRT-F	CCT CGT AGA AGC GGG TGT AA	lmo0783
0783-qRT-R	CTA ATT TGC GGA ATG CTG CT	lmo0783
0784-qRT-F	TCG GCA AAC AGG ACA ATG TA	lmo0784
0784-qRT-R	CCG CCA AAT AAA TCA ACC AT	lmo0784
0722-qRT-F	CGT CTT AAC GAT TCC AAA CGA	lmo0722
0722-qRT-R	TCA ATC AGT GTT ACG GCT TCC	lmo0722
0723-qRT-F	GTG AAA TCT TCG AGC GAC AAC	lmo0723
0723-qRT-R	TCT TTC ATG CTA CCG ATT TGG	lmo0723
0554-qRT-F	CAG CTC TTA AAT CAC GCG AAG	lmo0554
0554-qRT-R	CCA CCG ACT GCA AGT AAA AAG	lmo0554
0555-qRT-F	GAT TTG GAC GAA ACT TGG TGA	dtpT / lmo0555
0555-qRT-R	TGT TGT CGT GTT TCC GTG TAA	dtpT / lmo0555
1421-qRT-F	ATT TCA TCA ACG GAG CCT GT	lmo1421
1421-qRT-R	GCG CTA AGA ATT GCA TCA CA	lmo1421
1433-qRT-F	CTC ATC GGA GCA AGA GAA GC	lmo1433
1433-qRT-R	CTG GCA CAT TCT CGA CAA AA	lmo1433
mpl-qRT-F	ATT TGC AGC AAG GAC AGC TT	mpl
mpl-qRT-R	TTT CAC TGG GTT TCC GAC AT	mpl
prfA-qRT-F	ACG GGA AGC TTG GCT CTA TT	prfA
prfA-qRT-R	TGC GAT GCC ACT TGA ATA TC	prfA
plcA-qRT-F	CGA GCA AAA CAG CAA CGA TA	plcA
plcA-qRT-R	CCG CGG ACA TCT TTT AAT GT	plcA
hly-qRT-F	CCG CCA AGA AAA GGT TAC AA	hly
hly-qRT-R	TCG CTT TTA CGA GAG CAC CT	hly
actA-qRT-F	ATA GCG CAG CGG AAA TTA AA	actA
actA-qRT-R	AAG CAT CCG CAA CTG ACT CT	actA
plcB-qRT-F	AAA GCG GAC TAC CCG AAA AT	plcB
plcB-qRT-R	AAC CTG CCA AAG TTT GCT GT	plcB
Ptp1-qRT-F	GGG CTG ACG GAT GAA ATA AA	Ptp-1 (lmo0938)
Ptp1-qRT-R	AAA TTT TTC GAG CAC GCA TC	Ptp-1 (lmo0938)
Ptp2-qRT-F	GGG GAC GCT ATC TCT GAA AAC	Ptp-2 (lmo2540)
Ptp2-qRT-R	TCC GCT TGA TGA TTT TGA GTC	Ptp-2 (lmo2540)
1800-qRT-F	ACC GAG CAA ACA CTC AAA CC	lmo1800
1800-qRT-R	GTT AGC GAG TTC GGC ACT TC	lmo1800
1820-qRT-F	GTT ACC AAA ACG CGG AAG AA	lmo1820
1820-qRT-R	CTT TTG TTG CGA TGA TTG GA	lmo1820
1935-qRT-F	CGG AAG TTA AAG CAC AAC CAA	lmo1935
1935-qRT-R	TCT CCC ATC AAC GGT TCA TAA	lmo1935
degU-qRT-F	TGC CAA CTG TGA ACG GAC TA	degU /lmo2515
degU-qRT-R	CCG ACT GCT CCA GCT CTA AG	degU /lmo2515
0938-pQE-Bam	ATC GGA TCC GTA AAA GTA GTT TTT GTA TG	Ptp-1 / lmo0938
0938-pQE-Hind	TGA AAG CTT CTA TTT TTT TGT AAT ATA GG	Ptp-1 / lmo0938
2540-pQE-Bam	ATC GGA TCC AAC GTC TTA TTT GTT TGT ACA G	Ptp-2 / lmo2540

Bezeichnung	Sequenz [5' --> 3']	Zielgen
2540-pQE-Hind	TGA AAG CTT TTA TAG AAA ACG TTC GGA AA	Ptp-2 / lmo2540
1820-pQE-Bam	ATT GGA TCC ATG ATG ATT GGT AAG CGA TT	lmo1820
1820-pQE-Pst	TTA CTG CAG TTA ATT TGG ATA AGG GAC TG	lmo1820
pQE30-F	GAG CGG ATA ACA ATT TCA CAC	pQE30
pQE30-R	AAT CCA GAT GGA GTT CTG AGG	pQE30
sod-N	CTT ATG ATG CTT TGG AGC CG	Sod
sod-C	GTT CCC AAA CAT CTA AGC C	Sod
rpoB-N	GCG GAT GAA GAG GAT AAT TAC G	rpoB
rpoB-C	GGA ATC CAT AGA TGG ACC GTT A	rpoB

3.8 Größen- und Molekulargewichtsstandards

GeneRuler™ 1kb DNA Ladder (Fermentas):



Precision Plus Protein™ Standard (Bio-Rad Laboratories, Germany)**3.9 Kits**

Nucleobond® AX Purification of Plasmids (MACHEREY-NAGEL)

QIAquick™ PCR Purification Kit (QIAGEN)

RNeasy Mini Kit (Qiagen)

qPCR Core Kit for Sybr Green I (EUROGENTEC)

JumpStart Taq Ready Mix (Sigma)

4 Methoden

Soweit nicht anders angegeben, stammen die hier angeführten Methoden aus dem Laborhandbuch Sambrook et al., 1989. Die genannten Puffer und Lösungen werden, wenn nicht anders angegeben, autoklaviert (20 min. bei 120°C).

4.1 Molekulargenetische Methoden

4.1.1 Isolierung chromosomaler DNA aus *Listeria*

- ⇒ Es werden 2 ml einer Übernachtskultur verwendet
- ⇒ Nach einem Zentrifugationsschritt von 5 Min., 15.000g bei RT wird der Überstand verworfen und das Pellet in 1 ml 10mMTris/HCl (pH 8.0) resuspendiert
- ⇒ Es erfolgt Zugabe von 2 mg/ml Lysozym und 20 U/ml Mutanolysin
- ⇒ Der Ansatz wird 30 Min. bei 37°C inkubiert und anschließend 5 Min. , 15.000g, RT abzentrifugiert
- ⇒ Der Überstand wird verworfen und das Pellet vorsichtig in 750µl DNAzol® aufgenommen (Pipettenspitze abschneiden!)
- ⇒ Nach Zentrifugation (2 Min., 15.000g, RT) wird der Überstand in ein neues Cap überführt, mit ½ Vol. 100% EtOH versetzt und durch Invertieren gemischt (DNA fällt aus)
- ⇒ Mit einer Impföse wird der DNA-Faden herausgefischt und in 500µl 75% EtOH gewaschen
- ⇒ Nach Zentrifugation (10 Min., 15.000g, 4°C) wird der Überstand verworfen und das Pellet zweimal mit 700µl 75% EtOH p.a. gewaschen
- ⇒ Das Pellet wird an der Luft getrocknet, anschließend in 200µl 8mM NaOH aufgenommen und im Kühlschrank aufbewahrt.

4.1.2 Isolierung von Plasmid-DNA

Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* mit dem Nucleobond AX-Midiprep-Kit (Macherey-Nagel)

- ⇒ Es werden 100 ml Bakterien-Übernachtskultur verwendet. Die Durchführung erfolgte genau nach dem Protokoll des Herstellers.

4.1.3 Herstellung von Bakterien-Zelllysate

- ⇒ in einem Eppendorfcap werden 50 µl steriles H₂O_{dest} vorgelegt.
- ⇒ man entnimmt etwas Bakterienmaterial von einer Agarplatte und resuspendiert dieses in dem vorgelegten Volumen an H₂O_{dest}
- ⇒ die Lösung wird 10 min. bei 110°C gekocht und anschließend bei 15000 rpm, 5 min. bei RT abzentrifugiert
- ⇒ der Überstand kann als Template für eine PCR-Reaktion genommen werden

4.1.4 Reinigung von DNA

Reinigung von PCR-Produkten

Die PCR-Produkte werden unter Verwendung des QIAquick PCR Purification Kits (QIAGEN) gereinigt.

- ⇒ das PCR-Produkt wird mit dem 5fachen Volumen an PB-Puffer versetzt und der gesamte Ansatz auf eine QIAquick spin Säule geladen
- ⇒ nach einem Zentrifugationsschritt von 30 s (15000 rpm; RT) wird die durchgeflossene Fraktion verworfen (das gewünschte PCR-Produkt bindet an die Säule)
- ⇒ die Säule wird mit 0,75 ml PE-Puffer gewaschen und nach kurzem Abzentrifugieren (30s; 15000 rpm; RT) in ein neues Sammelcap gegeben
- ⇒ das PCR-Produkt wird mit 30-50 μl $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ aus der Säule eluiert
- ⇒ um eine höhere Ausbeute zu erhalten, kann das Eluat nochmals auf die Säule gegeben und diese nochmals abzentrifugiert werden
- ⇒ man fängt das PCR-Produkt in einem Eppendorfcap auf, welches dann bei -20°C gelagert wird

4.1.5 Konzentrationsbestimmung chromosomaler DNA

Nukleinsäuren besitzen ein Absorptionsmaximum bei 260 nm. Deshalb können durch Messung der optischen Dichte am Photometer DNA-Konzentration und –Reinheit bestimmt werden.

- ⇒ die DNA-Probe wird 1:100 mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ verdünnt und die Extinktion bei 260, 280 und 320 nm Wellenlänge gemessen
- ⇒ die Berechnung der Konzentration erfolgt nach folgender Formel:

$$\begin{aligned} \text{DNA-Konzentration } [\mu\text{g}/\mu\text{l}] &= (\text{OD}_{260\text{nm}} - \text{OD}_{320\text{nm}}) \times 5 \text{ (dsDNA)} \\ &= (\text{OD}_{260\text{nm}} - \text{OD}_{320\text{nm}}) \times 3 \text{ (ssDNA)} \end{aligned}$$

Der Quotient aus $\text{OD}_{260\text{nm}}/\text{OD}_{280\text{nm}}$ gibt Auskunft über die Reinheit und sollte zwischen 1,5 und 2,0 liegen.

4.1.6 Elektrophoretische Auftrennung von DNA

Aufgrund ihrer elektrischen Ladung lassen sich DNA-Fragmente unterschiedlicher Größe mittels Gelelektrophorese auftrennen. Um DNA-Fragmente sichtbar zu machen, wird dem Agarosegel Ethidiumbromid zugesetzt, welches in doppelsträngige DNA interkaliert. Unter einer UV-Lampe lassen sich so fluoreszierende DNA-Fragmente in Form von Banden sichtbar machen.

Das Wanderungsverhalten der DNA hängt von folgenden Faktoren ab:

- ⇒ Größe der dsDNA: Je größer das DNA-Fragment ist, desto langsamer wandert es in Richtung der Anode
- ⇒ Konformation der dsDNA: Relaxierte DNA wandert langsamer als die ringförmige superhelikale Form
- ⇒ Agarosegelkonzentration: Je nach Agarosegelkonzentration können 0,2 bis 20 kb große DNA-Fragmente aufgetrennt werden. Ein 1%iges Agarosegel eignet sich für die Auftrennung von DNA-Fragmenten mit einer Länge von 400 bis 1000 bp
- ⇒ Stromstärke und Puffer

50 x TAE-Puffer:	Tris	242,0 g
	Eisessig	57,1 ml
	EDTA 0,5 M pH 8,0	100 ml
	<hr/>	
		ad 1000 ml H ₂ O _{deion}
10 x Probenpuffer:	Bromphenolblau	0,2%
	EDTA	0,2 M
	Glycerin	50,0%

Herstellung eines 1%igen Agarosegels

- ⇒ als Laufpuffer dient 1 x TAE (Tris-Acetat-EDTA) oder 1 x TBE (Tris-Borat-EDTA)
- ⇒ 1,0 g Agarose wird in 100 ml Laufpuffer kurz aufgeköcht, bis sich die Agarose vollständig gelöst hat
- ⇒ nach dem Abkühlen auf ca. 50°C gießt man das Gel in eine Gelkammer mit eingesetztem Kamm und lässt es 30 – 45 min. bei RT auspolymerisieren
- ⇒ die DNA-Proben werden mit 1/10 Vol. Probenpuffer gemischt und in die Geltaschen pipettiert
- ⇒ die elektrophoretische Auftrennung erfolgt bei 160 V für ca. 40 min.
- ⇒ das Gel wird in einem Ethidiumbromid-TAE-Bad (500 ml TAE + 50 µl EtBr [10mg/ml]) für ca. 15 min. gefärbt, anschließend unter der UV-Lampe betrachtet und die aufgetrennten DNA-Fragmente fotografiert

4.1.7 Polymerase Chain Reaction (PCR)

4.1.7.1 Klassische PCR

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) stellt ein automatisiertes Verfahren zur Vervielfältigung eines beliebigen DNA-Abschnitts zwischen zwei Oligonukleotid-Primern, die gegenläufig an komplementäre Stränge gebunden sind, dar. Voraussetzung ist also, dass ca. 20 bp aus den Endbereichen der zu amplifizierenden DNA bekannt sind. Es werden hitzestabile Polymerasen, wie z.B. die Taq-Polymerase aus *Thermus aquaticus*, die Tfl-Polymerase aus *Thermus flavus* oder die Tth-Polymerase aus *Thermus thermophilus*, verwendet. DNA-Polymerasen benötigen einen kurzen doppelsträngigen Bereich mit freiem 3'OH-Ende, um komplementäre DNA-Sequenzen zu synthetisieren. Entstandene DNA-Synthese-Produkte werden bei 94°C denaturiert und nach Hybridisierung der Oligonukleotide (i.d.R. bei 48-60°C) amplifiziert.

Die Zyklen aus Denaturierung, Hybridisierung („Annealing“) und DNA-Synthese („Elongation“) werden wiederholt, wodurch eine exponentielle Vermehrung der Zielsequenz möglich wird.

Als Template kann gereinigte chromosomale DNA, isolierte Plasmid-DNA oder Bakterien-Zelllysate dienen.

Die Schritte sehen im Einzelnen wie folgt aus:

- ⇒ Denaturierung: Doppelsträngige Ausgangs-DNA (dsDNA) wird durch Erhitzen auf 94°C in einzelsträngige DNA (ssDNA) überführt
- ⇒ Annealing: Hybridisierung eines bzw. mehrerer (i. d. R. zwei) für die Zielsequenz spezifischer Oligonukleotid-Primer an komplementäre Sequenzen; die in diesem Schritt gewählten Temperaturen hängen von der Schmelztemperatur und der Homologie der Oligonukleotide ab und liegen normalerweise zwischen 48°C und 60°C
- ⇒ Elongation: Polymerisation (Vervielfältigung) der zwischen den Oligonukleotidprimern liegenden DNA-Sequenz an den 3'OH-Enden der Primer durch die thermostabile Polymerase bei 72°C; die Elongationszeit sollte ungefähr 1 min. pro 1 kb DNA betragen

Standard-PCR-Ansatz

10x Polymerase-Puffer + MgCl ₂ (Appligene)	5,0 µl
dNTPs 20 mM	0,5 µl
Primer I (100 µM)	0,4 µl
Primer II (100 µM)	0,4 µl
Taq-Polymerase (5U/µl)	0,1 µl
Template-DNA	2,0 µl (100-500 ng)
ad 50 µl H ₂ O _{steril}	

Je nach verwendeten Primern und Template variieren die am Thermocycler eingegebenen Bedingungen. Als Standardbedingungen, unter denen meist positive Ergebnisse erzielt werden, gelten folgende:

Standard-PCR-Bedingungen

3 min. 94°C first step delay

30 Zyklen:

30 s	94°C	Denaturierung
30 s	55°C	Annealing
1 min.	72°C	Elongation

3 min. 72°C last step delay

Für die Auswahl der Oligonukleotide gelten folgende Kriterien:

- ⇒ GC-Gehalt ca. 50%
- ⇒ ideale Länge 18-28 bp
- ⇒ palindromische Sequenzen vermeiden
- ⇒ Homologien der Primer zueinander vermeiden
- ⇒ G oder C am 3'OH-Ende zur Stabilisierung des in der PCR entstehenden Hybrids, jedoch längere GC-Abfolge am 3'OH-Ende vermeiden

Die Schmelztemperatur (T_m) der Primer lässt sich nach folgender Faustformel berechnen:

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

Diese Formel gilt nur für Primer mit Längen zwischen 18 und 24 Nukleotiden. Die optimale Annealing-Temperatur liegt ca. 2-5°C unter dem niedrigeren beider berechneter Schmelzpunkte. Sollten unspezifische PCR-Produkte amplifiziert werden, erhöht man am besten die Annealing-Temperatur. Fehlt das Produkt, wird die Temperatur erniedrigt. Geht man von einer sehr geringen Template-Konzentration aus oder möchte eine größere Produktausbeute erzielen, kann die Anzahl der Zyklen angehoben werden.

PCR mit Bakterienlysat

Ein spezifischer Test mehrerer Klone mittels PCR wird durch den Einsatz von Lysat-DNA ermöglicht:

- ⇒ ein bzw. mehrere Klone (bei Sammel-PCR) werden in 50-100 µl H₂O_{dest} gelöst und 10 min. bei 110°C gekocht
- ⇒ anschließend werden die Zelltrümmer abzentrifugiert (15000 rpm; 5 min; RT) und der Überstand als Template eingesetzt (2-5 µl Lysat für ein Ansatzvolumen von 50 µl)

4.1.7.2 Quantitative Real-time RT-PCR

Die quantitative Real-time RT-PCR stellt die modernste Methode der Quantifizierung von Nucleinsäuren dar. Hierbei werden nicht absolute Mengen an PCR-Produkt gemessen, sondern man nutzt die Kinetik der PCR-Reaktion aus: in den frühen Zyklen treten meist nur nicht-detektierbare Mengen an PCR-Produkt auf, und auch die späten Zyklen (sog. Plateauphase) sind weitgehend uninformativ. Die quantitative Information in einer PCR-Reaktion wird von den wenigen Zyklen geliefert, in denen die DNA-Menge logarithmisch vom Background bis in die Plateauphase hinein ansteigt. Oft fallen nur 4 oder 5 von 40 Zyklen in diesen "log-linearen" Teil der Kurve. Man kann die Information aus diesen wenigen Zyklen dadurch erhalten, dass man die Probe in Aliquots unterteilt und nach jedem Zyklus eines dieser Aliquots entnimmt. Über eine gelelektrophoretische Auftrennung wird der Anteil an PCR-Produkt mittels Fluoreszenzfärbung des Gels quantifiziert. Man verwendet zum Färben des Gels entweder Ethidiumbromid oder SYBR®GREEN I. Beide Farbstoffe interkalieren in doppelsträngige DNA und können so PCR-Produkte sichtbar machen. Die Helligkeit des Fluoreszenzsignal wird gemessen und die Fluoreszenz gegen die Zyklenzahl in einem Diagramm aufgetragen. Durch die Mitführung von Standardwerten mit bekannten DNA-Konzentrationen können DNA-Mengen anhand der gemessenen Fluoreszenzsignale quantifiziert werden.

Die Quantifizierung mit Hilfe eines LightCyclers™ vereinfacht diesen Prozess. Die Fluoreszenz der Proben wird kontinuierlich nach jedem Zyklus gemessen. Man verwendet SYBR®GREEN I, einen Farbstoff, der vermutlich in die kleine Furche der DNA bindet. SYBR®GREEN I besitzt im nicht gebundenen Zustand eine relativ niedrige Fluoreszenz.

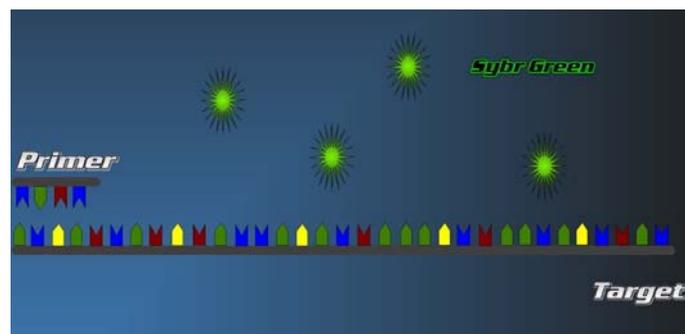


Abb. 8: Der Reaktionsansatz enthält DNA, Primer und SYBR®GREEN I

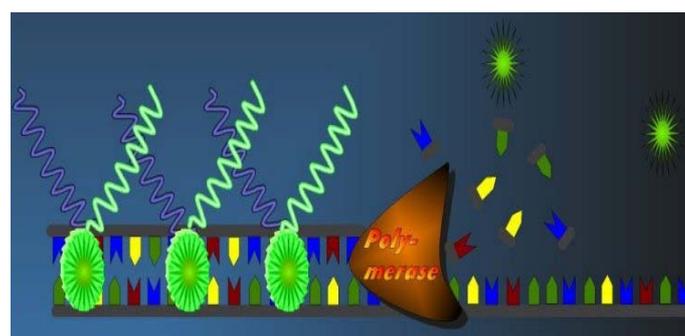


Abb. 9: SYBR®GREEN I interkaliert in dsDNA und emittiert Licht

Wenn die DNA-Menge in der PCR-Reaktion ansteigt, steigt proportional auch die Fluoreszenz des Farbstoffs.

SYBR®GREEN I ist einfach zu verwenden, da es keine Sequenzspezifität besitzt, dadurch aber auch an jedes doppelsträngige Produkt bindet, egal ob es sich dabei um das gewünschte Produkt oder ein unspezifisches Nebenprodukt handelt. Um ausschließen zu können, dass die Fluoreszenz aus unspezifischen Nebenprodukten resultiert, wird im Anschluss an die PCR-Reaktion eine Schmelzkurve durchgeführt. Ist die Schmelztemperatur des gewünschten Produkts erreicht, kann eine starke Verringerung des Fluoreszenzlevels detektiert werden.

Unspezifische Produkte schmelzen meist bei niedrigeren Temperaturen als die längeren spezifischen Produkte. Dies ermöglicht es Fluoreszenzsignale aus unspezifischen Produkten aus der Messung auszuschließen.

Reaktionsansatz für Real-time PCR

10x Reaktionspuffer	5,0 µl
MgCl ₂ 50 mM	3,5 µl
dNTPs 5,0 mM	2,0 µl
Forward Primer (100 µM)	0,5 µl
Reverse Primer (100 µM)	0,5 µl
Hot GoldStar Polymerase (0,025 U/µl)	0,25 µl
SYBR®GREEN I stock (1/2000 in DMSO)	1,5 µl
Template	4,0 µl
<hr/>	
	ad 50 µl H ₂ O _{steril}

Standardbedingungen für Real-time PCR

10 min.	94°C	first delay
40 Zyklen		
15 s	94°C	
1 min.	60°C	

4.1.8 Restriktionsverdau von DNA

Restriktionsendonukleasen sind Bestandteil des Restriktions-/Modifikations-Systems, das Bakterien vor der Aufnahme artfremder DNA schützt, gleichzeitig aber genetische Variabilität durch die Aufnahme fremder DNA in niedriger Frequenz gewährleistet. Die verwendeten TypII-Restriktionsendonukleasen ermöglichen sequenzspezifisches Schneiden von dsDNA. Es werden – abhängig vom verwendeten Restriktionsenzym – unterschiedliche Puffer- und Temperaturbedingungen (37°C und 30°C) benötigt.

1 Unit Restriktionsenzym spaltet bei optimalen Reaktionsbedingungen 1µg DNA pro Stunde. Es wird zwischen dem partiellen Verdau, bei dem geringe Enzymmengen eingesetzt werden, und dem vollständigen Verdau, bei dem ein Überschuss an Restriktionsenzym eingesetzt wird, unterschieden.

Verdau von Plasmid-DNA / PCR-Fragmenten (Standardansatz)

Plasmid-DNA	1 µg
10x-Puffer	4 µl
Restriktionsenzym	1-2µl (10-20 Units)
<hr/>	
	ad 20 µl H ₂ O _{steril}

Normalerweise wird der Verdau 1 bis 2 h bei 37°C inkubiert. Die Kontrolle des Verdaus erfolgt bei Plasmid-DNA über elektrophoretische Auftrennung auf einem Agarosegel (→ 4.6).

4.1.9 Ligation von DNA-Fragmenten

Zur Herstellung rekombinanter DNA-Moleküle wird neben den Restriktionsenzymen noch die T4-DNA-Ligase benötigt. Dieses Enzym fügt unter ATP-Verbrauch freie 3'-OH-Enden mit 5'-Phosphatenden von dsDNA zusammen. Es können sowohl überhängende („sticky-ends“) als auch glatte („blunt-ends“) Enden miteinander verbunden (ligiert) werden. Rekombinante DNA-Moleküle werden häufig durch Einfügen eines speziellen DNA-Fragments (Insert) in einen Klonierungsvektor gewonnen. PCR-Produkte können entweder „sticky-end“ durch über Primer eingeführte Schnittstellen mit Vektoren ligiert werden oder „blunt-end“ nach Blunting/Kinasing in einen glatt geschnittenen Vektor inseriert werden.

In dieser Arbeit soll über einen Mutagenesevektor (pG+Host4) eine Insertionsmutante hergestellt werden. Dazu wurden mit Primern Schnittstellen mittels PCR in die angrenzenden Bereiche des Zielgens eingeführt, wobei bis zu 2 „mismatches“ gegenüber der Originalsequenz toleriert wurden, um die Schnittstellen innerhalb der Primersequenz zu konstruieren. Das erforderliche Insert wurde mittels der konstruierten Primer in einer PCR amplifiziert, mit den entsprechenden Restriktionsendonucleasen verdaut und anschließend in den, mit den gleichen Enzymen geschnittenen, Vektor ligiert.

Es wurden unterschiedliche Vektor:Insert-Verhältnisse getestet und schließlich ein Verhältnis von 1:10 für eine erfolgreiche Ligation gewählt.

Ligation kohäsiver Enden

geschnittener Vektor	0,05 µg
geschnittenes Insert	0,45 µg
10 x T4-DNA-Ligase-Puffer	2 µl
T4-DNA-Ligase (5 U / µl)	1 µl
	<hr/>
	ad 10 µl H ₂ O _{steril}

Die Ligationsansätze werden über Nacht bei 16°C inkubiert und anschließend der gesamte Ansatz für eine Transformation in E. coli (--> 4.1.10.2) eingesetzt.

Ligation kohäsiver Enden mit der T4-DNA-Ligase (Promega)

geschnittener Vektor	0,02 µg
geschnittenes Insert	0,08 µg
2 x Rapid Ligation buffer	5 µl
T4-DNA-Ligase (3U/µl)	1 µl
	<hr/>
	ad 10 µl H ₂ O _{steril}

4.1.10 Transformation in E. coli

4.1.10.1 Herstellung chemisch kompetenter E. coli-Zellen

Lösung I:	MgSO ₄	10mM (steril filtriert)
	Glucose	0,2 % (steril filtriert)
		<hr/>
		ad 100 ml LB-Medium

Lösung II:	MgSO ₄	12 mM (steril filtriert)
	Glycerin	36,0 % (steril filtriert)
	PEG MW 7500	12,0 % (steril filtriert)
	<hr/>	
	ad 100 ml LB-Medium	

- ⇒ eine Übernachtskultur von E. coli wird 1:100 in Lösung I verdünnt und im Schüttler bei 37 °C bis zur mittleren logarithmischen Phase (100-150 Klett) angezogen
- ⇒ die Zellen werden in Greinerröhrchen umgefüllt, 10 min. auf Eis gestellt und anschließend abzentrifugiert (6000 rpm, 4°C, 10 min.)
- ⇒ das entstandene Pellet wird in 0,5 ml Lösung I resuspendiert, es werden 2,5 ml Lösung II dazugegeben und Aliquots von je 100 µl bei -80°C eingefroren

4.1.10.2 Transformation von Plasmid-DNA in E. coli

- ⇒ der gesamte Ligationsansatz wird zu 100 µl kompetenter E. coli-Zellen gegeben und 30 bis 60 min. auf Eis inkubiert
- ⇒ der Ansatz wird anschließend 90 s in einen 42°C warmen Heizblock gestellt und danach 2 min. auf Eis gestellt
- ⇒ es werden 800 µl LB-Medium zugegeben und der Ansatz bei 37°C im Schüttler inkubiert; zur Ausprägung von Antibiotikaresistenzen, wie z.B. Ampicillin, wird normalerweise 1h lang inkubiert, bei Erythromycin muss dagegen 4 bis 5h lang inkubiert werden
- ⇒ auf einer vorgewärmten LB-Selektionsplatte werden je 100 µl des Transformationsansatzes ausplattiert und die Platten über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert
- ⇒ die gewachsenen Klone werden in Selektivmedium gepickt und mittels PCR getestet

4.1.10.3 Herstellung elektrokompenter E. coli-Zellen

- ⇒ 1 ml einer E. coli-Übernachtskultur wird mit 40 ml LB-Medium verdünnt und bei 37°C im Schüttler bis zu einer optischen Dichte von OD₆₀₀=0,6 angezogen
- ⇒ der Ansatz wird 30 min. auf Eis inkubiert und anschließend auf 2x 20 ml aufgeteilt
- ⇒ die Zellen werden bei 5200 rpm, 4°C, 10 min. abzentrifugiert
- ⇒ das Pellet wird mit 20 ml kaltem H₂O_{dest} gewaschen und erneut abzentrifugiert (5200 rpm, 4°C, 10 min.)
- ⇒ der Überstand wird abgenommen, die beiden Pellets vereinigt und nochmals in 10 ml kaltem H₂O_{dest} gewaschen
- ⇒ nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (5200 rpm, 4°C, 10 min.) wird der Überstand abgenommen und das Pellet in 200 µl 10% Glycerin gelöst
- ⇒ der Ansatz wird in 50 µl-Portionen aliquotiert und bei -80°C aufbewahrt.

4.1.10.4 Elektrottransformation von E. coli

- ⇒ 1-2 µl des Ligationsansatzes werden zu 50 µl elektrokompenter E. coli- Zellen gegeben
- ⇒ der Ansatz wird 10 min. auf Eis inkubiert
- ⇒ der Puls erfolgt bei 2,5 kV; 25µF; 200 Ohm
- ⇒ sofort nach dem Puls werden 500 µl kaltes SOC-Medium dazugegeben, resuspendiert und anschließend je nach Antibiotikaresistenz bei 37°C im Schüttler inkubiert (1h bei Ampicillin, o.ä.; 4-6h bei Erythromycin)
- ⇒ auf einer vorgewärmten LB-Selektionsplatte werden je 100 µl des Transformationsansatzes ausplattiert und die Platten über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert

4.1.11 Elektroporation in Listerien (140)

Herstellung kompetenter Listerien

<u>SMHEM-Medium (3,5 x):</u>	Saccharose	952 mM
	MgCl ₂	3,5 mM
	HEPES	7 mM

- ⇒ eine Listerien-Übernachtskultur wird 1:20 mit BHI-Medium verdünnt
- ⇒ nach Inkubation bei 37°C bis 90 Klett erfolgt Zugabe von Penicillin G (5 µg/ml)
- ⇒ es wird erneut bei 37°C bis 120 Klett inkubiert
- ⇒ die Bakterienzellen werden abzentrifugiert (6000 rpm; 4°C; 10 min.) und anschließend zweimal in 1/10 Vol. 3,5 x SMHEM-Medium gewaschen
- ⇒ nach dem letzten Waschschrift wird das Bakterienpellet in 1/100 Vol. SMHEM resuspendiert und dann in 200 µl-Portionen bei -80°C eingefroren

Elektroporation in kompetente Listerien

- ⇒ 100 µl kompetente Listerien werden mit 4 µg Plasmid-DNA in einer vorgekühlten Elektroporationsküvette gemischt und 1 min. auf Eis inkubiert
- ⇒ die Elektroporation erfolgt bei 100 Ohm, 25 µF Kondensator und 10 kV (entspricht 2 kV bei 0,2 cm-Küvette)
- ⇒ anschließend wird 1 ml BHI-Medium zupipettiert
- ⇒ die Zwischenzüchtung erfolgt 1h bis 5h bei 30°C (je nach Antibiotikaresistenz: Ampicillin: 1h; Erythromycin: 6h)
- ⇒ die Zellen werden auf den entsprechenden Selektionsplatten ausplattiert und für 1-3 Tage bei 30°C inkubiert

4.1.12 Mutagenese durch homologe Rekombination (192)

Die homologe Rekombination zwischen einem rekombinanten Plasmid und dem bakteriellen Chromosom ist eine gängige Methode, um mit Hilfe eines temperatursensitiven (ts) Vektors Deletions- oder Insertionsmutanten herzustellen. Ein solcher Vektor kann aufgrund seines ts-Origins in gram+ Bakterien (Listerien) nur bei 25-30°C, kaum aber bei 37°C und überhaupt nicht bei 42°C replizieren. Das listerielle Chromosom kann jedoch auch noch bei 37°C und darüber replizieren. Wurden zuvor in den Vektor zum Genom der zu mutierenden Bakterien homologe Bereiche inseriert, so kann zufällig, über homologe Rekombination, eine Integration des rekombinanten Plasmids (Vektor plus Insert) ins bakterielle Chromosom erfolgen. Da das „freie“, d.h. extrachromosomale, rekombinante Plasmid bei 37°C oder darüber nicht replizieren kann, können homologe Rekombinanten über Anzucht bei 37°C (bzw. 42°C) auf Antibiotika-haltigen Medien selektioniert werden: Nur wenn das rekombinante ts-Plasmid (mit Antibiotikaresistenz-Marker) ins Chromosom integriert ist, wird seine Replikation (zusammen mit dem Chromosom) auch bei höherer Temperatur und unter Antibiotika-Selektion möglich.

Für die homologe Rekombination werden mindestens 100 bp des Bereichs, der mutiert werden soll, benötigt. Je größer dieser Bereich ist, umso wahrscheinlicher tritt das Ereignis der homologen Rekombination auf. Optimal ist eine Größe zwischen 0,5 und 2,5 kb, wobei Größe und Lage des ausgewählten homologen Bereichs von der Größe des jeweiligen Gens und der Position funktionaler Bereiche des Genprodukts (N- oder C-terminal) abhängen.

Konstruktion von Insertionsmutanten

Zur Herstellung von Insertionsmutanten ist nur ein Rekombinationsereignis notwendig.

- ⇒ das Mutageneseplasmid wird in *L. monocytogenes* über Elektroporation (siehe 4.1.11) transformiert, auf BHI-Platten mit 10 µg/ml Erythromycin ausplattiert und bei 30°C inkubiert
- ⇒ nach 2-4 Tagen wird mit einem, über PCR auf Anwesenheit des Plasmids überprüften, Klon eine Übernachtskultur (BHI, 10 µg/ml Erythromycin) angelegt und bei 30°C inkubiert
- ⇒ anschließend wird die ÜNK auf vorgewärmte BHI-Platten (10 µg/ml Erythromycin) in den Verdünnungsstufen 10^{-1} bis 10^{-7} ausplattiert und bei 42°C inkubiert
- ⇒ die Integration des Mutageneseplasmids in das bakterielle Chromosom wird mittels PCR (siehe 4.1.7)
- ⇒ (sorry, aber 4.8.1. gibt's nicht und 4.1.8 fehlt im Inhaltsverzeichnis) überprüft, unter Verwendung eines Oligonucleotidprimers, welcher „oberhalb“ des klonierten Bereichs ans Chromosom bindet und eines Vektor-spezifischen Primers.

Konstruktion von Deletionsmutanten

Zur Erzielung von Deletionsmutanten werden in das ts-Mutagenese-Plasmid zwei zum Chromosom homologe DNA-Fragmente inseriert (sog. „upstream“ und „downstream“ Fragmente, zwischen denen der letztlich zu deletierende Genomabschnitt fehlt). Bei der ersten Rekombination (experimentelles Vorgehen siehe oben) inseriert das Plasmidkonstrukt entweder über den „upstream“ oder den „downstream“ homologen Bereich. Nach Selektion und Charakterisierung eines primären Insertionsklons wird dieser dann bei permissiver (d. h. 30°C) Temperatur ohne Antibiotikum subkultiviert. Dabei kann es zufällig zu einem zweiten Rekombinationsereignis kommen – entweder (häufig) zur Exzision des Mutagenesekonstrukts, und damit zur Reversion zum Wildtyp, oder zur gewünschten Deletion. In beiden Fällen enthalten die Bakterien zunächst ein rekombinantes Plasmid (urprüngliches Mutagenese-Konstrukt oder wildtypisches Insert) mit entsprechendem Antibiotika-Resistenzgen. Da die Subkultivierung jedoch in Antibiotika-freien Medien erfolgt, sind Bakterien, welche das Plasmid spontan verloren haben, aufgrund energetischer Gründe (geringerer DNA-Replikationsaufwand) gegenüber den Plasmid-haltigen (oder noch die chromosomale Insertion tragenden) im Vorteil und reichern sich an. Unter den Antibiotika-sensitiven Klonen müssen dann die gewünschten Deletionsmutanten zunächst über PCR identifiziert und dann durch DNA-Sequenzierung verifiziert werden.

4.1.13 Herstellung von Glycerinkulturen

Zur langfristigen Lagerung von Bakterien werden diese bei -80°C eingefroren. Hierfür wird ein spezielles Medium benötigt:

Einfriermedium: 50% Glycerin
 2,9% NaCl

- ⇒ eine Bakterien-ÜNK wird 1:1 mit dem Einfriermedium gemischt und 1,5 ml dieser Lösung bei -80°C eingefroren

4.1.14 Isolierung von RNA aus *Listeria*

RNeasy Mini Kit (Qiagen)

- ⇒ eine Bakterien-Übernachtskultur wird 1:20 verdünnt und bei den erforderlichen Bedingungen bis zu einer $OD_{600}=1,0$ angezogen
- ⇒ 10 ml der Kultur werden abzentrifugiert (6000 rpm; 10 min., 4°C)
- ⇒ der Überstand wird abgenommen, das Pellet in 700µl RLT-Puffer resuspendiert und 7 µl β-Mercaptoethanol zugegeben
- ⇒ die entstandene Lösung wird auf eine Lysing Matrix B (Q BIOgene) gegeben
- ⇒ die Bakterienzellen werden im FastPrep FP120 dreimal für 45 s bei einer Geschwindigkeit von 6,5 aufgeschlossen (zwischendurch immer 1 Min. auf Eis kühlen)
- ⇒ nach einem Zentrifugationsschritt von 1 min.; 15000 rpm; RT wird der Überstand in ein neues Cap (2 ml) überführt und mit 500 µl 100% EtOH versetzt
- ⇒ der Ansatz wird auf 2 Säulen verteilt und 1 min., 15000 rpm, RT zentrifugiert
- ⇒ es werden 700µl RWI-Puffer zugegeben und abzentrifugiert (15000 rpm; 1 min.; RT)
- ⇒ DNase-Behandlung: pro Säule werden 10 µl DNase und 70µl RDD-Puffer (Qiagen) zugegeben und 15 min. bei RT inkubiert
- ⇒ Anschließend werden 350 µl RWI-Puffer zugegeben und abzentrifugiert (15000 rpm; 1 min.; RT)
- ⇒ Es wird 2x mit 500µl RPE-Puffer gewaschen und nach dem zweiten Waschschrift nochmals 3 min., 15000 rpm, RT zentrifugiert
- ⇒ die Säule wird in ein neues Cap (1,5 ml) überführt und die RNA mit 75µl RNase free-H₂O mittels Zentrifugation (15000 rpm; 1 min., RT) eluiert
- ⇒ die Lagerung der RNA erfolgt bei -80°C

Fällung von RNA

In Anlehnung an ein Protokoll zur Isolierung von mRNA aus Gesamt-RNA wurden folgende Arbeitsschritte durchgeführt:

- ⇒ man gibt 0,1 Vol. 3M Natriumacetat und 3 Vol. 100% EtOH zum Eluat und inkubiert entweder über Nacht bei -20°C oder 1 h bei -70°C
- ⇒ nach einem Zentrifugationsschritt (12.000g, 30 min., 4°C) wird nochmals mit 1 ml eiskaltem 100%EtOH gewaschen und erneut zentrifugiert (12.000g, 10 min., 4°C)
- ⇒ der Überstand wird abgenommen, das Pellet im 37°C-warmem Heizblock getrocknet und in 20 µl Rnase free water gelöst.

4.1.15 Konzentrationsbestimmung von RNA

Die Konzentrationsbestimmung für RNA erfolgt wie die für DNA (--> 4.6), aber mit folgender Umrechnungsformel:

$$\text{RNA-Konzentration } [\mu\text{g}/\mu\text{l}] = (\text{OD}_{260\text{nm}} - \text{OD}_{320\text{nm}}) \times 4$$

Der Quotient $OD_{260\text{nm}}/OD_{280\text{nm}}$ gibt hier ebenfalls den Reinheitsgrad an und sollte zwischen 1,5 und 2,0 liegen.

4.1.16 Reverse Transkription und PCR mit cDNA

Der Ausdruck cDNA steht für komplementäre DNA, d.h. der Ursprung der DNA liegt nicht in der DNA selbst, sondern in der RNA. Retroviren, wie z.B. Vogel-Leukämie-Virus, Maus-Leukämie-Virus oder HIV, enthalten ein RNA-Genom, das mit Hilfe der virus-kodierten reversen Transkriptase (RNA-abhängige DNA-Polymerase) in einer eukaryontischen Zelle in dsDNA umgeschrieben werden kann.

Die reverse Transkriptase dient als nützliches Werkzeug in der molekularen Genetik, da nicht nur virale RNA-Moleküle, sondern jede beliebige RNA unter geeigneten Bedingungen von der reversen Transkriptase als Matrize akzeptiert wird. Auf diesem Weg ist es möglich DNA-Kopien von mRNA-Molekülen herzustellen.

Die für die cDNA-Synthese verwendete Superscript™ II (Invitrogen) ist ein Produkt des pol-Gens des Moloney-Murine-Leukämie-Virus und besitzt zwei Aktivitäten:

- ⇒ eine 5´-3´-primerabhängige Polymeraseaktivität
- ⇒ eine durch Punktmutation reduzierte 3´-5´-RNaseH-Aktivität, die den RNA-Anteil des RNA-DNA-Hybrids abbaut. Durch Zugabe des RNase-Inhibitors wird diese Aktivität zusätzlich gehemmt

Reverse Transkription mit Superscript™ II (Invitrogen)

Gesamt-RNA	5,0 µg
Random Primers (3 µg/µl; Invitrogen)	9,0 µg
RNase free water	ad 18 µl

- ⇒ Inkubation für 5 Min. bei 70°C mit anschließendem Transfer der Proben auf Eis

Herstellung des Mastermix für die reverse Transkription (1x-Ansatz):

Ribonuclease Inhibitor (RNase Out™; Invitrogen)	1,0 µl
dATP (20mM)	1,0 µl
dTTP (20mM)	1,0 µl
dGTP (20mM)	1,0 µl
dCTP (20mM)	1,0 µl
DTT (100mM)	0,4 µl
First strand buffer (5x)	8,0 µl
Superscript™ II (Invitrogen)	1,0 µl
RNase free water	ad 20 µl

- ⇒ Nach Zugabe von 20 µl Mastermix zur RNA-Probe folgt ein Inkubationsschritt von 10 Min. bei RT
- ⇒ Die cDNA-Synthese erfolgt bei 42°C für 2 h
- ⇒ Anschließend wird der Ansatz für 15 Min. bei 70°C inkubiert (Zerstörung der RNaseOut™)
- ⇒ Der Ansatz wird mit dem „PCR Purification Kit“ (Qiagen) aufgereinigt und die entstandene cDNA in 40 µl EB-Puffer eluiert
- ⇒ Die Lagerung der cDNA erfolgt bei -20°C

4.1.17 Reverse Transkription von RNA für Microarray-Experimente

Es werden 30 bis 40 µg Gesamt-RNA pro zu untersuchenden Stamm benötigt

Gesamt-RNA	30 – 40 µg
Random Primers (3 µg/µl; Invitrogen)	9,0 µg
RNase free water	ad 18 µl

- ⇒ Inkubation für 5 Min. bei 70°C mit anschließendem Transfer der Proben auf Eis

Herstellung des Mastermix für die reverse Transkription (1x-Ansatz):

Ribonuclease Inhibitor (RNase Out™; Invitrogen)	1,0 µl
dATP (20mM)	1,0 µl
dTTP (20mM)	1,0 µl
dGTP (20mM)	1,0 µl
dCTP (10mM)	0,8 µl
DTT (100mM)	0,4 µl
First strand buffer (5x)	8,0 µl
Superscript™ II (Invitrogen)	1,0 µl
RNase free water	ad 20 µl

- ⇒ Es werden 20 µl Mastermix und 2,0 µl CytoDye3 bzw. CytoDye5 (Amersham Biosciences) zugegeben und der Ansatz 10 Min. bei RT inkubiert
- ⇒ Die cDNA-Synthese erfolgt bei 42°C für 2 h
- ⇒ Anschließend werden die Ansätze für 15 Min. bei 70°C inkubiert (Zerstörung der RNaseOut™)
- ⇒ Die Ansätze werden kurz zentrifugiert und es werden je 2,0 µl RNase (Roche) zugegeben (Zerstörung der RNA)
- ⇒ Nach einem Inkubationsschritt von 45 Min. bei 37°C werden die Ansätze mit dem „PCR Purification Kit“ (Qiagen) aufgereinigt und die entstandene cDNA in 30 µl EB-Puffer eluiert
- ⇒ Die mittels Microarray zu vergleichenden Ansätze werden vereinigt und in der Speedvac bei 45°C auf ein Gesamtvolumen von 30 µl reduziert
- ⇒ Die markierte cDNA wird entweder direkt für Microarray-Experimente weiterverwendet oder bei -20°C eingefroren

4.1.18 Gesamttranskriptionsprofilierung durch Microarray-Technologie

Zur Gesamttranskriptionsprofilierung werden Gesamtgenom-DNA-Microarrays verwendet, die 70mer Oligodesoxyribonukleotide aller open reading frames (ORFs) des *L. monocytogenes*-Genoms enthalten. Die Oligonukleotide wurden entsprechend der Herstellerangaben auf Epoxy-beschichtete Glas-Objektträger von Quantifoil gespottet (T. Chakraborty; Institut für Medizinische Mikrobiologie, Gießen, Deutschland).

Insgesamt wurden 6 RNA-Proben für die Markierung und Hybridisierung der cDNA hergestellt. Es wurden jeweils gleiche Mengen der zu vergleichenden RNA-Proben (40 µg) mittels Superscript II™ (Invitrogen, Germany) und den fluoreszenzmarkierten Nukleotiden Cy3-dCTP und Cy5-dCTP (Amersham Pharmacia, Karlsruhe, Germany) in cDNA umgeschrieben. Die beiden unterschiedlich markierten cDNA-Proben wurden vereinigt und auf dem Microarray hybridisiert. Das Scannen und die Auswertung der Microarrays erfolgte mit dem ScanArray HT und der ScanArray Express Software (Perkin Elmer, Boston, MA).

Waschen und Blocken der Microarray-Slides

- ⇒ 1 x 5 Minuten in Rinsing solution 1 (0,1% Triton-X 100) bei RT
- ⇒ 2 x 2 Min. in Rinsing solution 2 (HCl solution; ~100µl konz. HCl in 1000ml H₂O_{dest}) bei RT
- ⇒ 1 x 10 Min in Rinsing solution 3 (100mM KCl) . bei RT
- ⇒ 1 x 1 Min in H₂O_{dest} . bei RT
- ⇒ 1 x 15 Min. in 1 x QMT Blocking Solution (50mM Ethanolamin, 0,1% SDS in 0,1M Tris, pH9,0) bei 50°C
- ⇒ 1 x 1 Min. in H₂O_{dest} . bei RT
- ⇒ Die Slides werden durch Zentrifugation (3 Min., 1600 rpm) getrocknet

Hybridisierung der markierten cDNA

- ⇒ Die Cy3-/Cy5-markierte cDNA wird mit 6,0 µl 20x SSC und 5,0 µl 1% SDS versetzt und 1 Min. bei 95°C inkubiert
- ⇒ Der Ansatz wird auf den Microarray-Slide aufgetragen und mit einem Deckglas abgedeckt
- ⇒ Der Slide wird in eine Hybridisierungskammer eingelegt, mit Alufolie eingepackt und im Wasserbad bei 50°C über Nacht inkubiert

Waschen der Microarray-Slides

Alle angegebenen Waschschritte werden bei Raumtemperatur durchgeführt.

- ⇒ 1 x 10 Min. in Waschpuffer I (2x SSC + 0,2 % SDS)
- ⇒ 1 x 10 Min. in Waschpuffer II (2x SSC)
- ⇒ 1 x 10 Min. in Waschpuffer III (0,2x SSC)
- ⇒ Trocknen des Slides durch Zentrifugieren (3 Min., 1600 rpm)

Das Scannen der hybridisierten Slides erfolgt mittels des ScanArrayHT (Perkin Elmer, Boston, MA). Zur Auswertung wird die ScanArray Express Software (Perkin Elmer, Boston, MA) verwendet.

4.2 Proteinbiochemische Methoden

4.2.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

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

Im folgenden werden die Zusammensetzung der Gele sowie die Versuchsdurchführung beschrieben.

Zusammensetzung eines 12%igen Polyacrylamidgels:

Reagenzien	12% Trenngel (20ml)	Sammelgel (8 ml)
H ₂ O _{dest}	6,6 ml	5,5 ml
30% Acrylamidlösung	8,0 ml	1,3 ml
1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)	5,0 ml	-
1,5 M Tris-HCl (pH 6,8)	-	1,0 ml
10% SDS	200 µl	80 µl
10% APS	200 µl	80 µl
TEMED	8 µl	8 µl

Nach Zugabe des Radikalbildners TEMED wird die Trenngellösung sofort zwischen zwei – durch Spacer getrennte – Glasplatten bis ca. 3 cm unterhalb des Glasplattenrandes gegossen und zur Ausbildung einer geraden Front mit H₂O_{dest} überschichtet. Ist das Trenngel auspolymerisiert, kann das Sammelgel gegossen werden und ein Teflonkamm eingesetzt werden. Das fertige Gel wird in die mit 1x-SDS-Laufpuffer gefüllte Elektrophoresekammer eingesetzt. Die Proteinproben bzw. Ganzzell-Lysate werden mit 2x Laemmli-Puffer versetzt, 10 Min. gekocht und in die Geltaschen pipettiert. Als Molekulargewichtsstandard werden zudem 10 µl des „Broad Range Markers“ aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgt bei 150 Volt und wird beendet, nachdem die Farbstofffront aus dem Gel gelaufen ist.

10x SDS-Laufpuffer:	250 mM	Tris
	2 M	Glycin
	1%	SDS
2x Laemmli-Puffer:	31,25 mM	Tris-HCl (pH 8,0)
	5%	Glycin
	1%	SDS
	2,5%	β -Mercaptoethanol

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

Coomassie-Färbelösung:	45%	Ethanol
	10%	Eisessig
	0,25%	Coomassie Brilliant Blue R250

4.2.2 Western Blot

In einem Western Blot können einzelne Proteine mittels spezifischer Antikörper nachgewiesen und identifiziert werden. Die Proteine werden zunächst in einem SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt (s. 4.2.1) und anschließend auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Hierfür wird eine Blotkammer benötigt, die aus zwei übereinander liegenden Graphitplatten besteht. Die Anodenplatte wird mit H_2O_{dest} befeuchtet und mit drei Whatman-Papieren, die zuvor in Blotpuffer getränkt wurden, bedeckt. Auf diesen Stapel wird eine mit H_2O_{dest} befeuchtete Nitrocellulosemembran gelegt. Hierauf legt man das Proteingel, von welchem zuvor das Sammelgel abgetrennt wurde. Es folgen drei in Blotpuffer getränkte Whatman-Papiere. Abschließend wird die Kathodenplatte aufgesetzt und die Kammer an eine Spannungsquelle angeschlossen. Das Anlegen einer Gleichspannung ermöglicht die Wanderung der negativ geladenen Proteine aus dem SDS-Gel auf die Membran. Der Transfer erfolgt für ca. 1h, wobei die anzulegende Stromstärke abhängig von der Membranfläche ist (0,8mA / cm²). Im Anschluss wird die Nitrocellulosemembran aus der Blotkammer entfernt und für 1h bei Raumtemperatur in 5% Magermilch in 1xPBSW unter leichtem Schütteln inkubiert. Dies dient zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen auf der Membran. Die Membran wird anschließend mit dem primären Antikörper, der gegen das Zielprotein gerichtet ist, über Nacht inkubiert. Es folgen drei Waschschrte mit 1xPBSW für je 15 Min. und die Inkubation mit dem sekundären Antikörper für 1-2h. Nach 4 weiteren Waschschrten in 1x PBSW, durch die nichtgebundene Antikörper entfernt werden erfolgt die Detektion der spezifischen Proteine mit Hilfe des „ECL western blotting and labeling Kit“ (Amersham Biosciences). Die Membran wird zusammen mit einem Röntgenfilm in eine Filmkassette gelegt und dieser nach einigen Minuten in der Dunkelkammer mittels des Röntgenfilm-Entwicklers entwickelt.

Blotpuffer:	20%	EtOH
	5,8 g/l	Tris
	2,9 g/l	Glycin
	0,37 g/l	SDS
1 x PBSW:	8,0 g	NaCl
	0,2 g	KCl
	1,15 g	Na ₂ HPO ₄
	0,2 g	KH ₂ PO ₄
	0,05 %	Tween-20
	Ad 1000 ml	H_2O_{dest}

4.2.3 Overlay Blot Assay

Dieser Bindungsassay dient der Detektion von Protein-Protein-Interaktionen. Mittels SDS-PAGE separierte Zelllysate wurden auf Nitrocellulosemembran transferiert und über Nacht in bei 4°C in Renaturierungspuffer (20mM MOPS pH 7.1, 100mM Na-Acetat, 5mM Mg-Acetat, 0,25% Tween-20, 10% Magermilchpulver 5mM DTT) geschüttelt. Dies dient der Entfernung von SDS und unterstützt die Rückfaltung der auf der Membran immobilisierten Proteine in ihre native Konformation. Am nächsten Tag wird die Membran zweimal für 15 Min. in Bindungspuffer (20mM MOPS pH 7.1, 100mM K-Acetat, 5mM Mg-Acetat, 1% Tween-20, 5mM DTT) gewaschen und anschließend in Bindungspuffer, der die möglichen Bindungsproteine enthält, für 1 Std. bei RT inkubiert.

Nach der Inkubation wird die Membran fünfmal für 5 Min. in Bindungspuffer und zweimal für 5 Min. in 1xTBST gewaschen und anschließend über Nacht in 1xTBST + 10% Magermilchpulver bei 4°C abgesättigt.

Am darauffolgenden Tag erfolgt die Inkubation mit den entsprechenden Antikörpern sowie die Detektion der Antikörper mittels ECL-Reaktion (siehe 4.2.2).

4.2.4 Gewinnung von Gesamtzellproteinen

Herstellung von Ganzzell-Lysaten

- ⇒ Eine Bakterienkultur wird im geeigneten Medium bis zum Erreichen der spätlogarithmischen Phase angezogen.
- ⇒ 1 ml der Kultur wird entnommen und für 5 Min. bei 14.000 rpm und 4°C abzentrifugiert
- ⇒ Das Bakterienpellet wird in 100 µl 2x Laemmli-Puffer resuspendiert und die Zellsuspension für 5 Min. bei 95°C erhitzt
- ⇒ Die Probe kann bei -20°C gelagert werden

Isolierung von Überstandsproteinen aus *L. monocytogenes*

- ⇒ Für Coomassie-Färbung 50ml, ansonsten 30ml BHI 1:20 mit ÜNK ansetzen
- ⇒ Bis OD₆₀₀=1,0 inkubieren
- ⇒ Zugabe von 20µg/ml Chloramphenicol (Stocklg. 10mg/ml) → weitere 5 Min. bei 37°C inkubieren, anschließend auf Eis weiterarbeiten
- ⇒ Bakterien in 50ml-Greiner überführen und 15 Min., 4°C 6000rpm abzentrifugieren
- ⇒ Überstand in neues Greiner, 12% TCA zugeben → 1h auf Eis inkubieren
- ⇒ 30 min. bis 1h zentrifugieren
- ⇒ Überstand abnehmen
- ⇒ 5ml eiskaltes Aceton zugeben, Pellet lösen → zuerst 2ml Aceton zugeben und Pellet darin lösen (blaue Spitze abschneiden) und dann in 15ml-Greiner überführen; restliche 3ml Aceton in altes Röhrchen geben und restliches Pellet darin aufnehmen und auch in das neue Röhrchen geben
- ⇒ 15 Min., 4°C, 6000rpm zentrifugieren, Überstand abnehmen
- ⇒ Pellet noch 2x mit 1ml Aceton waschen und jeweils zentrifugieren
- ⇒ Vor dem letzten Waschschrift Suspension in 2ml-Eppendorf-Cap überführen; Überstand abnehmen
- ⇒ Pellet im 30°C-Heizblock trocknen, ca. 5-8 Min.
- ⇒ In 100µl Harnstoff + 10µl CHAPS aufnehmen, kurz bei RT zentrifugieren
- ⇒ Falls noch „Krümel“ vorhanden, noch ein bisschen Puffer + CHAPS zugeben → Volumen so gering wie möglich halten
- ⇒ Proteinkonzentration mit Bradford-Methode bestimmen
- ⇒ Proteine bei -80°C lagern

Isolierung von Gesamtzellproteinen aus *L. monocytogenes*

- ⇒ 30ml BHI 1:20 mit frischer ÜNK animpfen
- ⇒ Bis OD=1 inkubieren
- ⇒ Zugabe von 20µg/ml Chloramphenicol (Stocklsg. 10mg/ml) → weitere 5 Min. inkubieren
- ⇒ Bakterien 15 Min., 4°C, 6000rpm abzentrifugieren
- ⇒ Überstand zur Aufarbeitung der sekretierten Proteine getrennt aufbewahren
- ⇒ Bakterienpellet 2x mit 5ml 1xPBS (+20µg/ml Chloramphenicol) waschen
- ⇒ Pellet in 800µl Tris-Puffer (10mM Tris/HCl, 5mM MgCl₂, pH7,2) aufnehmen
- ⇒ + 20µl Protease-Inhibitoren-Mix (2mg/ml PEFABLOC, Pepstatin, Leupeptin)
- ⇒ In Shredder-Tubes überführen → bei -80°C einfrieren
- ⇒ Shreddern: 6 x 30 sec., speed 6,5
- ⇒ + 5µl Dnase/Rnase-Mix (Benzonase/Rnase-it, 1:1) → 10 Min. RT inkubieren
- ⇒ Zelltrümmer 10 Min., 4°C, 14000rpm abzentrifugieren
- ⇒ 650µl des Überstandes in E-Cap überführen, in das 340mg (240mg) Harnstoff + 122mg (91mg) Thioharnstoff vorgelegt wurden → Endvolumen ~ 800µl
- ⇒ 30 Min. bei RT inkubieren, mehrmals kräftig vortexen bis Harnstoff gelöst ist
- ⇒ Proteine mit 12% (20%) TCA fällen → 1h auf Eis
- ⇒ Proteine 20 Min., 4°C, 14000rpm abzentrifugieren
- ⇒ 3x mit ~100µl eiskaltem Aceton waschen
- ⇒ Pellet trocknen (5 Min., 30°C-Heizblock)
- ⇒ Proteine in Harnstoffpuffer (~100µl) lösen (7M Harnstoff, 2M Thioharnstoff, 70mM DTT) + CHAPS (Endkonz. 40mg/ml = 4%)
- ⇒ Proteine über Nacht bei RT auf Taumler vollständig lösen (oder ÜN 4°C ohne Taumler)
- ⇒ Extrakte bei -20°C oder -80°C einfrieren

4.2.5 Proteinbestimmung nach Bradford

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

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

4.2.6 Überproduktion von Proteinen mit dem IPTG-induzierbaren pQE30-Vektor

Die IPTG-induzierte Überexpression bestimmter Proteine wird durch den pQE30-Vektor (QIAexpress system) ermöglicht. Hierfür wird der spezifische DNA-Abschnitt, der das zu reinigende Protein codiert, im Leserahmen hinter einer für sechs Histidin-Reste kodierenden Sequenz kloniert, die unter der Kontrolle des regulierbaren PT5-Promotors steht. Das resultierende Fusionsprotein trägt N-terminal ein „His-Tag“ und kann mit Hilfe der Affinitätschromatographie über eine Ni-NTA-Agarosesäule gereinigt werden (siehe 4.2.7). Die Überexpression erfolgt im *E. coli*-Stamm M15 (pRep4). pRep4 ist ein „high-copy“-Plasmid und trägt dem Kanamycin-Resistenzgen auch das *lacI*-Gen, das für den *lac*-Repressor codiert und so die unkontrollierte Expression der in pQE30 klonierten DNA verhindert.

- ⇒ 1 l LB-Medium (+ 100 µg/ml Ampicillin, 50 µg/ml Kanamycin) wird mit 50 ml einer *E. coli* M15-Übernachtskultur, die das gewünschte pQE30-Derivat enthält, angeimpft und bei 37°C auf einem Schüttler inkubiert.
- ⇒ Die Bakterien werden bis zu einer OD₆₀₀ = 0,5 bis 0,6 angezogen.
- ⇒ Als nicht-induzierte Kontrolle wird 1 ml der Bakteriensuspension entnommen, die ohne IPTG-Zugabe über den gleichen Zeitraum weiter inkubiert wird.

- ⇒ Zur Induktion der Genexpression wird der *lac*-Repressor durch Zugabe von 1mM IPTG inaktiviert und der Ansatz für weitere drei Stunden bei 37°C inkubiert.
- ⇒ Anschließend wird erneut 1 ml der Bakteriensuspension entnommen, die gemeinsam mit der nicht-induzierten Probe abzentrifugiert wird (3 min., 14000 rpm, 4°C).
- ⇒ Die beiden Bakterienpellets werden jeweils in 100 µl 2 x Laemmli-Puffer resuspendiert, bei 100°C 3 Min. gekocht und zur Überprüfung der Überexpression auf einem 12%-igen SDS-Polyacrylamid-Gel elektrophoretisch aufgetrennt.
- ⇒ Die restliche Bakterienkultur wird nach der Induktion abzentrifugiert (15 min., 6000 rpm, 4°C), der Überstand wird verworfen
- ⇒ Das Pellet wird einmal mit 1x PBS gewaschen und bei -80°C eingefroren.

Zellaufschluss und Isolierung der Proteine unter nativen Bedingungen

- ⇒ Das nach der Überproduktion eingefrorene Bakterienpellet wird für ca. 15-30 Min. auf Eis aufgetaut und anschließend in 5 ml Bindepuffer resuspendiert.
- ⇒ Nach Zugabe von 1 Tablette Protease-Inhibitoren-Mix (Roche) und 10 µl Benzonase wird die Suspension auf eine Lysing Matrix B (Q BIOgene) gegeben
- ⇒ die Bakterienzellen werden im FastPrep FP120 viermal für 30 s bei einer Geschwindigkeit von 6,5 aufgeschlossen (zwischendurch immer 1 Min. auf Eis kühlen)
- ⇒ nach einem Zentrifugationsschritt von 1 min.; 15000 rpm; RT wird der Überstand in ein neues Cap überführt und mittels eines 0,45 µm-Filters sterilfiltriert

Zellaufschluss und Isolierung der Proteine unter denaturierenden Bedingungen

- ⇒ das nach der Überproduktion eingefrorene Bakterienpellet wird für ca. 15-30 Min. auf Eis aufgetaut und anschließend in 5ml Bindungspuffer resuspendiert
- ⇒ der Ansatz wird für 30-60 Min. bei RT unter Vermeidung von Luftblasen gerührt und nachfolgend für 20-30 Min. bei 6000 rpm, RT zur Entfernung der Zelltrümmer zentrifugiert
- ⇒ der Überstand wird durch einen 0,45µm-Filter sterilfiltriert

4.2.7 Affinitätschromatographie mittels ÄKTA™prime

Das Prinzip dieses Proteinreinigungsverfahrens beruht auf der hohen Bindungsaffinität von Imidazolringen an zweiwertige Nickel-Ionen. Fusionsproteine, die ein N- oder C-terminales „His-tag“ besitzen können über eine Ni-NTA-Agarose-Säule aufgereinigt werden. Der vierzählige Ligand NTA (nitrilo-tri-acetic acid) tritt in Wechselwirkung mit vier der sechs Koordinationsstellen eines Nickel-Ions, das an seinen zwei restlichen Koordinationsstellen die Imidazolringe der Histidinreste binden kann.

Das ÄKTAprime-System (Amersham Biosciences) ermöglicht die einfache und halbautomatische Proteinreinigung. Es wird eine NiSO₄-beladene Säule (1ml HiTrap™ Chelating HP) und verschiedene Puffer angeschlossen. Die sterilfiltrierte Probe, die das aufzureinigende Protein enthält, wird in den Probenschlauch der Äktaprima injiziert und anschließend das gewünschte Protokoll („His-Tag purification-Protokoll“ für native Aufreinigung und „Refolding-Programm für die Aufreinigung unter denaturierenden Bedingungen) gestartet.

4.2.7.1 Native Aufreinigung von Proteinen

Zur nativen Aufreinigung von Proteinen werden nur zwei Puffer benötigt:

<u>Bindungspuffer:</u>	20mM Na-Phosphat 0,5M NaCl 10mM Imidazol pH 7,4
<u>Elutionspuffer:</u>	20mM Na-Phosphat 0,5M NaCl 0,5M Imidazol pH 7,4

Die Säule wird zunächst mit Bindungspuffer äquilibriert und mit der Proteinprobe beladen. Nach weiteren Waschstritten erfolgt die Elution des gebundenen Proteins durch kontinuierliche Steigerung des im Elutionspuffer enthaltenen Imidazols (= % B).

Das Eluat wird mit Hilfe eines Fraktionssammlers in 1,2 ml Aliquots aufgefangen, die sofort auf Eis überführt werden. Die einzelnen Fraktionen werden auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen und auf das Vorhandensein des gewünschten Proteins überprüft. Die das gereinigte Protein enthaltenden Fraktionen werden vereinigt und über das „Desalting-Programm“ der Äktaprime in 1xPBS + 10% Glycerin umgepuffert. Dies dient der Entfernung des Imidazols. Das gereinigte Protein wird bei -20°C oder -80°C gelagert

4.2.7.2 Aufreinigung unter denaturierenden Bedingungen

Zur Aufreinigung unter denaturierenden Bedingungen werden folgende Puffer benötigt:

<u>Bindungspuffer:</u>	6M Guanidinium-Hydrochlorid 20mM Tris-HCl 0,5M NaCl 5mM Imidazol 1mM 2-Mercaptoethanol pH 8,0
<u>Waschpuffer:</u>	6M Harnstoff 20mM Tris-HCl 0,5M NaCl 5mM Imidazol 1mM 2-Mercaptoethanol pH 8,0
<u>Refolding-Puffer:</u>	20mM Tris-HCl 0,5M NaCl 5mM Imidazol 1mM 2-Mercaptoethanol pH 8,0
<u>Elutionspuffer:</u>	20mM Tris-HCl 0,5M NaCl 500mM Imidazol 1mM 2-Mercaptoethanol pH 8,0

4.2.8 Zweidimensionale Proteingelelektrophorese

Die zweidimensionale (2D-) Gelelektrophorese, die erstmals von O'Farrell und Klose 1975 beschrieben wurde, ist eine Kombination aus zwei unabhängigen Elektrophoreseschritten, die der Auftrennung von komplexen Proteingemischen dient (88, 89, 138). Durch die isoelektrische Fokussierung (IEF) erfolgt zunächst eine Auftrennung der Proteine in der ersten Dimension nach ihrem isoelektrischen Punkt. Die anschließende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese gewährleistet eine Auftrennung der Proteine in der zweiten Dimension nach ihrem relativen Molekulargewicht. Nach Visualisierung der Proteine im Gel entspricht jeder Spot auf dem 2D-Gel einem einzelnen Protein aus der Gesamtproteinprobe. Auf diese Weise können über 10.000 Proteine pro Gel getrennt werden.

4.2.8.1 Auftrennung von Proteinen in der ersten Dimension durch isoelektrische Fokussierung (IEF)

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

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

Die „Immobilin DryStrip gels“ von Amersham Biosciences sind in unterschiedlichen Längen und mit unterschiedlichen pH-Gradienten erhältlich.

4.2.8.2 Rehydrierung der IPG-Strips im Reswelling Tray:

Da das Gel auf den immobilisierten Strips getrocknet ist, muss es vor der IEF rehydriert werden.

Rehydrierungslösung:

- 7 M Harnstoff
- 2 M Thioharnstoff
- 4 % CHAPS
- etwas Bromphenolblau (BPB)

Die Rehydrierung erfolgt im so genannten „Reswelling-Tray“ (Amersham Biosciences). Pro Strip werden 340 µl Rehydrierungslösung mit 0,5 % IPG-Puffer (entsprechend dem pH-Bereich des IPG-Strips) versetzt. Des Weiteren gibt man entweder 18 mM DTT oder, im Falle von IPG-Strips mit basischen (> pH 7) pH-Gradienten, 4 µl „DeStreak“-Lösung (Amersham Biosciences) hinzu. Die supplementierte Rehydrierungslösung wird in einen „Channel“ des Reswelling-Trays pipettiert und der Strip vorsichtig mit der Gelseite nach unten auf die Rehydrierungslösung gelegt, so dass sich die Rehydrierungslösung möglichst gleichmäßig unter dem Strip verteilt. Der IPG-Strip wird noch mit 2 ml Mineralöl überschichtet, um ein Austrocknen des Gels zu verhindern. Die Rehydrierung erfolgt für 10-20 h bei RT.

4.2.8.3 IEF im Manifold:

Die IEF erfolgt in der „Ettan™IPGphor“ von Amersham Biosciences. Die IPGphor wird mit einem mit H_2O_{dest} befeuchteten Tuch gereinigt und anschließend getrocknet. Die so genannte „Manifold“ ist eine Keramikplatte, auf der bis zu 12 IPG-Strips in einzelne Channels parallel platziert werden können. Sie wird auf der IPGphor platziert und mit einer Libelle austariert. Anschließend werden 108 ml Mineralöl gleichmäßig in die 12 Channels verteilt. Die rehydrierten IPG-Strips (→ 4.2.8.2) werden nun mit der Gelseite nach oben in den Channels platziert, so dass der saure Bereich des IPG-Strips über der Anode und der basische Bereich über der Kathode liegt. Die „Sample-Cups“, die dem Aufbringen der Proteinprobe auf das Gel dienen, werden positioniert und mit Hilfe des „Insertion-Tools“ auf der Manifold fixiert. Etwa 2,5 cm lange und 0,5 cm breite Whatman-Papierstreifen werden mit 150 μ l H_2O_{dest} befeuchtet und jeweils an den Enden der IPG-Strips positioniert, so dass sie zu etwa 0,5 cm auf den Gelenken liegen. Dann werden die Elektroden auf den Whatman-Papieren positioniert.

Die Proteinproben (→ 4.2.4) werden mindestens 5 min abzentrifugiert und die aufzutrennende Menge in die Sample-Cups pipettiert (max. 150 μ l). Werden die Proteine nach der 2D-Gelelektrophorese mittels Silbernitratfärbung sichtbar gemacht, reichen schon 50 μ g Gesamtzellprotein, da diese Färbemethode so sensitiv ist, dass 1 ng Protein sichtbar wird. Werden die Proteine allerdings anschließend mit kolloidalem Coomassie gefärbt, um die differentiell exprimierten Proteine massenspektrometrisch analysieren zu können, sollte man etwa die 100fache Menge an Gesamtzellprotein einsetzen, da diese Färbemethode deutlich weniger sensitiv im Vergleich zur Silbernitratfärbung ist. Geeignete Mengen liegen zwischen 500 und 1000 μ g Proteinprobe.

Der Deckel der Apparatur wird geschlossen und die IEF unter folgenden Standardbedingungen durchgeführt, wobei die ersten 3 Schritte verlängert werden können:

3 h	300 V	Step and Hold
6 h	1000 V	Gradient
3 h	8000 V	Gradient
	8000 V	Step and Hold

Bei einer Auftrennung von 50-100 μ g Protein erfolgt die IEF der Proteine, bis etwa 60.000 Vhs erreicht sind. Hat man allerdings sehr große Mengen an Proteinprobe aufgetragen (z.B. für Coomassie-Gele) sollte man die Elektrophorese bis mindestens 100.000 Vhs oder länger durchführen.

Während der Elektrophorese werden etwa alle 20.000 bis 30.000 Vhs die Whatman-Papierstreifen ausgewechselt. Diese dienen der Aufnahme von Salzen und Puffer-Ionen sowie von Proteinen, deren pI außerhalb des pH-Bereiches der verwendeten IPG-Strips liegt. Des Weiteren wird hierdurch das System mit H_2O_{dest} versorgt, welches das Gel während langer Elektrophoresen vor Austrocknung schützt.

Nach Beendigung der IEF werden die IPG-Strips aus der Manifold genommen, nach dem Abtropfen von überschüssigem Mineralöl mit der Gelseite nach unten in Alufolie eingewickelt und anschließend auf Trockeneis eingefroren. Die IPG-Strips können so bis zu 3 Monate bei -20 °C gelagert werden.

4.2.9 Auftrennung der Proteine in der zweiten Dimension durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Bei der SDS-PAGE werden die Proteine nach ihrem Molekulargewicht (MW) voneinander getrennt. SDS (Natriumdodecylsulfat) ist ein anionisches Detergenz, durch das die Eigenladung der Proteine überdeckt wird. Es entstehen anionische Mizellen mit konstanter Nettoladung pro Masse-Einheit. Da durch SDS die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Molekülen aufgespalten werden, werden die Tertiär- und Sekundärstrukturen aufgelöst. Durch den Zusatz von reduzierenden Thiolverbindungen wie z.B. Dithiothreitol (DTT) werden außerdem vorhandene Disulfidbrücken der Proteine gelöst. Bei der Elektrophorese ergibt sich eine lineare Beziehung zwischen dem Logarithmus des Molekulargewichtes und den relativen Wanderungsstrecken des SDS-Polypeptid-Komplexes. Markerproteine ermöglichen die Ermittlung der Molekulargewichte unbekannter Proteine.

4.2.9.1 Herstellung der SDS-Polyacrylamidgele

Displacing-Solution:	1,5 M Tris-HCl pH8,8	50 ml
	Glycerin	100 ml
	Bromphenolblau	2 mg
	H ₂ O _{dest}	50 ml

Das Gießen der SDS-Polyacrylamidgele erfolgt im „DALT Gel Caster“ des „Hoefer DALT“-Systems von Amersham Biosciences. Der Caster wird auf die Rückseite in eine Plastikwanne gelegt und die Frontplatte abgeschraubt. Zwei Dreieckschwämme werden in die dafür vorgesehene Öffnung eingesetzt. Der Aufbau der Platten wird nach folgendem Schema durchgeführt: Zunächst wird ein „Seperator-Sheet“ im Caster platziert. Dann folgen immer abwechselnd eine Gekassette und ein Seperator-Sheet, wobei die flexiblen Silikon-Gelenke der Gekassetten immer abwechselnd nach links bzw. nach rechts ausgerichtet werden. Bei dem gesamten Aufbau ist darauf zu achten, dass alle Teile (Seperator-Sheets bzw. Gekassetten) immer an der den Schwämmen abgewandten Seite des Casters angelegt und in Richtung des Caster-Bodens geschoben werden. Der restliche Freiraum im Caster, der nicht von Gekassetten eingenommen wird, wird mit entsprechend dicken „Filler-Blocks“ oder zusätzlich mit Seperator-Sheets aufgefüllt, bis der Stapel eine Ebene mit der Caster-Kante erreicht. Zwischen den Caster und die Frontplatte wird eine mit Silikon eingefettete Gummi-Dichtung in die dafür vorgesehene Rille eingebracht. Die Frontplatte wird aufgesetzt und vorsichtig zugeschraubt. Der Caster wird anschließend aufgestellt, so dass die Öffnung nach oben ausgerichtet ist. Ein Plastikröhrchen wird in den Gummiring der „Balance-Kammer“ eingeführt und ein Trichter aufgesteckt.

Die SDS-Polyacrylamid-Lösung wird bis auf APS und den Radikalbildner TEMED zusammenpipettiert.

Tab. 1 Zusammensetzung für 22 12 %-ige SDS-Polyacrylamidgele

Reagenzien	22 Gele, 12 %
H ₂ O _{dest}	512,9 ml
30 % Acrylamid-	
0,8 % Bisacrylamid-Fertiglösung (37,5:1)	624 ml
1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)	390 ml
10 % (w/v) SDS	15,6 ml
10 % (w/v) APS	15,6 ml
TEMED	156 µl

Anschließend wird die Balance-Kammer mit 150 ml Displacing-Solution gefüllt. Die SDS-Polyacrylamid-Lösung wird mit APS und TEMED versetzt, auf einem Rührer gut gemischt und langsam, luftblasenfrei in den Trichter gefüllt. Anschließend wird das Plastikröhrchen entfernt, so dass die Displacing-Solution nachlaufen und die unterhalb der Gekassetten befindliche SDS-Polyacrylamid-Lösung von unten in die Gekassetten drücken kann (evtl. kann zusätzliche Displacing-Solution in die Balance-Kammer nachpipettiert werden). Die obere Gelfront sollte anschließend etwa 1 cm unterhalb der Glaskante der Gekassetten sein. Jedes Gel wird sofort mit 2 ml H₂O_{dest} überschichtet. Der Caster wird mit Klarsichtfolie abgedeckt und zur Auspolymerisierung der Gele 2 h stehengelassen.

Nach 2 h wird die Frontplatte vorsichtig abgeschraubt, so dass die Displacing-Solution ablaufen kann. Die einzelnen Gekassetten sowie die Oberfläche der Gele werden mit warmem Wasser abgewaschen, um Gelreste zu entfernen, und anschließend mit H₂O_{dest} nachgespült. Die Gekassetten werden in Klarsichtfolie eingepackt und in H₂O_{dest} bei 4 °C gelagert.

4.2.9.2 Herstellung von Molekulargewichtsstandards für die zweite Dimension

1,5 µl Broad Range Molecular Weight Proteinstandard (BioRad) werden mit 28,5 µl Laemmli-Puffer verdünnt und 3 min bei 100 °C erhitzt. Hierzu werden 230 µl 0,5 % M-Agarose in 1x SDS-Laufpuffer pipettiert und gut vermischt. Das Gemisch wird sofort mit Hilfe eines Spritzenaufsatz luftblasenfrei in ein Glasröhrchen aufgezogen. Nach dem Erstarren des Gemisches wird es vorsichtig mit Hilfe einer mit Wasser gefüllten Spritze auf einen Parafilm herausgedrückt und mit einem sauberen Skalpell in 0,5 cm große Stücke geschnitten. Die Marker-Stückchen werden in einem Eppendorf-Cap bei -20 °C gelagert.

4.2.9.3 Vorbereiten der IEF-Gele und Starten der 2. Dimension

Äquibrierungslösung:

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

Die IPG-Strips werden ca. 5 min bei RT aufgetaut, anschließend in jeweils 10 ml Äquibrierungslösung, die mit 100 mg DTT versetzt wurde, überführt und 15 min auf dem Schüttler äquilibriert. Das DTT reduziert vorhandene Disulfidbrücken in den Proteinen. Anschließend werden die Strips in jeweils 10 ml Äquibrierungslösung, die mit 250 mg Iodoacetamid (IAA) versetzt wurde, überführt und nochmals für 15 min auf dem Schüttler äquilibriert. Das IAA alkyliert die zuvor durch DTT reduzierten Schwefelgruppen in den Proteinen, um ihre Reoxidation während der Elektrophorese zu verhindern.

Die SDS-Gele werden mit 1x SDS-Laufpuffer überschichtet und der Strip nach Abstreifen überschüssiger Äquibrierungslösung auf einem mit H₂O_{dest} getränkten Whatman-Papier in den Zwischenraum der Gelkassette positioniert. Nach dem Absinken des IPG-Strips im 1 x SDS-Laufpuffer auf die Geloberfläche wird der 1 x SDS-Laufpuffer vorsichtig abgeschüttet, der IPG-Strip so in der Mitte der Gelkassette ausgerichtet, daß die Plastikseite des IPG-Strips Kontakt zur hinteren Glasplatte der Gelkassette aufweist, und neben dem Strip noch ein Marker-Stückchen positioniert (→ 4.2.9.2). Um den IPG-Strip zu fixieren und den Kontakt zwischen IPG-Strip und Geloberfläche zu gewährleisten, wird dieser mit 0,5 % M-Agarose in 1 x SDS-Laufpuffer überschichtet.

Die Gelkassetten werden anschließend mit den flexiblen Silikon-Gelenken nach oben in den mit etwa 20 l 1 x SDS-Laufpuffer gefüllten Elektrophorese-Tank des „Hoefer DALT“-Systems von Amersham Biosciences positioniert. Die Menge des Laufpuffers richtet sich nach der Anzahl der Gele und sollte mindestens bis zu den oberen Spacern der Gelkassetten, jedoch nicht über die Silikonrücken hinaus reichen. Nach Inbetriebnahme der Zirkulationspumpe und Kühlung des Systems auf 15°C erfolgt die Elektrophorese bei 90-110 V für etwa 18-20 h (über Nacht), bis die BPB-Lauffront das untere Ende der Gele erreicht.

4.2.10 Proteinfärbung mit Silbernitrat

Fixierer (ca. 250 ml pro Gel):	50 % Ethanol 12 % Essigsäure 38 % H ₂ O _{dest}
Oxidierer (pro Gel):	125 ml H ₂ O _{dest} 83 µl 37 % Formaldehyd 63 µl 43 % Na-Thiosulfat
Silbernitratlösung (pro Gel):	125 ml H ₂ O _{dest} 0,25 g AgNO ₃ 83 µl 37 % Formaldehyd

Entwickler (pro Gel):	125 ml H ₂ O _{dest} 7,5 g Na ₂ CO ₃ 63 µl 37 % Formaldehyd 2,3 µl 43 % Na-Thiosulfat
EDTA-Lösung (ca. 250 ml pro Gel):	40 mM EDTA

Nach Beendigung der Elektrophorese werden die Glasplatten der Gelkassetten aufgehoben, die Strips von den Gelen entfernt und die Gele für mindestens eine Stunde oder über Nacht unter leichtem Schwenken fixiert. Für die anschließende Färbung werden Oxidierer, Silbernitratlösung und Entwickler immer frisch angesetzt, wobei jeweils 125 ml pro Gel benötigt werden.

Nach dem Fixieren werden die Gele 2 x 30 min mit 30 %igem Ethanol gewaschen. Anschließend werden die Gele genau 1 min unter starkem Schwenken oxidiert und nach einem weiteren Waschschrift (3 x 1 min mit H₂O_{dest}) für 1 h mit der Silbernitratlösung gefärbt. Vor der Entwicklung werden die Gele zuerst 2 x 30 sec mit H₂O_{dest} gespült und solange in der Entwicklerlösung geschwenkt, bis die Proteine gut sichtbar sind (ca. 3-5 min). Die Entwicklung wird durch EDTA-Lösung abgestoppt. Alle Gele sollten gleich lang entwickelt werden, um die Proteinexpressionsmuster anschließend miteinander vergleichen zu können. Die Gele werden eingescannt und anschließend in Plastikfolie eingeschweißt.

4.2.11 Proteinfärbung mit kolloidalem Coomassie

Stocklösung A:	1 %-ige Coomassie Blau (G250)-Lösung in H ₂ O _{dest}
Stocklösung B:	10 ml Stocklösung A 10 g (NH ₄) ₂ SO ₄ 2 % H ₃ PO ₄ ad 100 ml H ₂ O _{dest}
Gebrauchslösung :	160 ml Stocklösung B 40 ml MeOH

Die SDS-Polyacrylamidgele werden vor der Färbung 2 h mit ca. 250 ml 12 % TCA fixiert. Anschließend werden sie 2-3 Tage mit 200 ml kolloidalem Coomassie (Gebrauchslösung) unter vorsichtigem Schwenken gefärbt. Für die Prozedur sollte man nur extra dafür vorgesehene Behälter verwenden und die Gele nur vorsichtig am Rand mit sauberen Handschuhen anfassen, da Kontaminationen die anschließende MALDI-ToF (→ 4.2.12.2) stören könnten. Die Gele werden mindestens 7 h mit H₂O_{dest} entfärbt, wobei das H₂O_{dest} mehrmals gewechselt wird. Die gefärbten Gele werden eingescannt und können bis zu drei Tage in H₂O_{dest} aufbewahrt werden.

4.2.12 Analyse der 2D-Gele

4.2.12.1 Western-Blot

Mit den ungefärbten 2D-Gelen kann wie unter 4.2.2 beschrieben ein Westernblot durchgeführt werden.

4.2.12.2 MALDI-ToF-MS

Der Name MALDI-ToF-MS steht für Matrix-assisted-Laser-Desorptions-Ionisations-Time-of-Flight-Mass-Spectrometrie. Die Massenspektrometrie ist die analytische Auftrennung von einzelnen geladenen Molekülen durch elektrische und magnetische Felder im Vakuum. Aus dem Verhalten der Ionen bestimmt eine MS den Quotienten aus Masse (m) und Ladung (z) eines Ions und kann bei Kenntnis der Ladung die Masse selbst ermitteln. Anschließend kann anhand einer vergleichenden Suche in Datenbanken nach der Identität des Proteins gesucht werden.

4.2.12.3 Auswertung mit der Delta 2D Software von DECODON

Diese Software ermöglicht den Vergleich von zwei eingescannten 2D-Gelen. Die tif-Files der beiden Gele werden übereinander gelagert und den Spots des jeweiligen Gels eine Falschfarbe zugeordnet. So kann man unterschiedlich starke Expressionen der einzelnen Proteine miteinander vergleichen.

4.3 Arbeiten mit Bakterien

4.3.1 Wachstumskurven

Übernachtskulturen werden 1:20 in BHI verdünnt und unter Schütteln bei 37°C inkubiert. In regelmäßigen Abständen wird von der Bakterienkultur ein Aliquot entnommen und die optische Dichte im Photometer bei einer Wellenlänge von 600nm bestimmt. Diese Werte werden notiert und graphisch als Wachstumskurve dargestellt.

4.3.2 Wachstum unter Stressbedingungen

Zur Überwachung des Bakterienwachstums unter Stressbedingungen werden Übernachtskulturen wie unter 4.3.1 beschrieben verdünnt und dem Kulturmedium verschiedene Stressreagenzien (Ethanol, NaCl) zugesetzt. Die Kulturen werden wie oben beschrieben inkubiert und die optische Dichte zu verschiedenen Zeitpunkten bestimmt. Hieraus resultiert ebenfalls eine Wachstumskurve. Als Kontrolle dient jeweils der Wildtypstamm *L. monocytogenes* EGDe WT.

4.3.3 Empfindlichkeit gegenüber Wasserstoffperoxid (H₂O₂)

Um die Empfindlichkeit bestimmter Bakterienstämme gegenüber H₂O₂ zu bestimmen, wird eine Übernachtskultur zur Ausbildung eines Zellrasens auf Agarplatten ausplattiert. Anschließend werden Filterplättchen (Durchmesser 5mm) mit verschiedenen Konzentrationen von H₂O₂ getränkt und diese auf die Agarplatten aufgebracht. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert und die Wachstumshemmung durch H₂O₂ anhand des Durchmessers der Hemmhöfe um die Filterplättchen herum bestimmt.

4.3.4 Motilitätstest

Für diesen Test werden Einzelkolonien der zu vergleichenden Stämme mit einer sterilen Pipettenspitze jeweils in 0,25%- und 0,6%-Weichagarplatten eingestochen und diese sowohl bei 24°C als auch bei 37°C inkubiert. Nach 24 Stunden wird die Ausbreitung der untersuchten Stämme verglichen indem der Durchmesser der Kolonien vom Einstichpunkt aus gemessen wird.

4.4 Zellkultur

Eukaryotische Zellen werden in humider Atmosphäre in CO₂-Begasungsbrutschränken bei 37°C in speziellen Petrischalen oder Kulturflaschen gehalten. Die verwendeten Puffer und Medien werden stets auf 37°C vorgewärmt.

RPMI-Komplettmedium:

FCS (fötales Kälberserum, hitzeinaktiviert)	50 ml
Penicillin-Streptomycin-Lsg. (P: 500U/ml; S: 5mg/ml)	5 ml
<hr/>	
	Ad 500 ml RPMI-Medium

RPMI-Komplettmedium ohne Antibiotikum:

FCS (fötales Kälberserum, hitzeinaktiviert)	50 ml
<hr/>	
	Ad 500 ml RPMI-Medium

10x PBS:

NaCl	80,0 g
KCl	2,0 g
Na ₂ HPO ₄	11,5 g
KH ₂ PO ₄	2,0 g
<hr/>	
	Ad 1000 ml H ₂ O _{dest}

10x Ca²⁺/Mg²⁺:

MgCl ₂ x 6 H ₂ O	1,0 g
CaCl ₂	1,0 g
<hr/>	
	Ad 1000 ml H ₂ O _{dest}

PBS + Ca²⁺/Mg²⁺:

(nicht autoklavieren)

10 x PBS	100 ml
10x Ca ²⁺ /Mg ²⁺	100 ml
<hr/>	
	ad 1000 ml H ₂ O _{dest}

Trypsin/EDTA-Lösung:

Trypsin	0,5 %
EDTA	0,2 %

4.4.1 Herstellung von Bakterienaliquots

- ⇒ eine Übernachtskultur des Bakterienstammes wird 1:25 verdünnt und bis zu einer optischen Dichte von 1,0 angezogen
- ⇒ 20 ml der Zellen werden 10 Min. bei 4°C und 6000 rpm abzentrifugiert, mit 20 ml 1xPBS gewaschen und erneut zentrifugiert
- ⇒ Das Zellpellet wird in 20 ml 1xPBS/Glycerin (1:5) resuspendiert, in 1ml-Portionen aliquotiert und bei -80°C eingefroren
- ⇒ Am darauf folgenden Tag werden jeweils von dem ersten und letzten der aliquotierten Eppendorf-Caps Verdünnungsreihen hergestellt und je 100 µl der Verdünnungsstufen 10⁻⁵ bis 10⁻⁷ auf BHI-Platten ausplattiert und diese über Nacht im 37°C-Brutschrank inkubiert
- ⇒ Am nächsten Tag werden aus den Kolonien die Lebendzellzahlen bestimmt und der jeweilige Durchschnittswert aus den Verdünnungen des ersten und letzten Caps ermittelt und der Durchschnitt dieser beiden Werte gebildet, um mögliche Fehler durch ein Absetzen der Bakterien während des Aliquotierens für alle Aliquots heraus zu mitteln.
- ⇒ Mit den erhaltenen Bakterienzellzahlen / ml wird am Tag der Infektion des Infektionsmedium mit FCS-freiem Medium auf eine MOI von 10 (für Caco-2-Zellen) bzw. auf eine MOI von 20 (für HepG2-Zellen), respektive der ermittelten Zellzahl / Napf eingestellt.
- ⇒ Dabei wird die entsprechende Konzentration auf ein Volumen an Infektionsmedium / Napf von 0,5 ml berechnet um eine Applikation der Bakterien in räumlicher Nähe zu den Zellen zu ermöglichen

4.4.2 Auftauen und Einfrieren eukaryontischer Zellen (53)**Auftauen eukaryontischer Zellen**

Die Lagerung eukaryontischer Zellen erfolgt in flüssigem Stickstoff (-196°C). Um Kristallbildung innerhalb und außerhalb des Cytoplasmas sowie Dehydratation zu vermeiden, werden üblicherweise 10% DMSO (Dimethylsulfoxid) zugesetzt.

Die in flüssigem Stickstoff gelagerten Zellen werden bei 37°C im Wasserbad aufgetaut und sofort in einer Flasche mit vorgewärmtem Kulturmedium ausgesät

Nach 3-6 h wird überprüft, ob sich die Zellen bereits am Flaschenboden abgesetzt haben und wechselt anschließend das (noch DMSO-haltige) Medium

Einfrieren eukaryontischer Zellen

- ⇒ Die Zellen werden zunächst durch Trypsinieren vom Flaschenboden abgelöst
- ⇒ Man bestimmt die Zellzahl und stellt diese auf 2-4 x 10⁶ Zellen ein
- ⇒ Auf Eis werden jeweils 900 µl Zellsuspension in einem Kryoröhrchen mit 100 µl DMSO versetzt und über Nacht bei -70°C eingefroren, bevor sie in flüssigem Stickstoff gelagert werden.

4.4.3 Subkultivierung eukaryontischer Zellen

Trypsinierung eukaryontischer Zellen

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

- ⇒ Nach dem Absaugen des Mediums aus der Kulturflasche werden die Zellen 2 x mit 10 ml 1 x PBS ohne Ca^{2+} / Mg^{2+} gewaschen. Hierdurch werden Ca^{2+} - und Mg^{2+} -Ionen aus dem Medium entfernt.
- ⇒ Nach Zugabe von 1-2 ml Trypsin/EDTA-Lösung erfolgt Inkubation bei 37°C für ca. 5-10 Minuten.
- ⇒ Das Ablösen der Zellen wird makroskopisch und mikroskopisch kontrolliert und die Zellen werden in frischem Medium gründlich resuspendiert.
- ⇒ Die Zellen werden in einem Verhältnis von 1:4-1:10 in eine neue Kulturflasche ausgesät.
- ⇒ Die Flaschen werden im Brutschrank bei 37°C inkubiert.

4.4.4 Bestimmung der Lebendzellzahl (LZZ)

Der Farbstoff Trypanblau dient zur Differenzierung zwischen lebenden und toten Zellen. Bei toten Zellen dringt der Farbstoff durch die Zellwand in die Zelle ein und verursacht so eine Blaufärbung. Lebende Zellen nehmen Trypanblau nur sehr langsam auf und werden im Mikroskop als weiße Zellen sichtbar.

Die Bestimmung der Lebendzellzahl erfolgt mit Hilfe der Fuchs-Rosenthal-Zählkammer:

- ⇒ 20 µl der abtrypsinisierten Zellen werden mit 20 µl Trypanblau versetzt und in der Zählkammer ausgezählt.
- ⇒ Es werden 4 Großquadrate mit je 16 Kleinquadraten ausgezählt und das arithmetische Mittel bestimmt.
- ⇒ Zur Bestimmung der Zellzahl, multipliziert man den erhaltenen Wert mit dem Kammerfaktor 5×10^3 :

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

Eine Anfärbung von HepG2-Zellen ist jedoch nicht nötig, da eine Differenzierung zwischen lebenden und toten Zellen auch ohne Farbstoff möglich ist.

4.4.5 Invasionsassay von *L. monocytogenes* in Caco-2-Zellen

- ⇒ Es werden drei *L. monocytogenes*-Tyrosin-Phosphatase-Deletionsmutanten und der Wildtyp in einer bestimmten MOI (multiplicity of infection; Verhältnis Bakterienzellen / ausgesäte Zellen) auf einen semikonfluenten Caco-2-Zellrasen gegeben. Die Bakterien induzieren ihre eigene Phagozytose in die Leberzellen.
- ⇒ Nach 1,5 h wird Gentamycin dazugegeben, wodurch alle extrazellulären Bakterien abgetötet werden. Lysiert man die Zellen nach 0, 4 (5) und 24 h und bestimmt die Lebendzellzahl der Bakterien durch Ausplattieren, kann eine Aussage über die Invasivität und das intrazelluläre Wachstumsverhalten der Bakterien getroffen werden. So kann der Beitrag eines bestimmten Gens zu Invasion und intrazellulärer Replikation durch Vergleich der Deletionsmutante mit dem Wildtyp bestimmt werden.

a) Aussäen der Zellen

- ⇒ Für eine Infektion von Caco-2-Zellen wird 21-24 Std. vor Infektionsbeginn mit dem Aussäen der Zellen begonnen. Zunächst werden die Zellen durch Trypsinisierung vom Boden der Flasche gelöst und in einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer die Zelldichte bestimmt. Die Zellzahl wird dann auf 5×10^5 Zellen

/ ml eingestellt. Anschließend wird aus dieser Suspension je 1 ml pro well in einer 12well-Kulturplatte ausgesät.

b) Infektion der Caco-2-Zellen

- ⇒ Die Caco-2-Zellen werden 2 x mit 1ml 1xPBS/Ca²⁺+Mg²⁺ gewaschen und mit 500 µl Infektionsmedium infiziert
- ⇒ Nach einer Infektionsdauer von 60 Min. bei 37°C und 5% CO₂ wird das Medium abgenommen und die Caco-2-Zellen 2 Mal mit 1ml 1xPBS/Ca²⁺+Mg²⁺ gewaschen. Hierdurch wird der Großteil der nicht-invadierten Bakterien entfernt.
- ⇒ Um verbleibende extrazelluläre Bakterien abzutöten wird nun ein Gentamycin-haltiges RPMI (100 µg/ml Gentamycin) zugegeben und die Ansätze für die weitere Zeit im Brutschrank inkubiert (→ „post infection“: p.i.).
- ⇒ Nach 1 Std. Inkubation wird der erste Messwert t=0 genommen, indem von diesem Ansatz das Medium abgenommen, 2 x mit 1ml 1xPBS/Ca²⁺+Mg²⁺ gewaschen wird und die Zellen durch Zugabe von 1ml sterilem, auf -20°C-abgekühltem 0,1%-Triton-X-100 lysiert werden
- ⇒ Nach mehrmaligem Resuspendieren wird das Lysat in ein Eppendorf-Cap überführt und 1 Min. lang gründlich gemischt.
- ⇒ Die restlichen Zellen werden ebenfalls 2 x mit 1ml 1xPBS/Ca²⁺+Mg²⁺ gewaschen und pro Napf 1ml RPMI-Medium + 10µg/ml Gentamycin zugegeben und die Zellen bis zu den weiteren Messpunkten bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.
- ⇒ Von den Lysaten werden Verdünnungsreihen hergestellt und je 100 µl aus verschiedenen Verdünnungsstufen auf BHI-Platten ausplattiert
- ⇒ Die BHI-Platten werden über Nacht bei 37°C inkubiert und am darauf folgenden Tag werden die colony forming units (CFU/ml) berechnet. Dies gibt Aufschluss über die Fähigkeit der einzelnen Stämme in Caco-2-Zellen einzudringen bzw. sich in diesen zu vermehren.
- ⇒ Ausgehend vom Messpunkt t=0 werden zu t=4h (t=5h) und t=24h die weiteren Messwerte wie oben beschrieben genommen.

CFU / ml = gezählte Kolonien x Verdünnungsstufe x 10

MOI = 10 x [Bakterienzahl / 0,5 ml Infektionsmedium] : [eukaryontische Zellen / Napf]

c) Infektion in Zellkulturflaschen

Zur Untersuchung der intrazellulären Expression bestimmter Gene werden auch Infektionen in Kulturflaschen durchgeführt um größere Mengen an Listerien im Stadium der Infektion zu gewinnen. Hierzu werden die Zellen sowohl mit dem Wildtyp-Stamm als auch mit den entsprechenden Deletionsmutanten infiziert.

- ⇒ Die Infektion wird wie oben beschrieben durchgeführt, jedoch wird in einem Volumen von 10 – 20 ml in der Flasche gearbeitet und von einer zuvor ermittelten Zellzahl / Flasche ausgegangen
- ⇒ Die Infektion erfolgt für 5-6 h im Begasungsbrutschrank
- ⇒ Nach Ablauf der Infektionszeit werden die Zellen mit 10 ml eiskaltem H₂O_{dest} /steril lysiert und für 30 Min. auf Eis inkubiert
- ⇒ Die Zellen werden durch Schütteln und Schaben vom Flaschenboden gelöst, in einem sterilen Greinerröhrchen aufgenommen und zentrifugiert (6000 rpm, 4°C, 15 Min.)
- ⇒ Der Überstand wird abgenommen und das Pellet bei -80°C eingefroren.
- ⇒ Die Isolierung der RNA erfolgt wie unter 4.1.14 beschrieben.

4.4.6 Untersuchung der frühen Assoziation von Bakterien mit Wirtszellen

Verzichtet man in dem unter 4.3.5 b beschriebenen Experiment auf die Post-Infektionszeit (p. i.) in Gentamycin-haltigem Medium, werden extrazelluläre Bakterien nicht abgetötet. Im Zelllysat befindet sich somit sowohl adhärente als auch intrazelluläre Bakterien. Verkürzt man die Infektionszeit auf 35 Min. wird die Anzahl der intrazellulären Bakterien gering gehalten. Auf diese Weise lässt sich die frühe Assoziation der Bakterien an die Wirtszell-Oberfläche untersuchen.

Die Zellen wurden wie in 4.3.5 a und b beschrieben vorbereitet. Nach einer Infektionszeit von 35 Min. wurden die Zellen fünfmal mit 1xPBS/Ca²⁺+Mg²⁺ gewaschen, in 0,1%-Triton-X-100 lysiert und anschließend auf BHI-Agarplatten ausplattiert. Die absolute Assoziationsrate wurde aus der Anzahl adhärenter bzw. invadierter Bakterien in Prozent zur eingesetzten Bakterienmenge errechnet.

5 Ergebnisse

5.1 Versuche zur Replikation der Phosphatase-Mutanten $\Delta ptp-1$, $\Delta ptp-2$ und $\Delta ptp-1/2$ in BHI-Medium unter verschiedenen Bedingungen

Zur Überprüfung, ob durch die Deletion eines der Phosphatase-Gene Wachstumsdefekte auftreten, wurde zunächst das Wachstum in Vollmedium (BHI) bei unterschiedlichen Temperaturen (24°C, 37°C und 42°C) sowie in Gegenwart von 4% NaCl, bzw. 5% Ethanol in Flüssigkultur überprüft. Hierzu wurden Übernachtskulturen der drei Mutanten-Stämme sowie des Wildtyps 1:20 verdünnt und über einen Zeitraum von bis zu 24 Std. die optische Dichte der Kulturen bestimmt. Aus diesen Werten wurde eine Wachstumskurve erstellt. Die Ergebnisse dieser Wachstumskurven sind in Tab. 2 dargestellt. Zusätzlich wurde die Empfindlichkeit der *ptp*-Mutanten gegenüber 25 μM H_2O_2 untersucht und in TSB-Medium (*tryptic soy broth*) mit 25mM Mannose.

Tab. 2: Vergleich des Wachstums der *ptp*-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp unter verschiedenen Bedingungen; (+)= Wachstum wie Wildtyp; (-)= stärkere Wachstumshemmung als bei WT

Stamm	24°C	37°C	42°C	37°C + 4% NaCl	37°C + 5% EtOH	37°C + 25 μM H_2O_2	TSB + 25mM Mannose
$\Delta ptp-1$	+	+	+	+	+	+	+
$\Delta ptp-2$	+	+	+	+	+	+	+
$\Delta ptp-1/2$	+	+	+	+	+	-	+

Es zeigten sich für keine der oben genannten Wachstumsbedingungen Unterschiede zwischen dem Wildtyp und den *ptp*-Mutanten. Auch beim Wachstum in TSB-Medium, welches ein Minimalmedium für Listerien darstellt, mit Mannose als einziger Kohlenstoffquelle zeigten sich keine Unterschiede im Wachstumsverhalten zwischen Wildtyp und *ptp*-Mutanten.

5.2 Versuche zur Assoziation, Invasion und intrazellulärer Replikation in Caco-2-Epithelzellen

Die Infektion humaner Caco-2-Epithelzellen mit *L. monocytogenes* dient dazu Assoziation, Invasion und intrazelluläre Vermehrung fakultativ intrazellulärer Bakterien in nicht-professionelle Phagozyten zu untersuchen. Hierbei kann der Einfluss bestimmter Gene auf den Verlauf der Infektion mittels geeigneter Mutanten im Vergleich zum Wildtyp festgestellt werden.

Petra Herrmann, die im Rahmen ihrer Diplomarbeit die unter 3.5 beschriebenen und in dieser Arbeit näher untersuchten Mutanten hergestellt hatte, konnte nachweisen, dass die Invasion der *ptp*-Mutanten in HepG2-Zellen im Vergleich zum Wildtyp stark abgeschwächt ist, wohingegen sich die *ptp*-Mutanten hinsichtlich ihrer intrazellulären Replikation nicht vom Wildtyp unterscheiden (Daten nicht gezeigt).

Zur Überprüfung wurden im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit Infektionsexperimente in Caco-2-Zellen durchgeführt. Dazu wurden konfluente Zellmonolayer von Caco-2-Zellen mit einer entsprechenden Bakteriendichte für 1 h infiziert, anschließend zur Entfernung nicht-invasierter Bakterien mehrmals gewaschen und nachfolgend in einem Gentamycin-haltigen Medium inkubiert, in dem alle extrazellulären Bakterien abgetötet werden. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Infektion kann durch gezielte Zellyse die Anzahl der intrazellulären Bakterien bestimmt werden. Vergleicht man die Anzahl dieser Bakterien über einen längeren Zeitraum (üblicherweise 24 h), so kann eine Aussage über die Invasion und auch die intrazelluläre Replikation der untersuchten Stämme getroffen werden.

5.2.1 Invasion und intrazelluläre Replikation

In diesem Versuch wurden konfluente Zellmonolayer wie unter 4.4.5 beschrieben infiziert und zu den Zeitpunkten $t=0h$, $t=4h$ und $t=24h$ durch Zellyse die Anzahl intrazellulärer Bakterien bestimmt.

Abbildung 10 zeigt die Anzahl intrazellulärer Bakterien zum Zeitpunkt $t=0$. Die zu diesem Zeitpunkt vorhandenen Bakterien geben auch Aufschluss über die Invasionsfähigkeit der untersuchten Bakterien. Hier ist deutlich zu sehen, dass die *ptp*-Mutanten sich weniger invasiv als der Wildtyp verhalten.

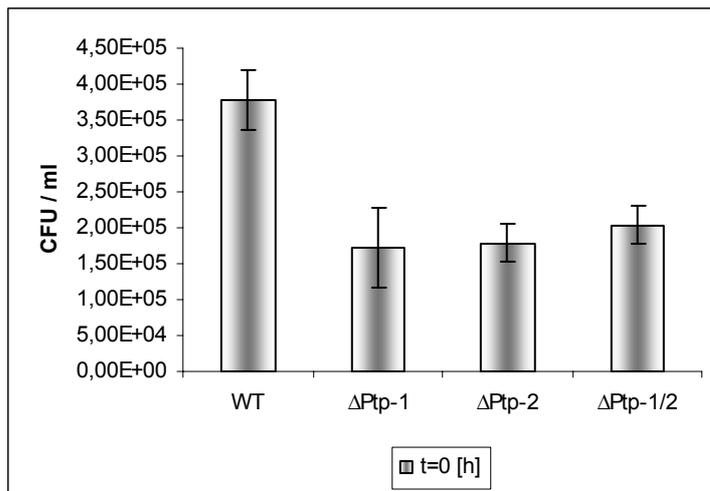


Abb. 10: CFU (colony forming units) / ml zum Zeitpunkt 0

Dies wird noch deutlicher, wenn man die relative Invasionsrate der Mutanten im Vergleich zum Wildtyp graphisch darstellt (siehe Abbildung 11).

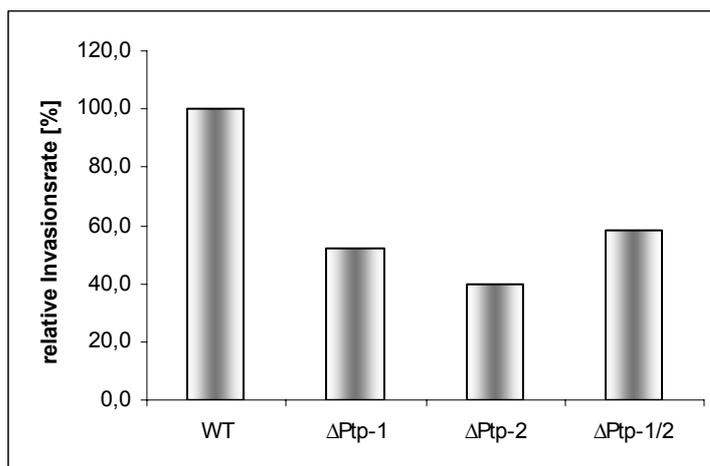


Abb. 11: Relative Invasionsrate in % im Vergleich zum Wildtyp

Die Invasionsraten liegen bei 52% für die $\Delta ptp-1$ -Mutante, 40% für die $\Delta ptp-2$ -Mutante und bei 59% für die $\Delta ptp-1/2$ -Doppelmutante.

Im weiteren Infektionsverlauf wurden zum Zeitpunkt t=4 und t=24 h erneut durch Zellyse die Bakterienzahlen bestimmt. Vergleicht man hier die Bakterienzahlen zwischen mit Wildtyp-infizierten Caco-2-Zellen und denen, die mit den *ptp*-Mutanten infiziert wurden, so lässt sich kein Unterschied bezüglich der intrazellulären Replikation feststellen (siehe Abbildung 12).

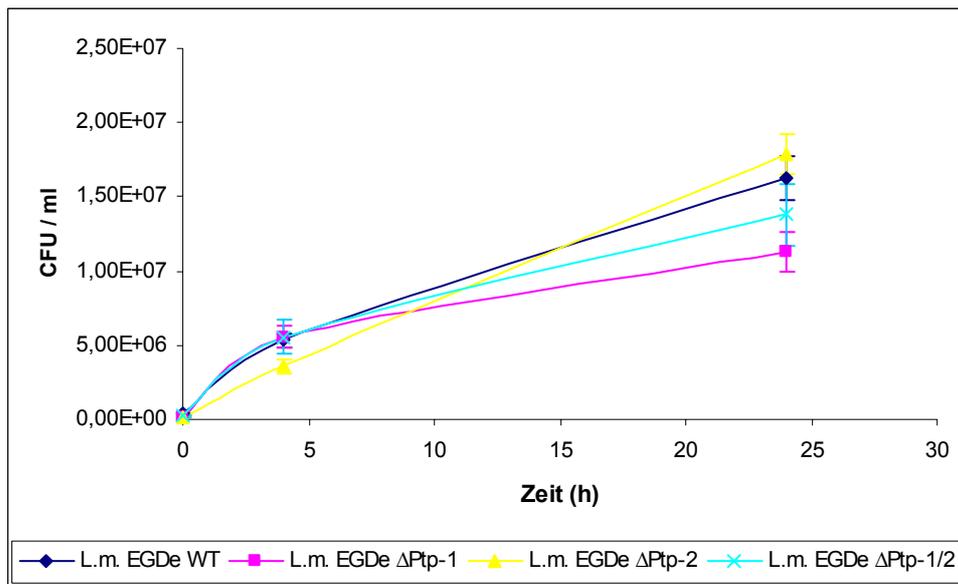


Abb. 12: Intrazelluläre Replikation in Caco-2-Zellen (CFU = colony forming units)

Es lässt sich feststellen, dass die *ptp*-Mutanten weniger invasiv sind als der Wildtyp, dass sich die intrazelluläre Replikation jedoch nicht signifikant unterscheidet.

5.2.2 Versuch zur frühen Assoziation an Caco-2-Zellen

Da die *ptp*-Mutanten – wie oben gezeigt – eine verringerte Invasivität in Caco-2-Zellen aufweisen, ihre intrazelluläre Vermehrung jedoch wildtypisch verläuft, könnte der beobachtete Unterschied der Invasivität durch eine verringerte Anheftungsfähigkeit der *ptp*-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp zu erklären sein. Auch hier wurde bereits von Petra Herrmann gezeigt, dass die Adhäsion an HepG2-Zellen auf Seiten der *ptp*-Mutanten deutlich verringert ist.

Zur Untersuchung der Adhärenz der *ptp*-Mutanten an Caco-2-Zellen wurden wiederum Monolayer wie unter 4.4.5) beschrieben infiziert und nach einer Infektionszeit von 35 Min. fünfmal mit 1xPBS $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ gewaschen um übrige extrazelluläre Bakterien zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen lysiert und wiederum die Bakterienanzahl bestimmt. Diese gibt Aufschluss über die Anzahl adhärenter Bakterien und spiegelt die Fähigkeit zur Assoziation an Caco-2-Zellen wieder.

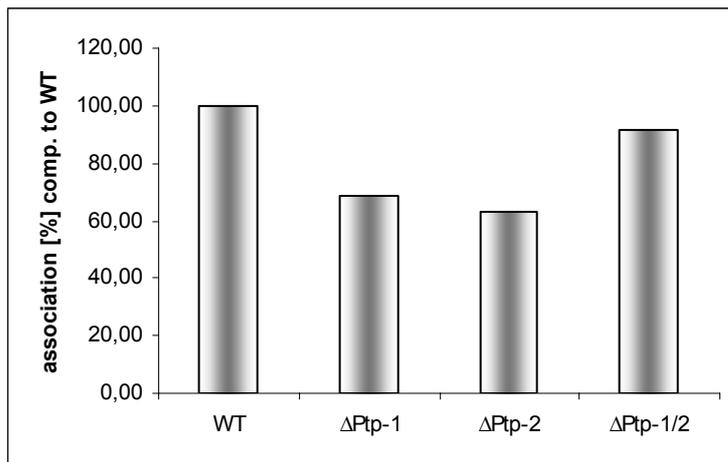


Abb. 13: Assoziationsrate in % im Vergleich zum Wildtyp

Abbildung 13 zeigt, dass die *ptp*-Mutanten schlechter an Caco-2-Zellen adhäreren als der Wildtyp. Für die $\Delta ptp-1$ -Mutante liegt die Assoziationsrate bei 68%, für die $\Delta ptp-2$ -Mutante bei 63% und bei knapp 92% für die $\Delta ptp-1/2$ -Doppelmutante. Leider erwies sich die Reproduktion dieses Versuchs als schwierig, wobei wiederholt unterschiedliche Assoziationsraten ermittelt wurden.

5.3 Gesamttranskriptionsprofilierung mittels DNA-Microarrays

Zur Identifizierung von Zielgenen von *ptp-1* und *ptp-2* wurden DNA-Microarray-Experimente durchgeführt. Diese Gesamtgenom-Microarrays enthalten 70mer Oligodesoxyribonucleotide aller offenen Leserahmen des *L. monocytogenes*-Genoms. Die Oligonukleotide wurden entsprechend der Herstellerangaben auf Epoxy-beschichtete Glas-Objektträger von Quantifoil gespottet (T. Chakraborty; Institut für Medizinische Mikrobiologie, Gießen, Deutschland).

Es wurden die Transkriptome von *L. monocytogenes* EGDe und *L. monocytogenes* $\Delta ptp-1$, $\Delta ptp-2$ und $\Delta ptp-1/2$ verglichen.

Insgesamt wurden 6 RNA-Proben für die Markierung und Hybridisierung der cDNA hergestellt. Es wurden jeweils gleiche Mengen der zu vergleichenden RNA-Proben (40 μ g) mittels Superscript II™ (Invitrogen, Germany) und den fluoreszenzmarkierten Nukleotiden Cy3-dCTP und Cy5-dCTP (Amersham Pharmacia, Karlsruhe, Germany) in cDNA umgeschrieben. Die beiden unterschiedlich markierten cDNA-Proben wurden vereinigt und auf dem Microarray hybridisiert. Das Scannen und die Auswertung der Microarrays erfolgte mit dem ScanArray HT und der ScanArray Express Software (Perkin Elmer, Boston, MA).

Bei den angegebenen normalisierten Genexpressionswerten (TL \emptyset) handelt es sich um Durchschnittswerte aus drei unabhängigen Experimenten. Die Ausschlussgrenzen wurden bei 2 bzw. 0,5 gesetzt, d.h. Gene mit Expressionswerten $> 2,0$ wurden in der jeweils

getesteten Mutante als stärker exprimiert und solche mit Expressionswerten < 0,5 als in den Mutanten schwächer exprimiert betrachtet. Es wurden auch solche Gene als reguliert betrachtet, deren Expressionswerte jeweils knapp über bzw. knapp unter den oben erwähnten Schwellenwerten liegen.

Vergleich der Transkriptome von *L. monocytogenes* EGDe WT und Δ *ptp-1*

Tabelle 3 zeigt einen Ausschnitt aus der Liste von Genen von *L. monocytogenes* EGDe, deren Transkription durch Ptp-1 reguliert wird. Gene, deren Transkription durch PrfA reguliert werden, sind durch ein (*), solche die durch SigB reguliert werden durch ein (#) gekennzeichnet.

Tab. 3: Tabellarische Auflistung der durch Ptp-1 regulierten Gene;

TL (Ø)=Transkriptionslevel (Durchschnitt aus 3 voneinander unabhängigen Experimenten); **(*)**= durch PrfA reguliert; **(#)**= durch SigB reguliert

Name	Gen ID	Funktion	TL (Ø)
<i>actA</i>	lmo0204	actin-assembly inducing protein precursor (*,#)	1,92
<i>foA</i>	lmo0225	dihydroneopterin aldolase	2,14
<i>hly</i>	lmo0202	listeriolysin O precursor (*)	2,29
lmo0037	lmo0037	amino acid transporter	0,54
lmo0170	lmo0170	no gene description	0,42
lmo0174	lmo0174	transposase	0,35
lmo0539	lmo0539	tagatose-1,6-diphosphate aldolase (#)	0,33
lmo0554	lmo0554	NADH-dependent butanol dehydrogenase (#)	0,22
lmo0555	lmo0555	di-tripeptide transporter (#)	0,26
lmo0589	lmo0589	no gene description	0,44
lmo0590	lmo0590	a fusion of two types of conserved hypothetical protein	0,42
lmo0591	lmo0591	unknown membrane proteins	0,42
lmo0596	lmo0596	unknown proteins	0,26
lmo0647	lmo0647	no gene description	0,47
lmo0669	lmo0669	oxidoreductase (#)	0,25
lmo0674	lmo0674	no gene description	0,41
lmo0722	lmo0722	pyruvate oxidase (#)	0,27
lmo0724	lmo0724	<i>B. subtilis</i> YvpB protein (#)	0,45
lmo0782	lmo0782	mannose-specific phosphotransferase system (PTS) component IIC (#)	0,27
lmo0783	lmo0783	mannose-specific phosphotransferase system (PTS) component IIB (#)	0,36
lmo0784	lmo0784	mannose-specific phosphotransferase system (PTS) component IIA (#)	0,18
lmo0794	lmo0794	<i>B. subtilis</i> YwnB protein	0,37
lmo0820	lmo0820	some similarity to acetyltransferases	0,47
lmo0912	lmo0912	transporters (formate)	0,32
lmo0914	lmo0914	PTS system, IIB component	0,36
lmo0938	lmo0938	protein-tyrosine-phosphatase (Ptp-1)	0,14
lmo0939	lmo0939	no gene description	0,41
lmo1261	lmo1261	no gene description	0,43
lmo1374	lmo1374	branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase E2 subunit (lipoamide acyltransferase)	0,14

Name	Gen ID	Funktion	TL (Ø)
lmo1421	lmo1421	glycine betaine/carnitine/choline ABC transporter (ATP-binding protein) (#)	0,29
lmo1433	lmo1433	glutathione reductase (#)	0,58
lmo2230	lmo2230	arsenate reductase (#)	0,19
lmo2231	lmo2231	unknown proteins (#)	0,22
lmo2434	lmo2434	glutamate decarboxylases	0,33
lmo2484	lmo2484	B. subtilis YvID protein	0,37
lmo2571	lmo2571	nicotinamidase	0,42
lmo2602	lmo2602	conserved hypothetical protein	0,52
lmo2671	lmo2671	no gene description	0,39
lmo2674	lmo2674	ribose 5-phosphate epimerase	0,20
lmo2695	lmo2695	dihydroxyacetone kinase	0,26
lmo2696	lmo2696	hypothetical dihydroxyacetone kinase	0,26
<i>mcp</i>	lmo0723	methyl accepting chemotaxis protein	0,30
<i>opuCA</i>	lmo1428	glycine betaine/carnitine/choline ABC transporter (ATP-binding protein) (#)	0,26
<i>opuCB</i>	lmo1427	glycine betaine/carnitine/choline ABC transporter (membrane protein) (#)	0,23
<i>opuCC</i>	lmo1426	glycine betaine/carnitine/choline ABC transporter (osmoprotectant-binding protein) (#)	0,25
<i>opuCD</i>	lmo1425	betaine/carnitine/choline ABC transporter (membrane protein) (#)	0,20
<i>pflA</i>	lmo1917	pyruvate formate-lyase	2,15
<i>plcA</i>	lmo0201	phosphatidylinositol-specific phospholipase c (*)	2,16
<i>plcB</i>	lmo0205	phospholipase C (*)	2,12

Unter den durch Ptp-1 regulierten Genen finden sich verschiedene Transport- und Bindungsproteine, wichtige Stoffwechsel-Enzyme, einige der PrfA-abhängigen Virulenzgene und einige Gene unbekannter Funktion. Die angegebenen Genexpressionswerte (TL Ø) geben das Maß der Genregulation an. Auffallend ist, dass deutlich mehr Gene in der $\Delta ptp-1$ -Mutante schwächer exprimiert werden als im Wildtyp. Stärker exprimierte Gene finden sich nur sehr wenige (*actA*, *plcA*, *plcB*, *hly*, *pflA* und *foIA*), einige davon gehören zu den PrfA-abhängigen Virulenzgenen.

Vergleich der Transkriptome von *L. monocytogenes* EGDe WT und Δ ptp-2

In Tabelle 4 werden einige der durch Ptp-2 regulierten Gene dargestellt.

Tab. 4: Tabellarische Auflistung der durch Ptp-2 regulierten Gene;

TL (Ø)=Transkriptionslevel (Durchschnitt aus 3 voneinander unabhängigen Experimenten); **(*)**= durch PrfA reguliert; **(#)**=durch SigB reguliert

Name	Gen ID	Funktion	TL (Ø)
<i>clpC</i>	lmo0232	endopeptidase Clp ATP-binding chain C	0,48
<i>glyA</i>	lmo2539	highly glycine hydroxymethyltransferase	2,34
lmo0406	lmo0406	<i>B. subtilis</i> YyaH protein	0,48
lmo0411	lmo0411	phosphoenolpyruvate synthase (N-terminal part)	0,45
lmo0539	lmo0539	tagatose-1,6-diphosphate aldolase (#)	0,25
lmo0554	lmo0554	NADH-dependent butanol dehydrogenase (#)	0,12
lmo0555	lmo0555	di-tripeptide transporter (#)	0,15
lmo0580	lmo0580	weakly carboxylesterase	0,47
lmo0590	lmo0590	a fusion of two types of conserved hypothetical protein (#)	0,35
lmo0591	lmo0591	unknown membrane proteins (#)	0,38
lmo0592	lmo0592	no gene description	0,45
lmo0596	lmo0596	unknown proteins (#)	0,18
lmo0647	lmo0647	no gene description (#)	0,33
lmo0648	lmo0648	membrane proteins (#)	0,47
lmo0650	lmo0650	conserved membrane protein	0,39
lmo0669	lmo0669	oxidoreductase (#)	0,18
lmo0674	lmo0674	no gene description	0,22
lmo0722	lmo0722	pyruvate oxidase (#)	0,18
lmo0724	lmo0724	<i>B. subtilis</i> YvpB protein (#)	0,41
lmo0781	lmo0781	mannose-specific phosphotransferase system (PTS) component IID (#)	0,58
lmo0782	lmo0782	mannose-specific phosphotransferase system (PTS) component IIC (#)	0,23
lmo0783	lmo0783	mannose-specific phosphotransferase system (PTS) component IIB (#)	0,57
lmo0784	lmo0784	mannose-specific phosphotransferase system (PTS) component IIA (#)	0,22
lmo0912	lmo0912	transporters (formate)	0,31
lmo0914	lmo0914	PTS system, IIB component	0,38
lmo0960	lmo0960	proteases	0,41
lmo0995	lmo0995	similar to <i>B. subtilis</i> YkrP protein (#)	0,18
lmo1374	lmo1374	branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase E2 subunit (lipoamide acyltransferase)	8,50
lmo1602	lmo1602	unknown proteins	0,49
lmo1694	lmo1694	CDP-abequose synthase (#)	0,43
lmo2230	lmo2230	arsenate reductase (#)	0,20
lmo2231	lmo2231	unknown proteins (#)	0,16
lmo2232	lmo2232	unknown proteins	0,44
lmo2484	lmo2484	<i>B. subtilis</i> YvID protein	0,44
lmo2485	lmo2485	<i>B. subtilis</i> yvIC protein	0,37
lmo2540	lmo2540	protein-tyrosine-phosphatase (Ptp-2)	0,21
lmo2674	lmo2674	ribose 5-phosphate epimerase (#)	0,20
lmo2696	lmo2696	hypothetical dihydroxyacetone kinase (#)	0,21

Name	Gen ID	Funktion	TL (Ø)
lmo2739	lmo2739	regulatory proteins of the SIR2 family	0,46
<i>mcp</i>	lmo0723	methyl accepting chemotaxis protein	0,43
<i>opuCA</i>	lmo1428	glycine betaine/carnitine/choline ABC transporter (ATP-binding protein) (#)	0,40
<i>opuCB</i>	lmo1427	glycine betaine/carnitine/choline ABC transporter (membrane protein) (#)	0,37
<i>opuCC</i>	lmo1426	glycine betaine/carnitine/choline ABC transporter (osmoprotectant-binding protein) (#)	0,38
<i>opuCD</i>	lmo1425	betaine/carnitine/choline ABC transporter (membrane protein) (#)	0,10

Als reguliert erscheinen auch hier die Gene für verschiedene Transport- und Bindungsproteine, verschiedene Stoffwechselfgene sowie einige Gene mit Homologien zu anderen Organismen bzw. Genen unbekannter Funktion. Hier findet man – wie auch beim Vergleich Wildtyp / $\Delta ptp-1$ -Mutante vorwiegend Gene, deren Expression in der $\Delta ptp-2$ -Mutante schwächer ausfällt als im Wildtyp. Insgesamt scheinen hier meist dieselben Gene reguliert zu sein wie in der $\Delta ptp-1$ -Mutante, jedoch fehlen die PrfA-abhängigen Virulenzgene. Als Gene mit in der $\Delta ptp-2$ -Mutante verstärkten Expression fallen hier *glyA* und lmo1374 auf.

Vergleich der Transkriptome von *L. monocytogenes* EGDe WT und $\Delta ptp-1/2$

Vergleicht man die Transkriptome von *L. monocytogenes* EGDe WT und $\Delta ptp-1/2$ (siehe Tabelle 5), so findet man unter den regulierten Genen ebenfalls solche, die für Transport- und Bindungsproteine, für Stoffwechsel-Enzyme sowie für Proteine mit Homologien zu anderen Organismen bzw. Proteinen unbekannter Funktion codieren.

Tab. 5: Vergleich der Transkriptome von *L. monocytogenes* EGDe WT und $\Delta ptp-1/2$;
TL (Ø)=Transkriptionslevel (Durchschnitt aus drei voneinander unabhängigen Experimenten);
(*)=durch PrfA reguliert; **(#)**= durch SigB reguliert

Name	Gen ID	Funktion	TL (Ø)
lmo0411	lmo0411	phosphoenolpyruvate synthase (N-terminal part)	0,49
lmo0539	lmo0539	tagatose-1,6-diphosphate aldolase (#)	0,31
lmo0554	lmo0554	NADH-dependent butanol dehydrogenase (#)	0,34
lmo0555	lmo0555	di-tripeptide transporter (#)	0,33
lmo0589	lmo0589	no gene description	0,35
lmo0590	lmo0590	a fusion of two types of conserved hypothetical proteinconserved hypothetical (#)	0,35
lmo0591	lmo0591	unknown membrane proteins (#)	0,23
lmo0596	lmo0596	unknown proteins	0,23
lmo0647	lmo0647	no gene description	0,35
lmo0669	lmo0669	oxidoreductase (#)	0,16
lmo0674	lmo0674	no gene description	0,19
lmo0722	lmo0722	pyruvate oxidase (#)	0,19
lmo0781	lmo0781	mannose-specific phosphotransferase system (PTS) component IID (#)	0,64
lmo0782	lmo0782	mannose-specific phosphotransferase system (PTS) component IIC (#)	0,36

Name	Gen ID	Funktion	TL (Ø)
lmo0783	lmo0783	mannose-specific phosphotransferase system (PTS) component IIB (#)	0,52
lmo0784	lmo0784	mannose-specific phosphotransferase system (PTS) component IIA (#)	0,24
lmo0938	lmo0938	protein-tyrosine-phosphatase (Ptp-1)	0,05
lmo2230	lmo2230	arsenate reductase (#)	0,12
lmo2231	lmo2231	unknown proteins (#)	0,11
<i>mcp</i>	lmo0723	methyl accepting chemotaxis protein	0,42
<i>opuCA</i>	lmo1428	glycine betaine/carnitine/choline ABC transporter (ATP-binding protein) (#)	0,08
<i>opuCB</i>	lmo1427	glycine betaine/carnitine/choline ABC transporter (membrane protein) (#)	0,10
<i>opuCC</i>	lmo1426	glycine betaine/carnitine/choline ABC transporter (osmoprotectant-binding protein) (#)	0,12
<i>opuCD</i>	lmo1425	betaine/carnitine/choline ABC transporter (membrane protein) (#)	0,09

Zusammenfassung der Microarray-Experimente

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass unabhängig davon, welches der *ptp*-Gene deletiert wurde, meist dieselben Gene reguliert scheinen. So findet man in allen Vergleichen die Gene für das Mannose-spezifische PTS (lmo0781-0784), die Gene für den *opuC*-Transporter (*opuCABCD*), lmo0554, *dtpt* (Di-, Tripeptid-Transporter, lmo0555), lmo0722, das Gen für MCP (lmo0723), lmo1421 sowie lmo1433 reguliert.

Zur Bestätigung dieser Expressionsdaten wurde nachfolgend die Transkription der oben aufgeführten Gene mittels Realtime-RT-PCR überprüft.

5.4 Vergleich der „in vitro“ Expression verschiedener durch Ptp-1 bzw. Ptp-2 regulierter Gene mittels Realtime-RT-PCR

Um die durch die Microarray-Experimente erhaltenen Transkriptionsdaten zu verifizieren, wurde aus den zu testenden Stämmen *L. monocytogenes* EGDe WT, Δ *ptp-1*, Δ *ptp-2* und Δ *ptp-1/2* in vier voneinander unabhängigen Ansätzen RNA isoliert und mittels Reverser Transkription in cDNA umgeschrieben (siehe 4.1.16).

Es wurden jeweils 2 bis 5 µg Gesamt-RNA der zu vergleichenden Stämme für die cDNA-Synthese eingesetzt und nachfolgend mittels Realtime-RT-PCR die Transkriptmenge der oben aufgeführten Gene bestimmt. Die Realtime-RT-PCR ermöglicht über Fluoreszenzdetektion eines in die DNA interkalierenden Farbstoffs (SybrGreenI™) eine exakte Quantifizierung der Transkriptmengen.

Um vergleichende Aussagen über die Transkriptionsrate der untersuchten Gene treffen zu können, wurde *rpoB* (RpoB codiert für die β -Untereinheit der RNA-Polymerase aus *L. monocytogenes*) als internes Standardgen verwendet, da man davon ausgeht, dass *rpoB*

unter allen Bedingungen konstitutiv und damit auch in allen hier untersuchten Stämmen gleich stark exprimiert wird.

Zur absoluten Quantifizierung der unbekanntenen Transkriptmengen wurde ein externer rpoB-cDNA-Standard mitgeführt.

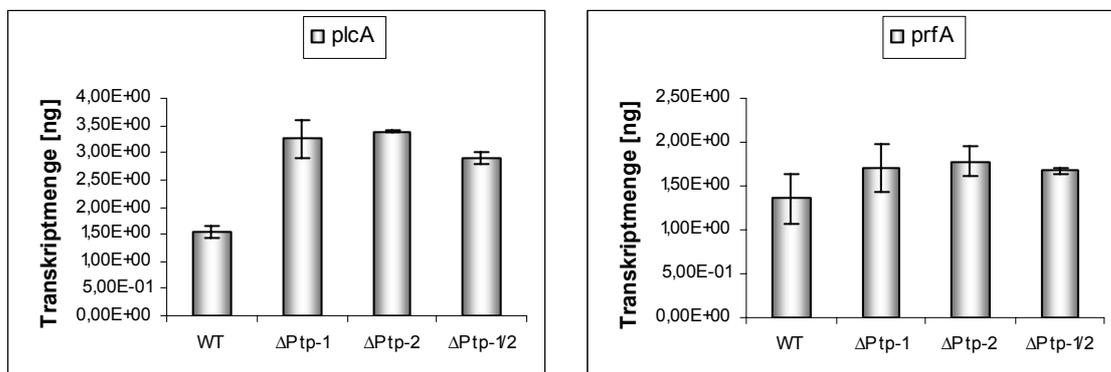
Petra Herrmann, die die verschiedenen Mutanten im Rahmen ihrer Diplomarbeit hergestellt hatte, konnte zeigen, dass die Invasionsfähigkeit der *ptp*-Mutanten in HepG2-Leberepithelzellen im Vergleich zum WT stark abgeschwächt ist. Es ist bekannt, dass die Invasion in diese Zelltypen bei *L. monocytogenes* durch die Proteine der Internalingruppe (speziell Internalin A und B) vermittelt wird.

Im Rahmen einer weiteren Diplomarbeit von Stefanie Link (Daten nicht gezeigt) wurde die Expression der Internaline mittels konventioneller RT-PCR zwischen *L. monocytogenes* EGDe und $\Delta ptp-1$, $\Delta ptp-2$ und $\Delta ptp-1/2$ verglichen. Hier wurde deutlich, dass die Expression der Internaline in den Mutanten schwächer ausfällt als im WT, was die Ergebnisse der Zellkulturversuche zumindest teilweise erklärt.

Zur Überprüfung dieser Ergebnisse wurde auch die Transkription der Gene für die Internaline A, B, C, G, H und E mittels quantitativer Realtime-RT-PCR untersucht.

5.4.1 Vergleich der Transkription der PrfA-abhängigen Virulenzgene (LIPI-1)

In diesem Versuchsansatz wurde zunächst der Einfluss von Ptp-1 bzw. Ptp-2 auf die Transkription der Gene des PrfA-abhängigen Virulenzgenclusters LIPI-1 untersucht (Abbildung 14).



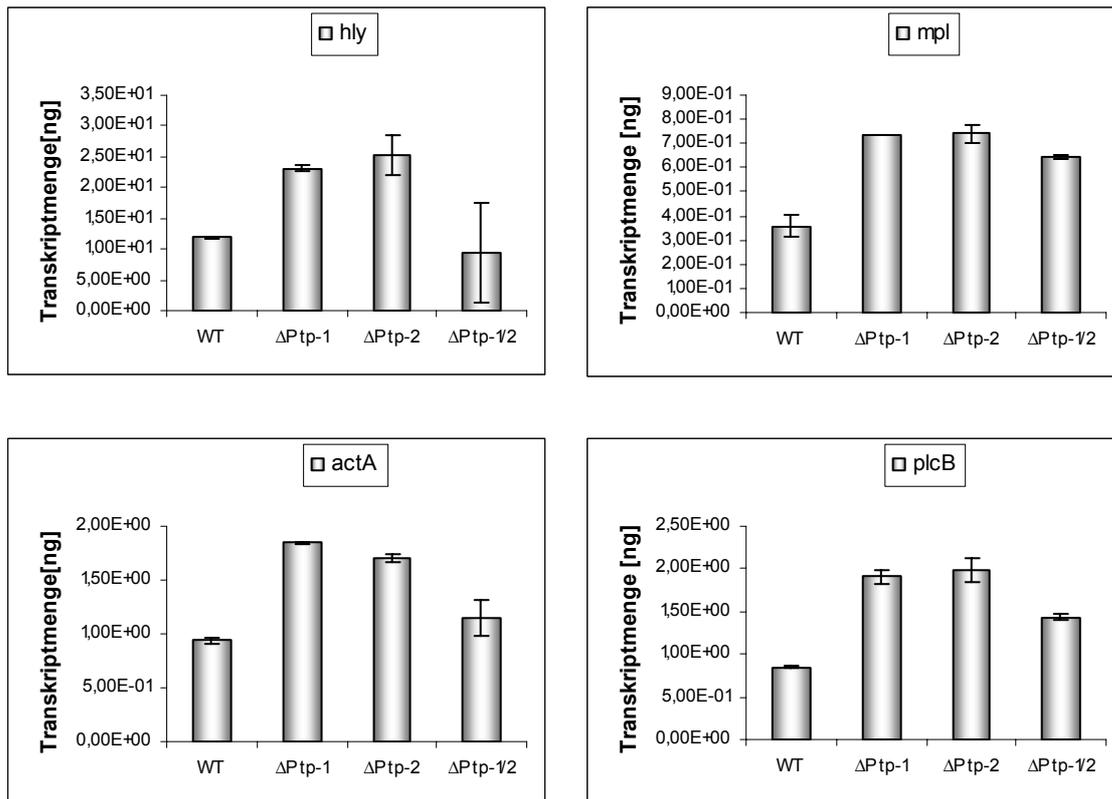


Abb. 14: Vergleich der Transkription der PrfA-abhängigen Virulenzgene (LIPI-1-Gencluster)

Für die Gene des PrfA-abhängigen Virulenzgenclusters LIPI-1 lässt sich für die *ptp*-Mutanten eine stärkere Expression nachweisen. Ausnahme bildet hier *prfA* selbst, welches nicht reguliert zu sein scheint. Für *plcA*, *hly*, *mpl*, *actA* und *plcB* kann eine bis zu zweifach erhöhte Genexpression in den *ptp*-Mutanten gezeigt werden.

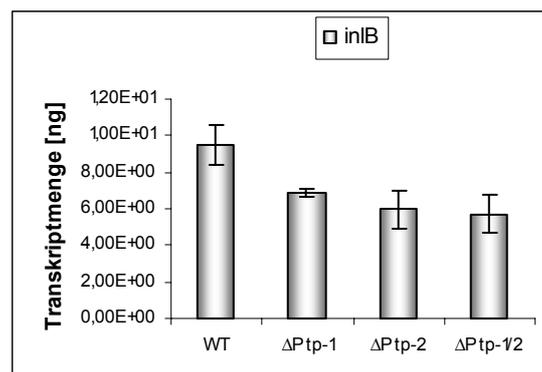
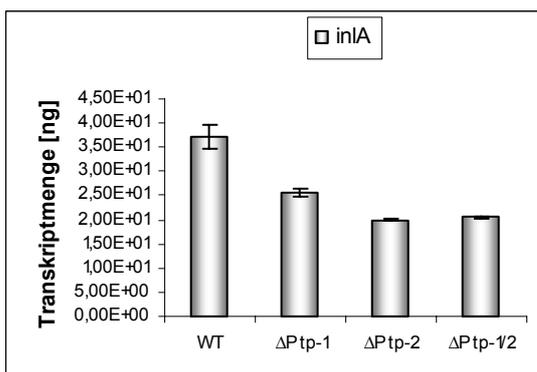
Tabelle 6 zeigt die Ratio der Genexpression, welche bei fast allen untersuchten Genen über 2.0 bzw. knapp darunter liegt. Die Expressionswerte für *prfA* liegen mit knapp über 1.0 im nicht-regulierten Bereich. Der Wert der *hly*-Genexpression für die $\Delta ptp-1/2$ -Mutante von 0.79 sollte auch aufgrund der hohen Standardabweichung als Ausreißer betrachtet werden. Es wird hier ebenfalls deutlich, dass sich die Genexpression in den einzelnen *ptp*-Mutanten selbst so gut wie nicht unterscheidet und - wenn überhaupt - nur marginale Unterschiede detektiert werden können.

Tab. 6: Ratio der Genexpression der PrfA-abhängigen Virulenzgene (LIPI-1)

Gen ID / Name	Stamm	Ratio
<i>plcA</i>	WT / $\Delta ptp-1$	2,11
	WT / $\Delta ptp-2$	2,19
	WT / $\Delta ptp-1/2$	1,88
<i>prfA</i>	WT / $\Delta ptp-1$	1,25
	WT / $\Delta ptp-2$	1,31
	WT / $\Delta ptp-1/2$	1,23
<i>hly</i>	WT / $\Delta ptp-1$	1,94
	WT / $\Delta ptp-2$	2,13
	WT / $\Delta ptp-1/2$	0,79
<i>mpl</i>	WT / $\Delta ptp-1$	2,06
	WT / $\Delta ptp-2$	2,07
	WT / $\Delta ptp-1/2$	1,81
<i>actA</i>	WT / $\Delta ptp-1$	1,97
	WT / $\Delta ptp-2$	1,82
	WT / $\Delta ptp-1/2$	1,22
<i>plcB</i>	WT / $\Delta ptp-1$	2,24
	WT / $\Delta ptp-2$	2,35
	WT / $\Delta ptp-1/2$	1,68

5.4.2 Vergleich der Transkription der Internaline

Wie oben bereits beschrieben, wurde mittels Realtime-RT-PCR die Expression der Internaline zwischen WT und *ptp*-Mutanten verglichen.



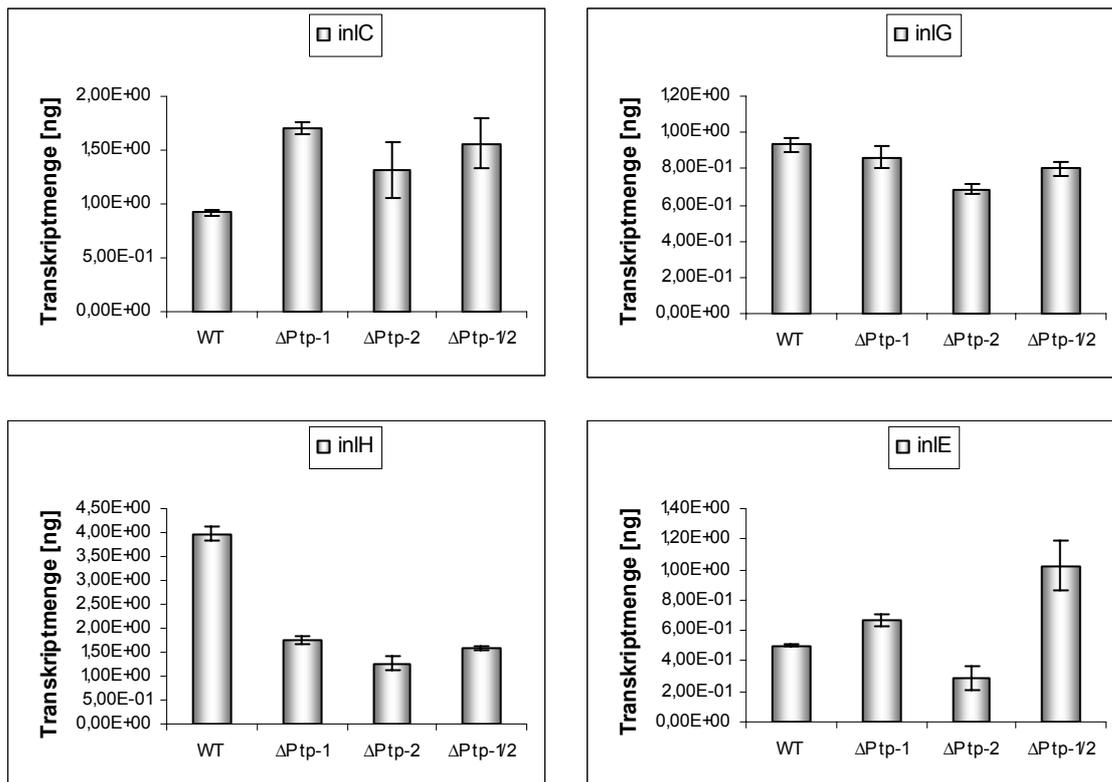


Abb. 15: Expression von *inA*, *inB*, *inC*, *inG*, *inH* und *inE* in *L. monocytogenes* EGDe WT und $\Delta ptp-1$, $\Delta ptp-2$, $\Delta ptp-1/2$

Die Expression von *inA* zeigt sich in den untersuchten *ptp*-Mutanten schwächer als im WT, wobei die Unterschiede zwischen den einzelnen Mutanten vernachlässigbar klein sind. In der $\Delta ptp-1$ -Mutante konnte eine etwas höhere Transkriptmenge detektiert werden als in der $\Delta ptp-2$ -Mutante bzw. der $\Delta ptp-1/2$ -Doppelmutante.

Auch *inB* wird in den *ptp*-Mutanten schwächer exprimiert als im WT. Es konnte wiederum in der $\Delta ptp-1$ -Mutante eine geringfügig höhere Transkriptmenge als in den anderen beiden Mutanten nachgewiesen werden, jedoch erscheinen die Unterschiede als marginal.

InC wird in den *ptp*-Mutanten stärker exprimiert als im WT, wobei in der $\Delta ptp-1$ -Mutante die höchste Transkriptmenge detektiert werden konnte. Die Genexpression liegt jedoch mit Werten zwischen 1,2 und 1,5 im nicht-regulierten Bereich.

Die Expression von *inG* fällt in den *ptp*-Mutanten geringfügig schwächer aus als im WT, liegt jedoch im nicht-regulierten Bereich.

InH wird in den *ptp*-Mutanten deutlich schwächer exprimiert als im WT. Die geringste Transkriptmenge konnte in der $\Delta ptp-2$ -Mutante nachgewiesen werden, jedoch erscheinen die Unterschiede zwischen den einzelnen Mutanten vernachlässigbar gering.

Für *inE* konnte trotz mehrfacher Wiederholung des Versuchs kein aussagekräftiges Expressionsprofil erhalten werden.

In der nachfolgenden Tabelle ist das Verhältnis der Genexpression dargestellt. Hierfür wurde der Mittelwert aus drei voneinander unabhängigen Experimenten gebildet. Werte > 0.5 werden als in den *ptp*-Mutanten schwächer exprimiert, solche mit Werten < 2.0 als stärker exprimiert betrachtet. Werte knapp über bzw. unterhalb dieser Grenzwerte wurden ebenfalls als reguliert betrachtet.

Tab. 7: Verhältnis der Genexpression zwischen *L. monocytogenes* EGDe WT und $\Delta ptp-1$, $\Delta ptp-2$, $\Delta ptp-1/2$

Gen ID / Name	Stamm	Ratio
<i>inA</i>	WT / $\Delta ptp-1$	0,59
	WT / $\Delta ptp-2$	0,52
	WT / $\Delta ptp-1/2$	0,54
<i>inB</i>	WT / $\Delta ptp-1$	0,57
	WT / $\Delta ptp-2$	0,52
	WT / $\Delta ptp-1/2$	0,53
<i>inC</i>	WT / $\Delta ptp-1$	1,4
	WT / $\Delta ptp-2$	1,26
	WT / $\Delta ptp-1/2$	1,18
<i>inG</i>	WT / $\Delta ptp-1$	0,93
	WT / $\Delta ptp-2$	0,74
	WT / $\Delta ptp-1/2$	0,86
<i>inH</i>	WT / $\Delta ptp-1$	0,45
	WT / $\Delta ptp-2$	0,42
	WT / $\Delta ptp-1/2$	0,45
<i>inE</i>	WT / $\Delta ptp-1$	0,84
	WT / $\Delta ptp-2$	0,79
	WT / $\Delta ptp-1/2$	1,82

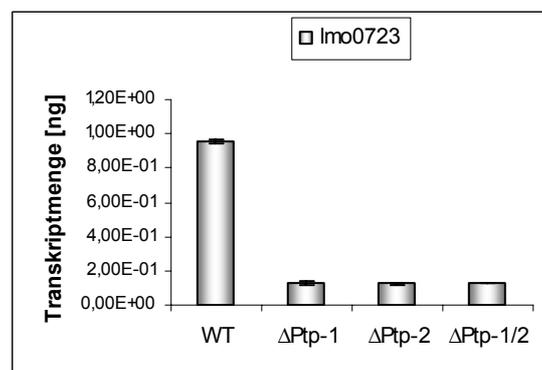
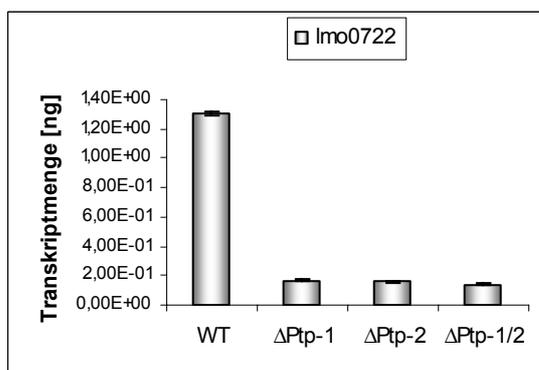
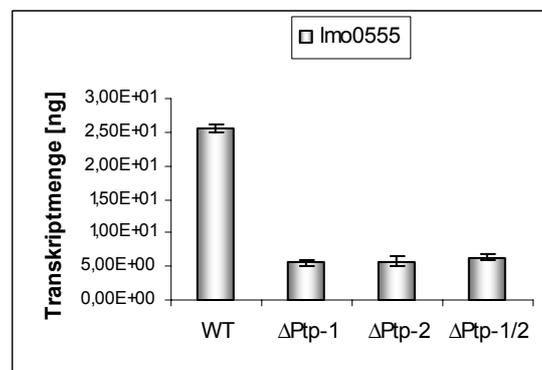
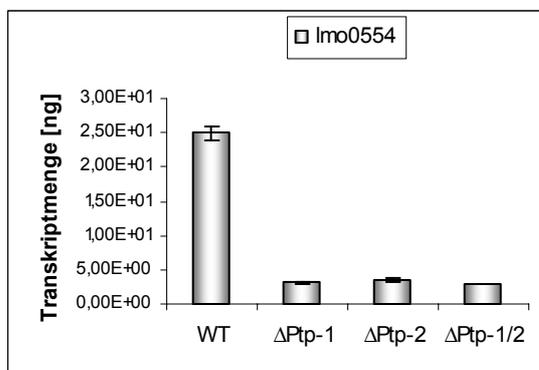
Die Gene *inA*, *inB* und *inH* können hier als schwächer exprimiert und damit als durch Ptp-1 bzw. Ptp-2 reguliert betrachtet werden. Für *inC*, *inG* und *inE* ließ sich keine deutliche Regulation nachweisen.

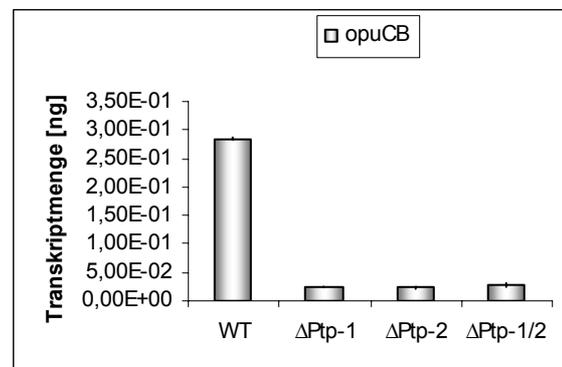
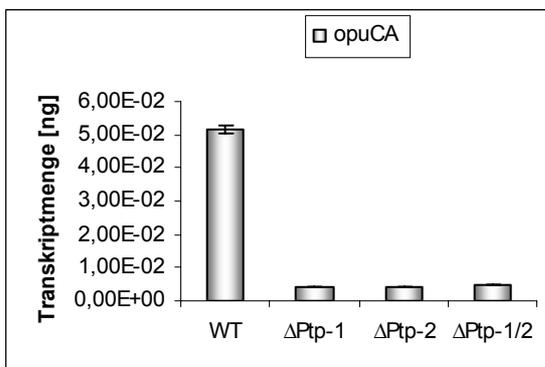
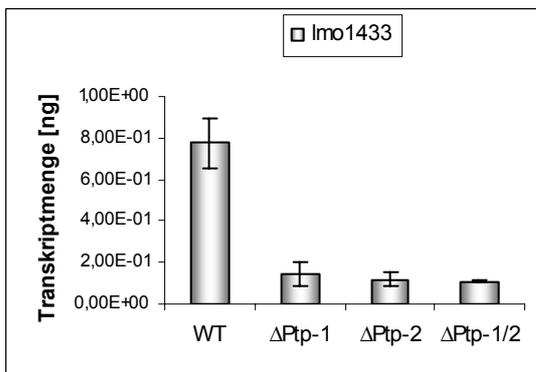
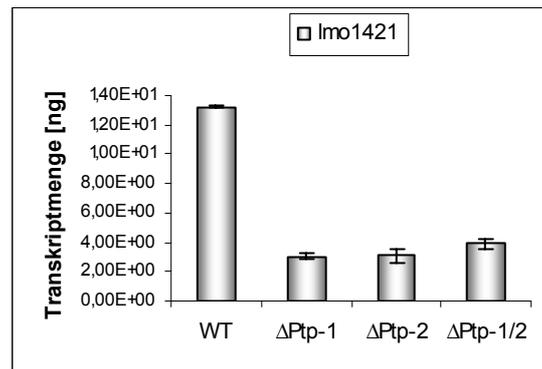
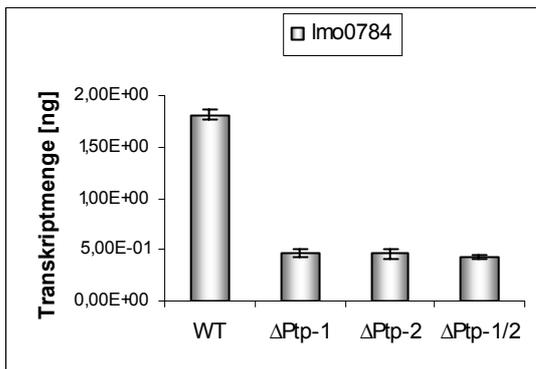
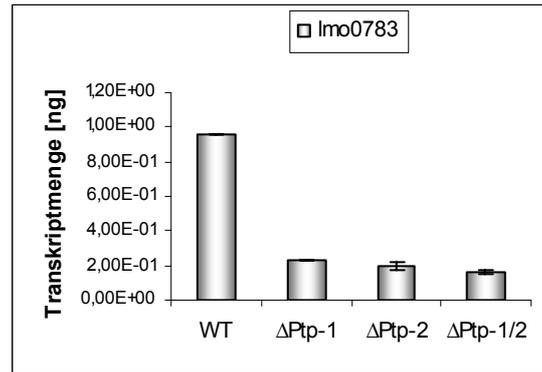
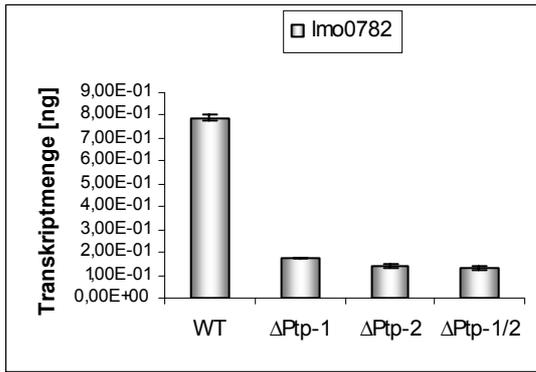
5.4.3 Vergleich der Transkription verschiedener durch die Microarray-Experimente identifizierter Zielgene der PTPs

Durch die Microarray-Experimente konnten verschiedene Zielgene der PTPs identifiziert werden. Die Expression folgender Gene wurde nachfolgend mittels qRT-PCR überprüft.

Tab. 8: Zielgene der PTPs

Gen ID / Name	Funktion
Lmo0554	NADH-dependent butanol dehydrogenase
Lmo0555	di-tripeptide transporter
Lmo0722	pyruvate oxidase
Lmo0723 (<i>mcp</i>)	methyl-accepting chemotaxis protein (MCP)
Lmo0782	mannose-specific phosphotransferase system (PTS) component IIC
Lmo0783	mannose-specific phosphotransferase system (PTS) component IIB
Lmo0784	mannose-specific phosphotransferase system (PTS) component IIA
Lmo1421 (<i>opuBA</i>)	glycine betaine/carnitine/choline ABC transporter (ATP-binding protein)
Lmo1433	glutathione reductase
<i>opuCA</i>	glycine betaine/carnitine/choline ABC transporter (ATP-binding protein)
<i>opuCB</i>	glycine betaine/carnitine/choline ABC transporter (membrane protein)
<i>opuCC</i>	glycine betaine/carnitine/choline ABC transporter (osmoprotectant-binding protein)
<i>opuCD</i>	betaine/carnitine/choline ABC transporter (membrane protein)





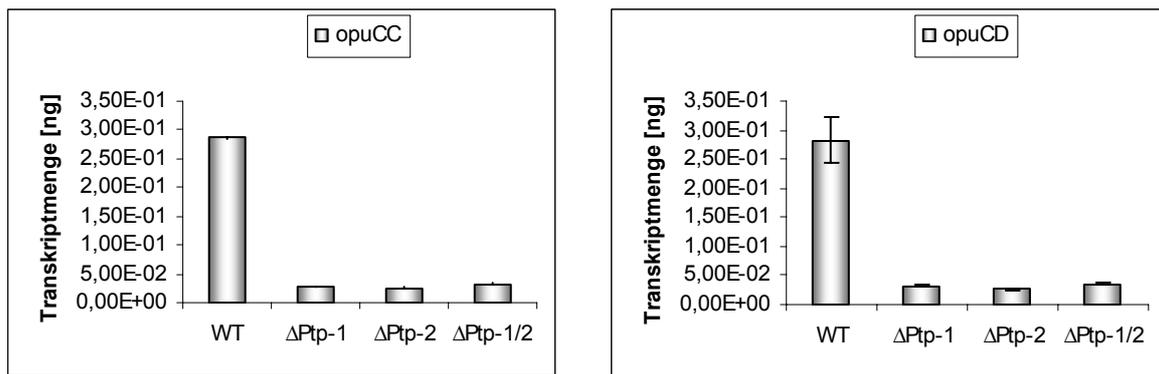


Abb. 16: Vergleich der Transkription von *lmo0554*, *lmo0555*, *lmo0722*, *lmo0723*, *lmo0782*, *lmo0783*, *lmo0783*, *lmo1421*, *lmo1433* sowie von *opuCABCD*

Alle untersuchten Gene (siehe Abbildung 16) werden in den einzelnen *ptp*-Mutanten deutlich schwächer transkribiert als im WT. Die Ratio der Genexpression liegt für alle getesteten Gene meistens sogar deutlich unter 0,25, was eine um mindestens 25% abgeschwächte Transkription in den Mutanten wiedergibt.

Tab. 9: Verhältnis der Genexpression zwischen *L. monocytogenes* EGDe WT und *Δptp-1*, *Δptp-2*, *Δptp-1/2*

Gen ID / Name	Stamm	Ratio
Lmo0554	WT / <i>Δptp-1</i>	0,12
	WT / <i>Δptp-2</i>	0,14
	WT / <i>Δptp-1/2</i>	0,12
<i>dtpT</i>	WT / <i>Δptp-1</i>	0,22
	WT / <i>Δptp-2</i>	0,23
	WT / <i>Δptp-1/2</i>	0,25
Lmo0722	WT / <i>Δptp-1</i>	0,13
	WT / <i>Δptp-2</i>	0,12
	WT / <i>Δptp-1/2</i>	0,11
<i>mcp</i>	WT / <i>Δptp-1</i>	0,13
	WT / <i>Δptp-2</i>	0,13
	WT / <i>Δptp-1/2</i>	0,13
Lmo0782	WT / <i>Δptp-1</i>	0,22
	WT / <i>Δptp-2</i>	0,18
	WT / <i>Δptp-1/2</i>	0,17
Lmo0783	WT / <i>Δptp-1</i>	0,24
	WT / <i>Δptp-2</i>	0,2
	WT / <i>Δptp-1/2</i>	0,17
Lmo0784	WT / <i>Δptp-1</i>	0,26
	WT / <i>Δptp-2</i>	0,25
	WT / <i>Δptp-1/2</i>	0,24
Lmo1421	WT / <i>Δptp-1</i>	0,23
	WT / <i>Δptp-2</i>	0,23
	WT / <i>Δptp-1/2</i>	0,28

Gen ID / Name	Stamm	Ratio
Lmo1433	WT / $\Delta ptp-1$	0,19
	WT / $\Delta ptp-2$	0,15
	WT / $\Delta ptp-1/2$	0,14
opuCA	WT / $\Delta ptp-1$	0,09
	WT / $\Delta ptp-2$	0,08
	WT / $\Delta ptp-1/2$	0,09
opuCB	WT / $\Delta ptp-1$	0,09
	WT / $\Delta ptp-2$	0,08
	WT / $\Delta ptp-1/2$	0,1
opuCC	WT / $\Delta ptp-1$	0,09
	WT / $\Delta ptp-2$	0,09
	WT / $\Delta ptp-1/2$	0,11
opuCD	WT / $\Delta ptp-1$	0,11
	WT / $\Delta ptp-2$	0,1
	WT / $\Delta ptp-1/2$	0,13

Vergleicht man die Genexpression zwischen den einzelnen Mutanten, so lässt sich kein signifikanter Unterschied feststellen. Die Ratio der Genexpression liegt für alle untersuchten Gene in allen Mutanten deutlich unter der Grenze von 0,5. Die Regulation der Transkription der genannten Gene verhält sich gleich, unabhängig davon welche der Phosphatasen deletiert wurde.

5.5 Motilitätstest der *ptp*-Mutanten auf Weichagar

Im Verlauf der Expression-Analysen fiel auf, dass das Gen für das Methyl-akzeptierende Chemotaxis-Protein *mcp* in den *ptp*-Mutanten nur sehr schwach transkribiert wird.

Zur Überprüfung dieses Einflusses der Phosphatase-Gene auf die Fortbewegungsfähigkeit wurde ein so genannter Motilitätstest auf Weichagar durchgeführt. Schwimmen bzw. Schwärmen erkennt man an der Bildung kreisförmiger Höfe auf und im Agar um den Einstichkanal herum. Der Schwimmtest erfolgt auf 0,25%-BHI-Weichagarplatten, der Schwärmtest auf 0,6%-BHI-Weichagarplatten. Es werden jeweils Einzelkolonien der zu untersuchenden Stämme von einer Stammplatte gepickt und in die Weichagarplatten eingestochen. Nach einer Inkubationszeit von 24-48h bei 24°C und 37°C wurden die Platten ausgewertet.

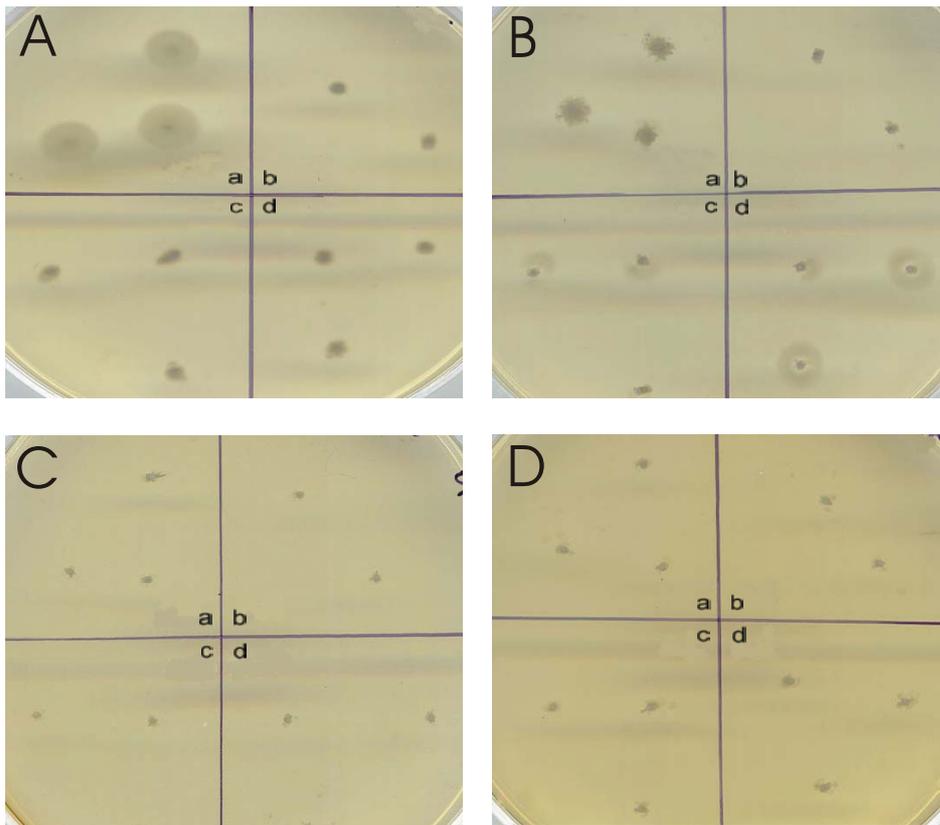


Abb. 17: Einzelkolonien von *L. monocytogenes* EGDe WT (**a**), Δ *ptp-1* (**b**), Δ *ptp-2* (**c**), Δ *ptp-1/2* (**d**) in BHI-Weichagar von 0,25% (**A** und **B**) und 0,6% (**C** und **D**)

Die *ptp*-Mutanten zeigten sich im Schwimmtest auf 0,25%-Weichagar sowohl bei 24°C (A) als auch bei 37°C (B) unbeweglich, wohingegen der Wildtyp bei beiden Temperaturen noch beweglich ist. Die eingeschränkte Beweglichkeit des Wildtyps bei 37°C resultiert aus der verringerten Expression der für die Fortbewegung und den Aufbau der Flagelle notwendigen Flagellen-Gene bei dieser Temperatur.

Der Schwärmttest auf 0,6%-Weichagar ergab keinen Unterschied zwischen Wildtyp und den *ptp*-Mutanten. Alle untersuchten Stämme zeigen sich hier unbeweglich, sowohl bei 24°C als auch 37°C.

5.6 Vergleich der „*in vivo*“ Expression verschiedener durch Ptp-1 bzw. Ptp-2 regulierter Gene mittels Realtime-RT-PCR

5.6.1 Vergleich der Transkription von *ptp-1* und *ptp-2*

Um eine mögliche Regulation von *ptp-1* durch *ptp-2* bzw. umgekehrt zu überprüfen, wurde deren Transkription ebenfalls mittels Realtime-RT-PCR ermittelt (siehe Abbildung 18).

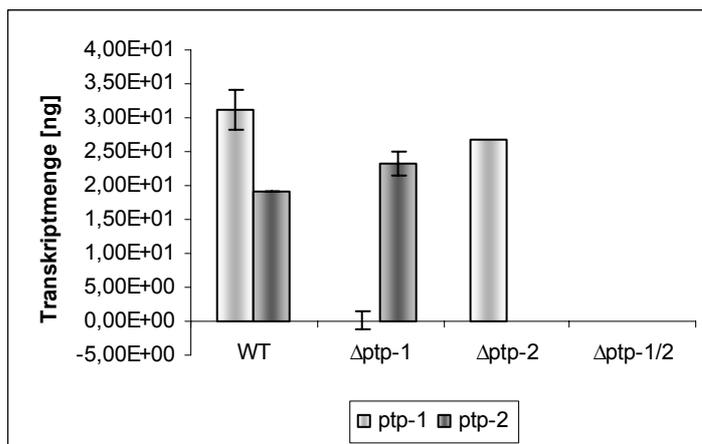


Abb. 18: Transkription von *ptp-1* und *ptp-2* in *L. monocytogenes* EGDe WT, Δ *ptp-1*, Δ *ptp-2*, Δ *ptp-1/2*

ptp-1 scheint im Wildtyp stärker exprimiert zu werden als *ptp-2*. Auch durch die Deletion von *ptp-1* wird die Transkription von *ptp-1* nicht erhöht (Ratio der Genexpression = 0,86). Gleichfalls lässt sich in der Δ *ptp-2*-Mutante keine verstärkte Expression von *ptp-1* nachweisen (Ratio der Genexpression = 1,21). In den jeweiligen Deletionsmutanten lässt sich kein Transkript für das jeweilig deletierte Gen nachweisen.

5.6.2 Vergleich der intrazellulären Transkription der PrfA-abhängigen Virulenzgene (LIPI-1)

Die Untersuchung der intrazellulären Expression der PrfA-abhängigen Virulenzgene ergab eine geringfügig erhöhte Transkription aller LIPI-1-Gene in den *ptp*-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp. Nur für *p/cA* konnte eine deutliche Transkriptionssteigerung in den *ptp*-Mutanten gezeigt werden (siehe Abbildung 19).

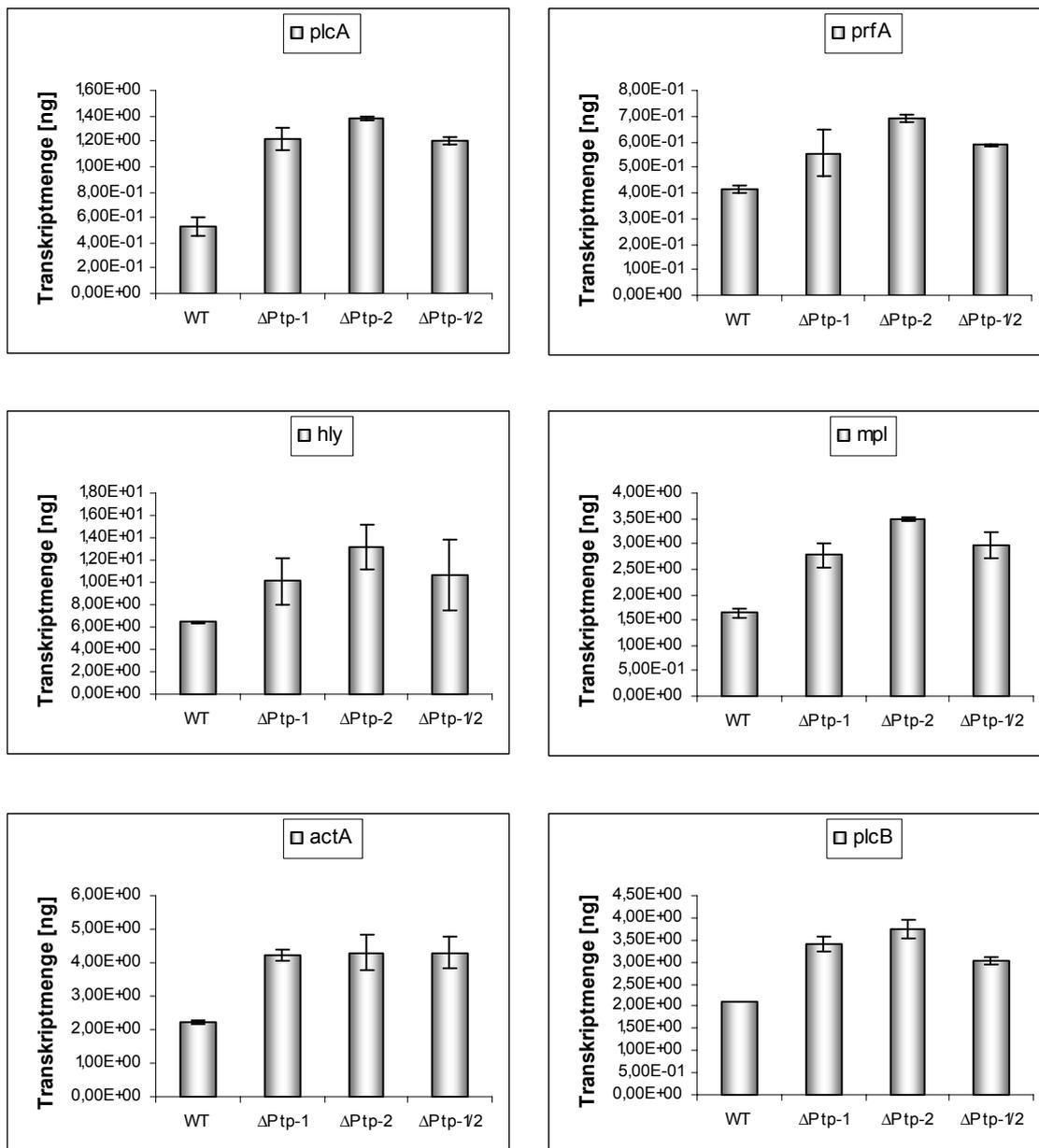


Abb. 19: Vergleich der intrazellulären Transkription der PrfA-abhängigen Virulenzgene (LIPI-1-Gencluster)

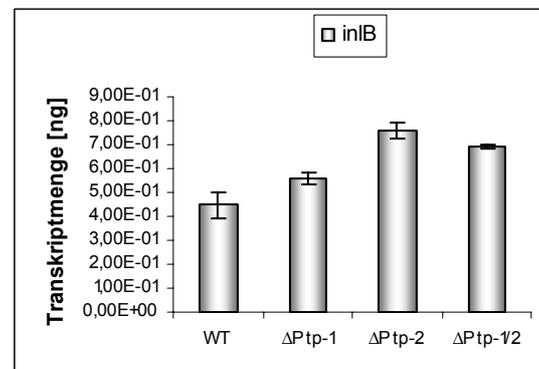
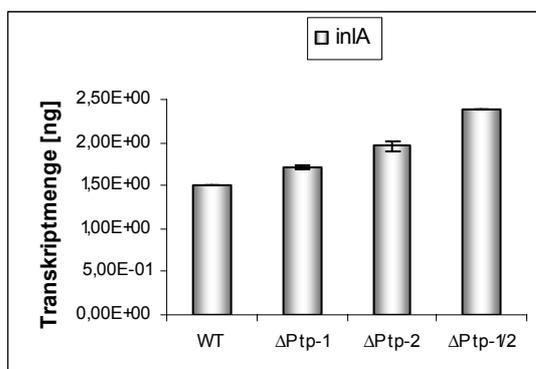
Betrachtet man die Ratio der Genexpression, so wird deutlich, dass die Regulation für alle untersuchten Gene nur schwach ausfällt und meist unter dem Schwellenwert von 2.0 liegt (siehe Tabelle 10). Wie oben erwähnt bildet *plcA* die einzige Ausnahme mit Genexpressionswerten von 2.0 und darüber.

Tab. 10: Verhältnis der Genexpression zwischen *L. monocytogenes* EGDe WT und $\Delta ptp-1$, $\Delta ptp-2$, $\Delta ptp-1/2$

Gen ID / Name	Stamm	Ratio
<i>plcA</i>	WT / $\Delta ptp-1$	1,99
	WT / $\Delta ptp-2$	2,28
	WT / $\Delta ptp-1/2$	2,2
<i>prfA</i>	WT / $\Delta ptp-1$	1,47
	WT / $\Delta ptp-2$	1,76
	WT / $\Delta ptp-1/2$	1,36
<i>hly</i>	WT / $\Delta ptp-1$	1,51
	WT / $\Delta ptp-2$	1,76
	WT / $\Delta ptp-1/2$	1,45
<i>mpl</i>	WT / $\Delta ptp-1$	1,57
	WT / $\Delta ptp-2$	1,92
	WT / $\Delta ptp-1/2$	1,74
<i>actA</i>	WT / $\Delta ptp-1$	1,73
	WT / $\Delta ptp-2$	1,72
	WT / $\Delta ptp-1/2$	1,67
<i>plcB</i>	WT / $\Delta ptp-1$	1,73
	WT / $\Delta ptp-2$	1,95
	WT / $\Delta ptp-1/2$	1,42

5.6.3 Vergleich der intrazellulären Transkription der Internaline

Zur Untersuchung der intrazellulären Genexpression der regulierten Gene wurden konfluente Caco-2-Monolayer in 250ml-Zellkulturflaschen wie unter 4.4.5 beschrieben infiziert und nachfolgend die RNA isoliert. Aus der gewonnenen RNA wurde wie unter 4.1.16 beschrieben cDNA hergestellt und die Transkription der zu untersuchenden Gene mittels Realtime-RT-PCR ermittelt.



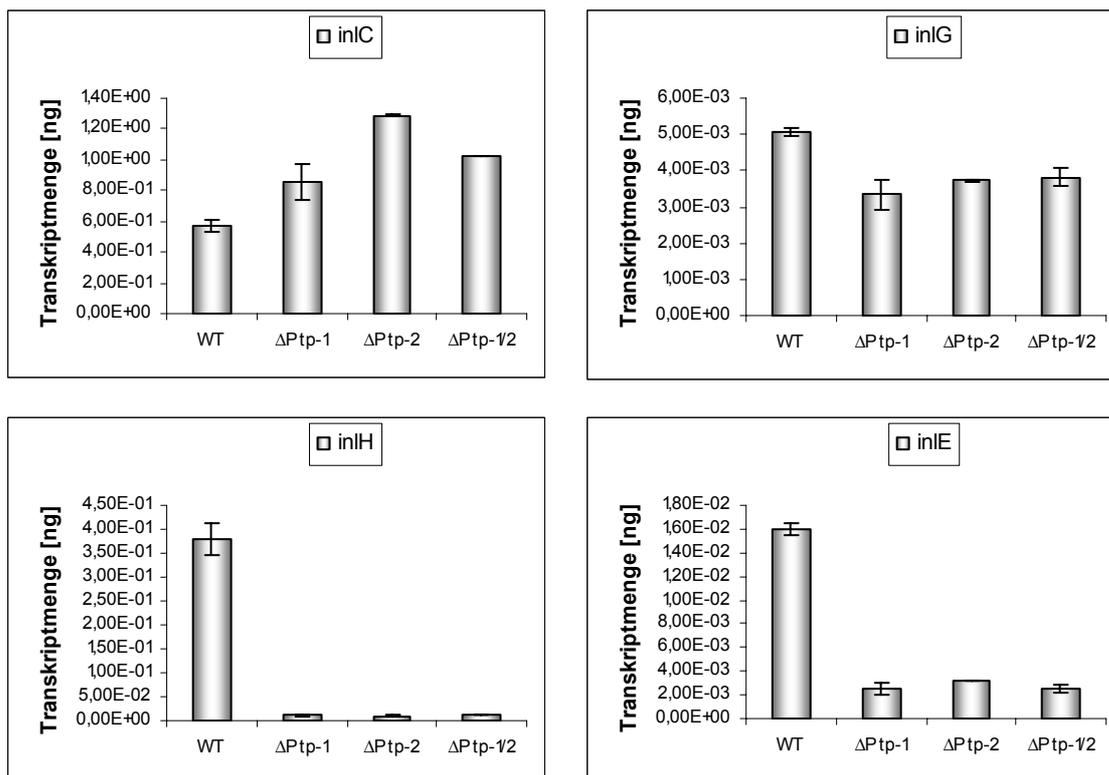


Abb. 20: Intrazelluläre Transkription der Internaline A, B, C, G, H und E

Die Transkription der Internaline A und B in den *ptp*-Mutanten unterscheidet sich intrazellulär nicht signifikant vom Wildtyp. *InC* wird in den *ptp*-Mutanten etwas stärker exprimiert als im Wildtyp. Für *inG* konnte eine leicht abgeschwächte Expression in den *ptp*-Mutanten detektiert werden. Sowohl *inH* als auch *inE* werden in den *ptp*-Mutanten wesentlich schwächer exprimiert als im Wildtyp.

Vergleicht man die Ratio der Genexpression für *inH* und *inE*, die alle weit unter der Grenze von 0,5 liegen (siehe Tabelle 11), so wird dies noch deutlicher.

Tab. 11: Ratio der Genexpression (Durchschnitt aus drei voneinander unabh. Experimenten)

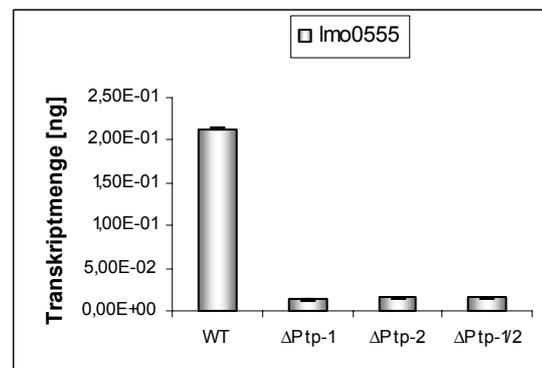
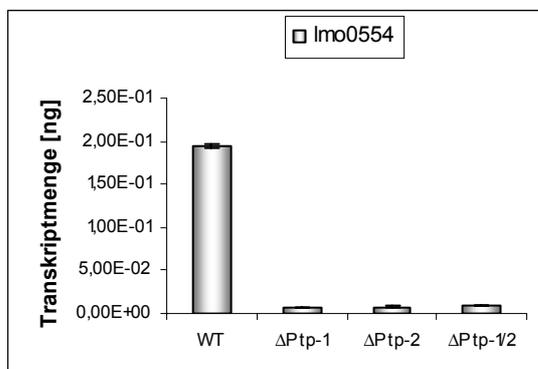
Gen ID / Name	Stamm	Ratio
<i>inA</i>	WT / <i>Δptp-1</i>	1,44
	WT / <i>Δptp-2</i>	1,62
	WT / <i>Δptp-1/2</i>	1,9
<i>inB</i>	WT / <i>Δptp-1</i>	1,2
	WT / <i>Δptp-2</i>	1,58
	WT / <i>Δptp-1/2</i>	1,43
<i>inC</i>	WT / <i>Δptp-1</i>	1,71
	WT / <i>Δptp-2</i>	2,31
	WT / <i>Δptp-1/2</i>	1,99
<i>inG</i>	WT / <i>Δptp-1</i>	0,69
	WT / <i>Δptp-2</i>	0,88
	WT / <i>Δptp-1/2</i>	1,06

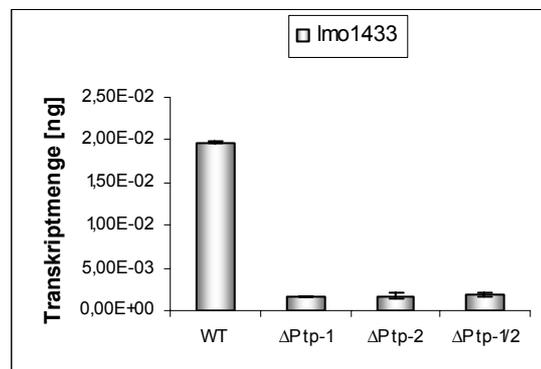
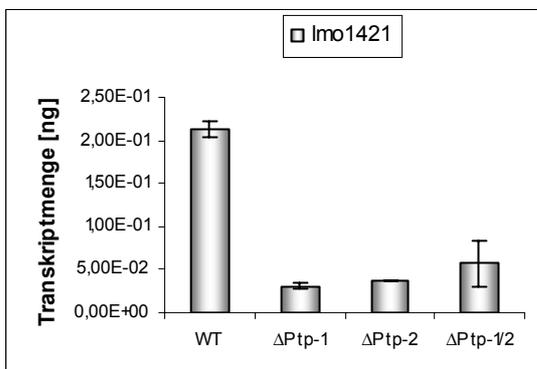
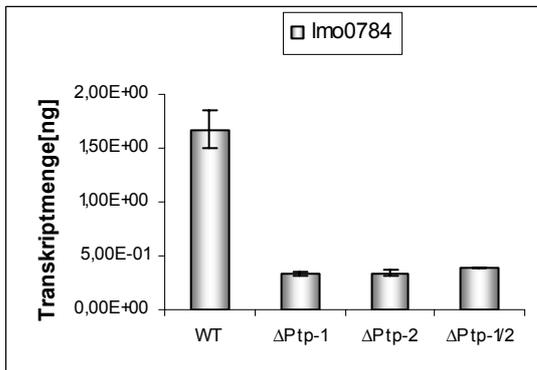
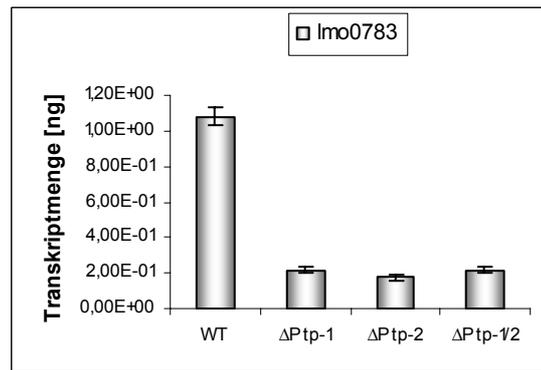
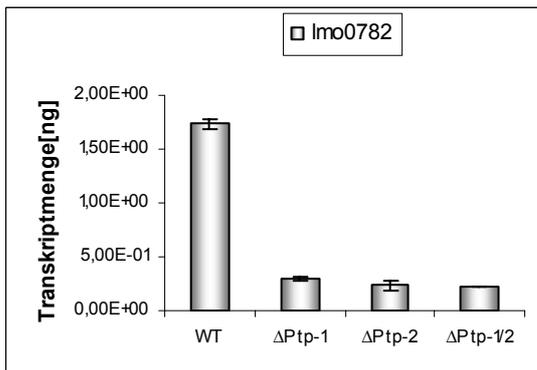
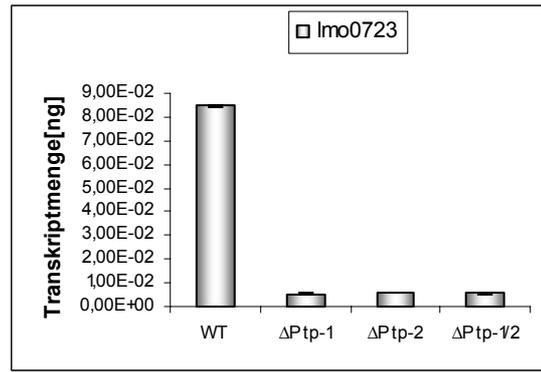
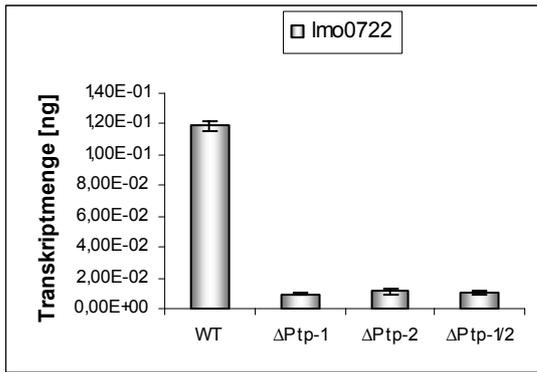
Gen ID / Name	Stamm	Ratio
<i>inH</i>	WT / $\Delta ptp-1$	0,04
	WT / $\Delta ptp-2$	0,03
	WT / $\Delta ptp-1/2$	0,05
<i>inE</i>	WT / $\Delta ptp-1$	0,15
	WT / $\Delta ptp-2$	0,21
	WT / $\Delta ptp-1/2$	0,22

Für *inA* und *inB* liegen die Werte jeweils außerhalb des regulierten Bereichs. Internalin C kann als in den *ptp*-Mutanten stärker exprimiert und damit als reguliert angesehen werden. Die Ratio der Genexpression für *inG* ist nicht eindeutig, man könnte hier von einer geringfügig abgeschwächten Expression in den *ptp*-Mutanten ausgehen. *InH* und *inE* werden in den *ptp*-Mutanten eindeutig wesentlich schwächer exprimiert als im Wildtyp.

5.6.4 Vergleich der intrazellulären Transkription der Gene *Imo0554*, *0555*, *0722*, *0723*, *0782*, *0783*, *0784*, *1421*, *1433* sowie *opuCABCD*

Für sämtliche der hier genannten Gene konnte in mehreren voneinander unabhängigen Experimenten in den *ptp*-Mutanten eine deutlich schwächere Expression als im Wildtyp festgestellt werden (siehe Abbildung 21).





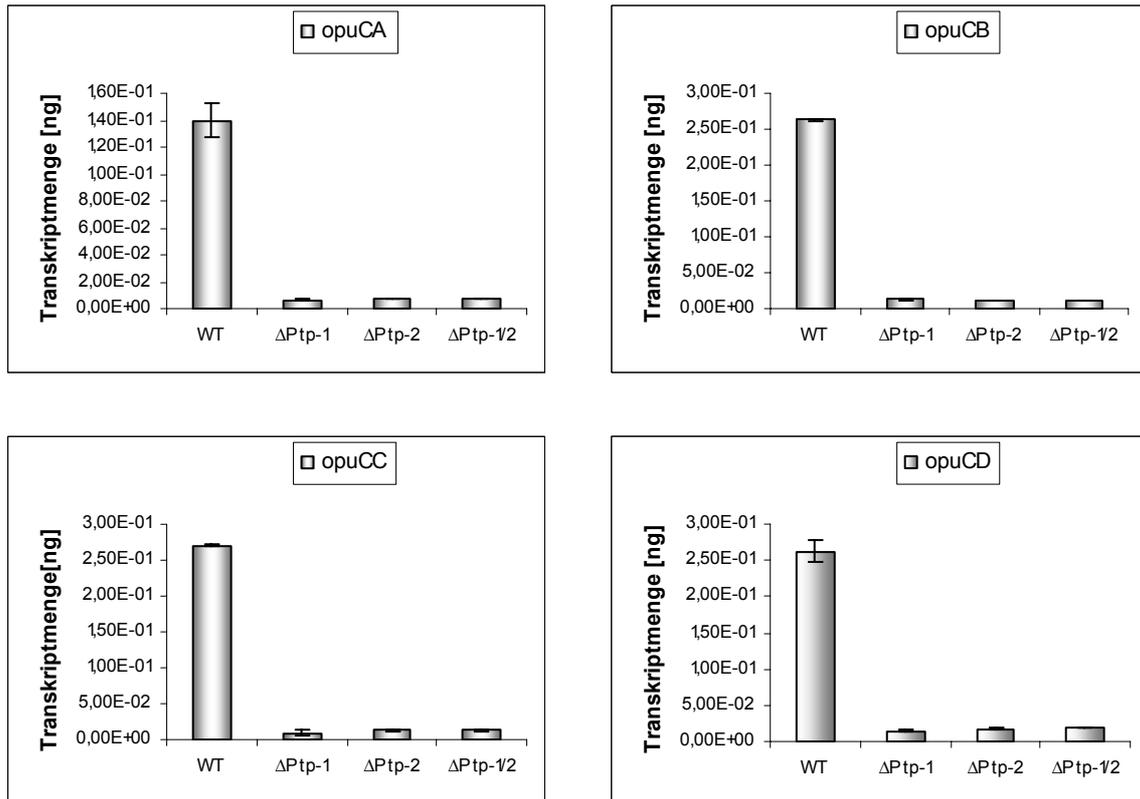


Abb. 21: Intrazelluläre Transkription der Gene *lmo0554*, *0555*, *0722*, *0723*, *0782*, *0783*, *0784*, *1421*, *1433* sowie *opuCABCD*

Vergleicht man das Verhältnis der Genexpression (siehe Tabelle 12), so fällt auf, dass fast alle untersuchten Gene in den *ptp*-Mutanten 5-fach bis zu 25-fach schwächer exprimiert werden als im Wildtyp.

Tab. 12: Verhältnis der Genexpression zwischen *L. monocytogenes* EGDe WT und $\Delta ptp-1$, $\Delta ptp-2$, $\Delta ptp-1/2$

Gen ID / Name	Stamm	Ratio
Lmo0554	WT / $\Delta ptp-1$	0,04
	WT / $\Delta ptp-2$	0,05
	WT / $\Delta ptp-1/2$	0,05
<i>dtpT</i>	WT / $\Delta ptp-1$	0,05
	WT / $\Delta ptp-2$	0,06
	WT / $\Delta ptp-1/2$	0,06
Lmo0722	WT / $\Delta ptp-1$	0,06
	WT / $\Delta ptp-2$	0,06
	WT / $\Delta ptp-1/2$	0,07
<i>mcp</i>	WT / $\Delta ptp-1$	0,06
	WT / $\Delta ptp-2$	0,07
	WT / $\Delta ptp-1/2$	0,07
Lmo0782	WT / $\Delta ptp-1$	0,17
	WT / $\Delta ptp-2$	0,17
	WT / $\Delta ptp-1/2$	0,17

Gen ID / Name	Stamm	Ratio
Lmo0783	WT / $\Delta ptp-1$	0,18
	WT / $\Delta ptp-2$	0,18
	WT / $\Delta ptp-1/2$	0,21
Lmo0784	WT / $\Delta ptp-1$	0,2
	WT / $\Delta ptp-2$	0,2
	WT / $\Delta ptp-1/2$	0,24
Lmo1421	WT / $\Delta ptp-1$	0,14
	WT / $\Delta ptp-2$	0,16
	WT / $\Delta ptp-1/2$	0,19
Lmo1433	WT / $\Delta ptp-1$	0,07
	WT / $\Delta ptp-2$	0,09
	WT / $\Delta ptp-1/2$	0,09
opuCA	WT / $\Delta ptp-1$	0,03
	WT / $\Delta ptp-2$	0,04
	WT / $\Delta ptp-1/2$	0,04
opuCB	WT / $\Delta ptp-1$	0,05
	WT / $\Delta ptp-2$	0,04
	WT / $\Delta ptp-1/2$	0,04
opuCC	WT / $\Delta ptp-1$	0,06
	WT / $\Delta ptp-2$	0,04
	WT / $\Delta ptp-1/2$	0,04
opuCD	WT / $\Delta ptp-1$	0,04
	WT / $\Delta ptp-2$	0,05
	WT / $\Delta ptp-1/2$	0,06

5.6.5 Vergleich der intrazellulären Transkription von *ptp-1* und *ptp-2*

Zur Überprüfung der intrazellulären Regulation von *ptp-1* durch *ptp-2* bzw. umgekehrt wurde deren Transkriptionsstärke ebenfalls mittels Realtime-RT-PCR bestimmt.

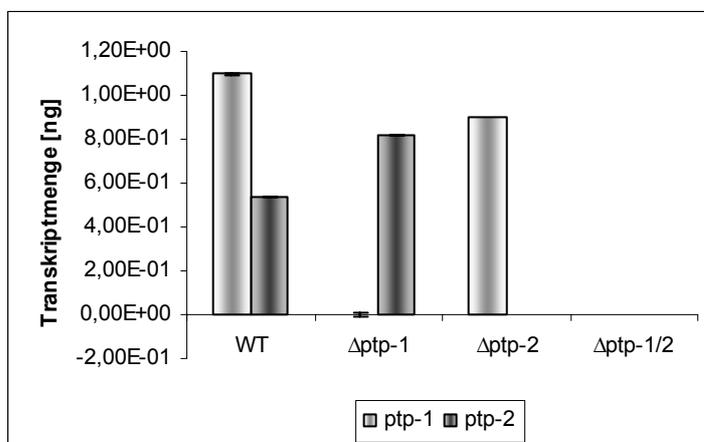


Abb. 22: Transkription von *ptp-1* und *ptp-2* in *L. monocytogenes* EGDe WT, $\Delta ptp-1$, $\Delta ptp-2$, $\Delta ptp-1/2$

Das intrazelluläre Expressionsmuster von *ptp-1* und *ptp-2* ähnelt dem Muster aus der Vollmedienkultur (siehe Abbildung 18) sehr stark.

Auch intrazellulär wird *ptp-1* im Wildtyp stärker exprimiert als *ptp-2*. Ferner wird auch durch die Deletion von *ptp-1* die Transkription von *ptp-1* nicht signifikant erhöht (Ratio der Genexpression = 0,82). Gleichfalls lässt sich in der Δ *ptp-2*-Mutante keine verstärkte Expression von *ptp-1* zeigen (Ratio der Genexpression = 1,54). In den jeweiligen Deletionsmutanten lässt sich kein Transkript für das jeweilig deletierte Gen nachweisen.

5.6.6 Vergleich der intrazellulären Transkription von *rsbR* und *rsbW*

Die Ergebnisse der Microarray-Experimente deuten auf eine Beteiligung des SigB-Regulons an der Regulation durch Ptp-1 bzw. Ptp-2 hin. Um dies zu überprüfen, wurde die Transkription von *rsbR* (positiver Regulator der SigB-Aktivität) und *rsbW* (negativer Regulator der SigB-Aktivität) mittels Realtime-RT-PCR ermittelt.

Abbildung 23 zeigt, dass sich für *rsbR* keine veränderte Transkription in den *ptp*-Mutanten zeigt, die Expression von *rsbW* in den *ptp*-Mutanten jedoch wesentlich schwächer ausfällt als im Wildtyp.

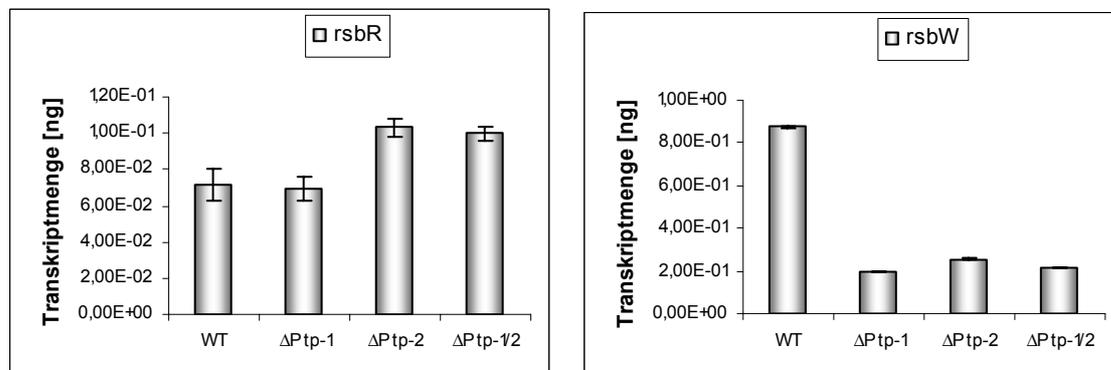


Abb. 23: Intrazelluläre Transkription von *rsbR* und *rsbW* in *L. monocytogenes* EGDe WT, Δ *ptp-1*, Δ *ptp-2*, Δ *ptp-1/2*

Die Ratio der Genexpression liegt für *rsbR* in allen untersuchten Mutanten im nicht regulierten Bereich. Die Transkription von *rsbW* dagegen ist in den *ptp*-Mutanten um bis zu Faktor 4 verringert (siehe Tabelle 13).

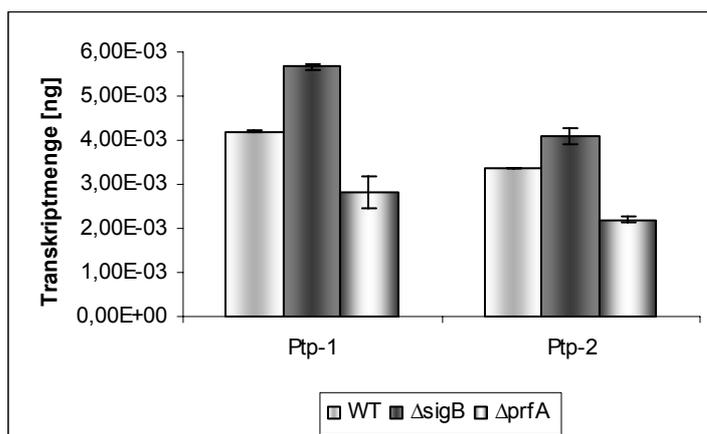
Tab. 13: Verhältnis der Genexpression zwischen *L. monocytogenes* EGDe WT und $\Delta ptp-1$, $\Delta ptp-2$, $\Delta ptp-1/2$

Gen ID / Name	Stamm	Ratio
<i>rsbR</i>	WT / $\Delta ptp-1$	1,13
	WT / $\Delta ptp-2$	1,22
	WT / $\Delta ptp-1/2$	1,49
<i>rsbW</i>	WT / $\Delta ptp-1$	0,23
	WT / $\Delta ptp-2$	0,31
	WT / $\Delta ptp-1/2$	0,26

5.6.7 Vergleich der Expression von *ptp-1* und *ptp-2* unter dem Einfluss von SigB und PrfA

Um Aussagen über eine eventuelle PrfA- bzw. SigB-Abhängigkeit von *ptp-1* und *ptp-2* treffen zu können, wurde deren Transkription sowohl in *L. monocytogenes* EGDe WT als auch in der $\Delta prfA$ - und der $\Delta sigB$ -Mutante untersucht. Hierzu wurden die genannten Stämme in BHI-Vollmedium bis zu einer optischen Dichte von 1,0 angezogen und aus dem gewonnenen Bakterienpellet RNA isoliert. Aus der isolierten RNA wurde mittels Reverser Transkription cDNA hergestellt und die gewonnene cDNA als Template für die Realtime-RT-PCR eingesetzt.

Es konnte gezeigt werden, dass sowohl *ptp-1* als auch *ptp-2* in der $\Delta sigB$ -Mutante stärker exprimiert werden als im Wildtyp. In der $\Delta prfA$ -Mutante wurde eine abgeschwächte Expression im Vergleich zum Wildtyp festgestellt (siehe Abbildung 24).

**Abb. 24:** Transkription von *ptp-1* und *ptp-2* in *L. monocytogenes* EGDe WT, $\Delta sigB$ und $\Delta prfA$

Das Verhältnis der Genexpression liegt für die $\Delta sigB$ -Mutante bei 1.35 für *ptp-1* und bei 1.21 für *ptp-2*. In der $\Delta prfA$ -Mutante beträgt die Ratio der Genexpression 0.67 für *ptp-1* und 0.65 für *ptp-2*. Alle genannten Werte liegen nicht innerhalb der Grenzwerte von 0.5 bzw. 2.0.

5.7 *In silico* Analyse der Promotorregionen der durch Ptp-1 bzw. Ptp-2 regulierten Gene

Da eine Beteiligung des Regulators SigB gezeigt werden konnte, wurden nachfolgend die Promotorregionen der regulierten Gene *in silico* auf mögliche Regulatorbindungsstellen hin untersucht. Es ist bekannt, dass einige der oben aufgeführten Gene durch SigB reguliert werden (80). Dazu zählen lmo1433, *inA*, *inB*, *inE*, *opuCABCD*, lmo0784 und *rsbV*. Die Konsensussequenz ist hier **GTTT N₁₃₋₁₇ GGGWAT**.

Auch für *ptp-1* und *ptp-2* konnten putative SigB-Boxen identifiziert werden. Die Suche ergab entsprechend der Variabilität (Anzahl der Nucleotide, sowie „W“ als A oder T) innerhalb der Konsensussequenz mehrere solcher Boxen (siehe Tabelle 14). Da davon auszugehen ist, dass lmo2541 und *ptp-2* aufgrund ihrer überlappenden Sequenz eine Transkriptionseinheit bilden, wurde auch nach SigB-Boxen unmittelbar vor lmo2541 gesucht.

Tab. 14: Sequenz und Lage der identifizierten putativen SigB-Boxen für *ptp-1* und *ptp-2*

Gen ID	bp from start codon	SigB-Box (5' → 3')
<i>ptp-1</i>	-234	GATT ATCCAGATAAAAAG TGGTAT
	-159	GTTG TCTGTAGTTTATTT GAAAAT
	-214	GTAT TTAGAGACACTTTT AGGATT
	-67	GTGT GATGGAATAAATAAA GTGACT
	-234	GATT ATCCAGATAAAAAGT GGTATT
	-253	GTTA CTGGAAGTATTAGAA GATTAT
	-169	GTAT AATTTAGTTGTCTGTA GTTTAT
	<i>ptp-2</i>	-37
-136		GTCT TTACAAAGGTTTGC GGGCTT
-136		GTCT TTACAAAGGTTTGC GGGCTT
-116		GCTT TTGATCACGCGGATGT AGATAT
-125		GGTT TGCGGGCTTTTGATCAC GCGGAT
lmo2541	-131	GTTA TTATCCACAGTTT GGGGAT
	-131	GTTA TTATCCACAGTTTGG GGATAA

Die Suche nach so genannten PrfA-Boxen für *ptp-1* bzw. *ptp-2* ergab kein Ergebnis.

5.8 Gesamtproteomprofilierung mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese

Zum Vergleich der Unterschiede zwischen *L. monocytogenes* EGDe WT und den *ptp*-Mutanten auf Proteinebene wurden die entsprechenden Bakterienstämme bis zu logarithmischen Phase angezogen und anschließend Zellextraktproteine isoliert. Deren Konzentration wurde mittels Bradford-Protein-Assay bestimmt (siehe 4.2.5) und jeweils 400µg Gesamtprotein eines jeden Stammes mittels isoelektrischer Fokussierung (IEF) in einem pH-Gradienten von pH 4 bis pH 7 aufgetrennt. Nachfolgend wurden die Proteine in einem gewöhnlichen Polyacrylamid-Gel entsprechend ihres Molekulargewichts aufgetrennt. Nach Färbung der Gele mittels Silbernitrat wurden die Gele eingescannt und die erhaltenen Spotmuster mit Hilfe der Delta2D-Software von Decodon ausgewertet.

5.8.1 Vergleich des Proteoms von *L. monocytogenes* EGDe WT und $\Delta ptp-1$

Den jeweiligen Spotmustern wurden Falschfarben zugeordnet: der Wildtyp wurde rot, die $\Delta ptp-1$ -Mutante grün markiert. Durch einen Overlay erscheinen regulierte Proteinspots entweder rot, d.h. im Wildtyp stärker exprimiert oder grün, was eine stärkere Expression in der $\Delta ptp-1$ -Mutante wiedergibt. Spots, die gelb erscheinen, werden als nicht reguliert betrachtet.

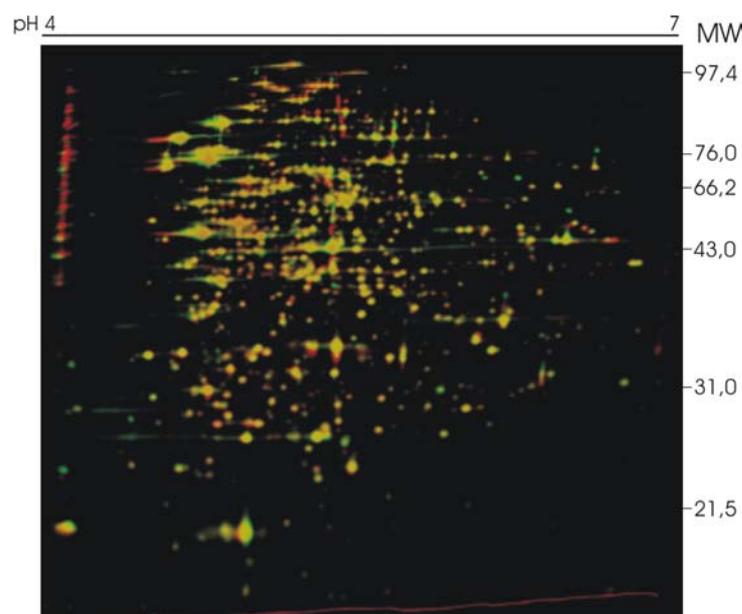


Abb. 25: Vergleich des Proteinmusters von *L. monocytogenes* EGDe WT und von $\Delta ptp-1$

5.8.2 Vergleich des Proteoms von *L. monocytogenes* EGDe WT und $\Delta ptp-2$

Der Vergleich des Proteinmusters von Wildtyp und der $\Delta ptp-2$ -Mutante ergibt ein fast identisches Bild. Auch hier wurde dem Wildtyp die Falschfarbe rot und der Mutante die Falschfarbe grün zugewiesen.

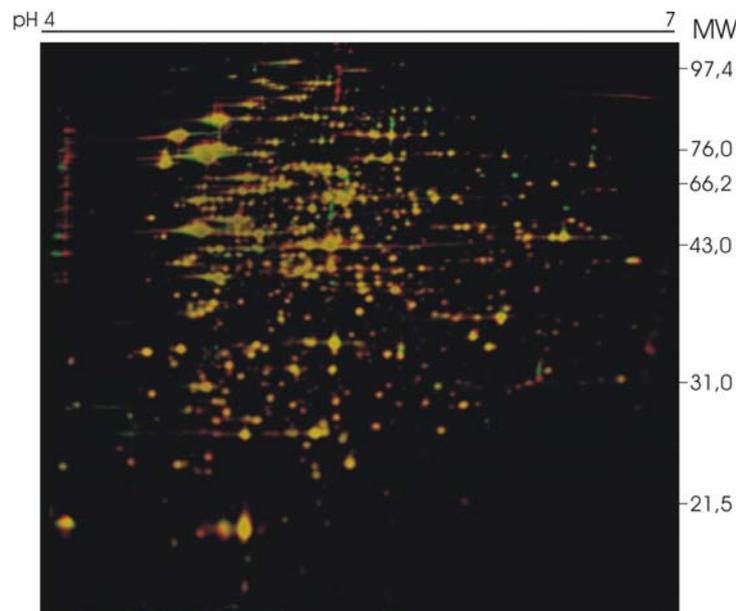


Abb. 26: Vergleich des Proteinmusters von *L. monocytogenes* EGDe WT und von $\Delta ptp-2$

5.8.3 Vergleich des Proteoms von *L. monocytogenes* EGDe WT und $\Delta ptp-1/2$

Abbildung 27 zeigt die Überlagerung der Spotsmuster von Wildtyp (rot) und der $\Delta ptp-1/2$ -Mutante (grün). Es lässt sich auch hier ein nahezu identisches Muster erkennen wie beim Vergleich des Wildtyps mit den Einzelmutanten, wobei einige Spots fehlen.

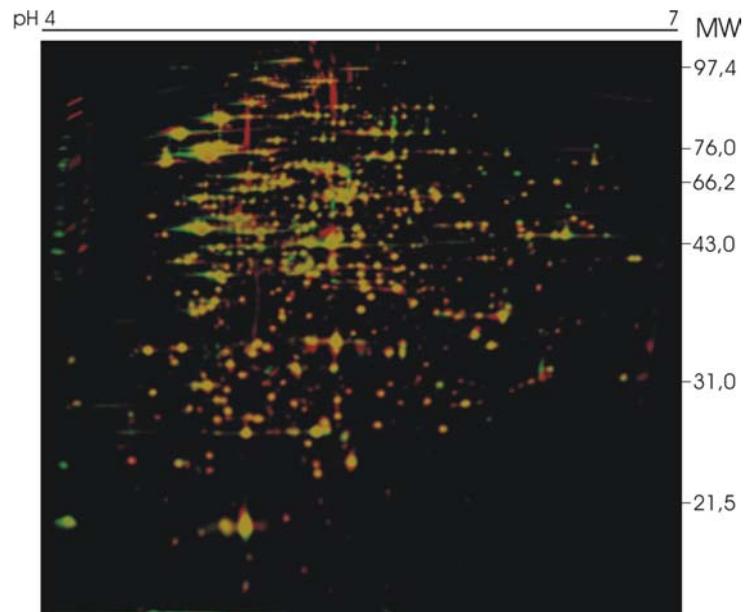


Abb. 27: Vergleich des Proteinmusters von *L. monocytogenes* EGDe WT und von $\Delta ptp-1/2$

In der nachfolgend gezeigten Abbildung sind die Proteine markiert und nummeriert, die in allen Vergleichen reguliert erschienen.

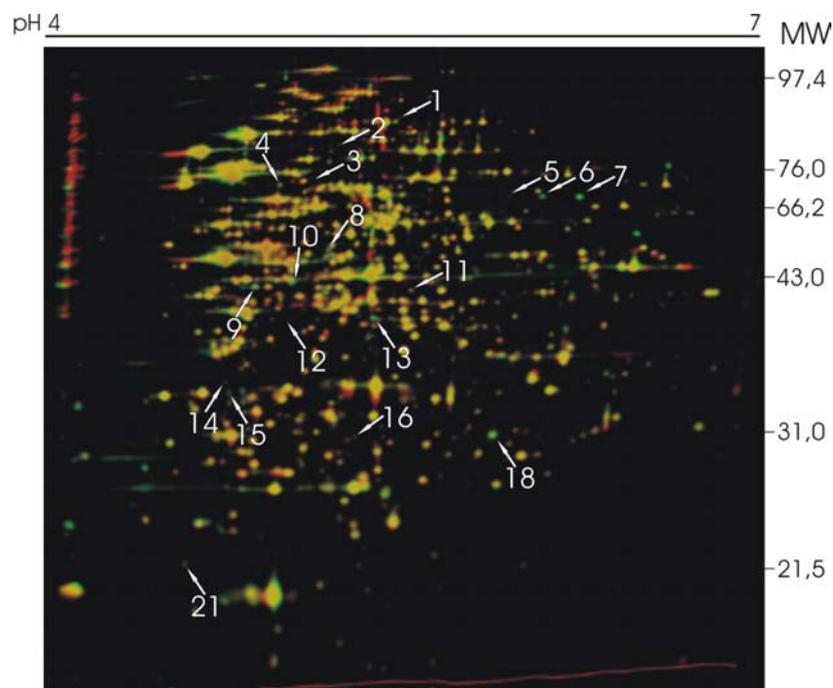


Abb. 28: Durch *Ptp-1* bzw. *Ptp-2* regulierte Proteine; Spots 1-18 in *Ptp*-Mutanten stärker exprimiert; Spot 21 in Mutanten schwächer exprimiert

Aufgrund der identischen Spotmuster und damit der Ähnlichkeit bezüglich der regulierten Proteine wurde zur Identifizierung dieser Proteine mittels Maldi-TOF-MS ein neues 2D-Gel aus 500µg Zellextraktproteinen von *L. monocytogenes* EGDe WT angefertigt und mit Coomassie Brilliant Blue (siehe 4.2.11) angefärbt. Dieses Gel wurde zur massenspektrometrischen Untersuchung in das Labor von Hr. A. Bosserhoff am ZMBH in Heidelberg versandt und dort analysiert.

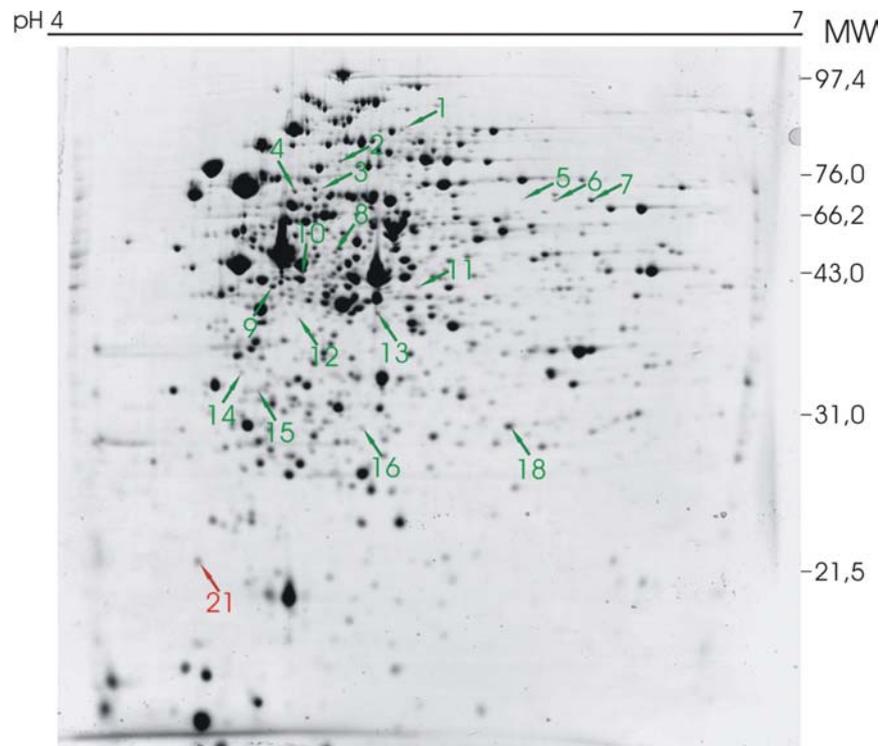


Abb. 29: Mit kolloidalem Coomassie gefärbtes 2D-Gel von WT-Zellextraktproteinen; Proteine mit stärkerer Expression in den ptp-Mutanten sind grün (Spots 1-18), solche mit schwächerer Expression (Spot 21) rot markiert.

Anhand der massenspektrometrischen Eigenschaften konnten folgende Proteine identifiziert werden (siehe Tabelle 15).

Tab. 15: Mittels Maldi-TOF-MS identifizierte durch Ptp-1 bzw. Ptp-2 regulierte Proteinspots

Spot	Beschreibung	Gen ID / Name
1	formate acetyltransferase	PfIA
2	metallo-beta-lactamase family protein	SepA
3	alpha-alpha-phosphotrehalase	Imo1254
4	pyruvate oxidase	Imo0722
5	succinate semialdehyde dehydrogenase	Imo0913
6	succinate semialdehyde dehydrogenase	Imo0913
7	succinate semialdehyde dehydrogenase	Imo0913
8	glycine betaine/carnitine/choline ABC transporter (ATP-binding protein)	OpuCA

Spot	Beschreibung	Gen ID / Name
9	dihydroxyacetone kinase	Imo2695
10	tagatose-1,6-diphosphate aldolase	Imo0539
11	aspartate-semialdehyde dehydrogenase	Imo1437
12	conjugated bile acid hydrolase	Imo2067
13	oxidoreductase	Imo0669
14	no gene description	Imo0799
15	positive regulator of sigma-B activity	RsbR
16	conserved hypothetical protein	Imo1029
18	phosphoglyceromutase 1	Imo2205
21	sigma-B activity negative regulator RsbW	RsbW

Die Spots 1-18 stellen Proteine mit einer stärkeren Expression in den *ptp*-Mutanten dar. Spot 21 repräsentiert ein Protein, das in den *ptp*-Mutanten schwächer exprimiert wird als im Wildtyp.

Unter den regulierten Proteinen finden sich verschiedene Stoffwechselproteine, der Osmoprotektantentransporter OpuC sowie zwei Regulatoren der SigB-Aktivität rsbR und rsbW. Auffallend ist hier, dass lediglich RsbW als in den *ptp*-Mutanten schwächer exprimiert identifiziert werden konnte. Alle übrigen Proteine weisen in den *ptp*-Mutanten eine stärkere Expression als im Wildtyp auf.

5.9 Überexpression und Aufreinigung von Ptp-1 und Ptp-2

Zur näheren Charakterisierung der beiden LMW-PTPs Ptp-1 und Ptp-2 wurden deren codierende Sequenz mittels einer Proofreading-Polymerase (Phusion™; Finnzymes) amplifiziert und mittels Restriktionsverdau in pQE-30 (Qiagen) ligiert. Die entstandenen Derivate pQE-30-Ptp-1 und pQE-30-Ptp-2 wurden nachfolgend in *E. coli* M15 (pRep4)-Zellen überexprimiert.

Die transformierten M15-Zellen enthalten das high-copy-Plasmid pRep4, welches den *lac*-Repressor konstitutiv exprimiert, der durch Bindung an den regulierbaren PT5-Promotor von pQE-30 die Transkription des eingebrachten DNA-Fragments hemmt. Durch IPTG-Zugabe kommt es aufgrund der Inaktivierung des *lac*-Repressors zur Überproduktion des His₆-Fusionsproteins.

Für die Überexpression von Ptp-1 und Ptp-2 wurden die entsprechenden M15-Klone bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 angezogen. Nach Entnahme eines 1ml-Aliquots, das als Negativkontrolle diente, wurde die Expression der His-markierten Proteine durch Zugabe von 1mM IPTG induziert und der Ansatz weitere 3 h inkubiert. Anschließend wurde erneut ein Aliquot entnommen und von allen Proben Proteinlysate hergestellt.

5.9.1 Aufreinigung von Ptp-1

Die Reinigung der Fusionsproteine erfolgte mittels Affinitätschromatographie über eine Ni-NTA-Agarosesäule und dem ÄKTA™prime –System.

Die Aufreinigung von Ptp-1 erfolgte unter nativen Bedingungen (siehe 4.2.7.1) mittels des „His-tag Purification HiTrap Chelating“-Programms der ÄKTA™prime, welches das Auftragen der His₆-Proteine auf eine Ni-NTA-Agarosesäule und deren Elution mittels eines Imidazolgradienten beinhaltet. Das Eluat wird in 1ml-Fractionen gesammelt, auf ein 12%iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und anschließend mittels Coomassie Brilliant Blue angefärbt.

Es wurde sowohl die nicht-induzierte als auch die induzierte Probe aufgetragen ebenso wie ein Aliquot der Probe in Bindungspuffer. Zur Kontrolle, dass das Protein an die Ni-NTA-Säule binden konnte, wurde der Durchfluss aus der Säule aufgefangen und ebenfalls auf das Gel aufgetragen. Anhand der während der Aufreinigung gemessenen optischen Dichte konnte darauf geschlossen werden, dass sich das aufgereinigte Protein höchstwahrscheinlich in den Fraktionen 10 bis 14 befinden sollte. Es wurden zusätzlich die Fraktionen 5 bis 9 sowie 16 und 18 aufgetragen.

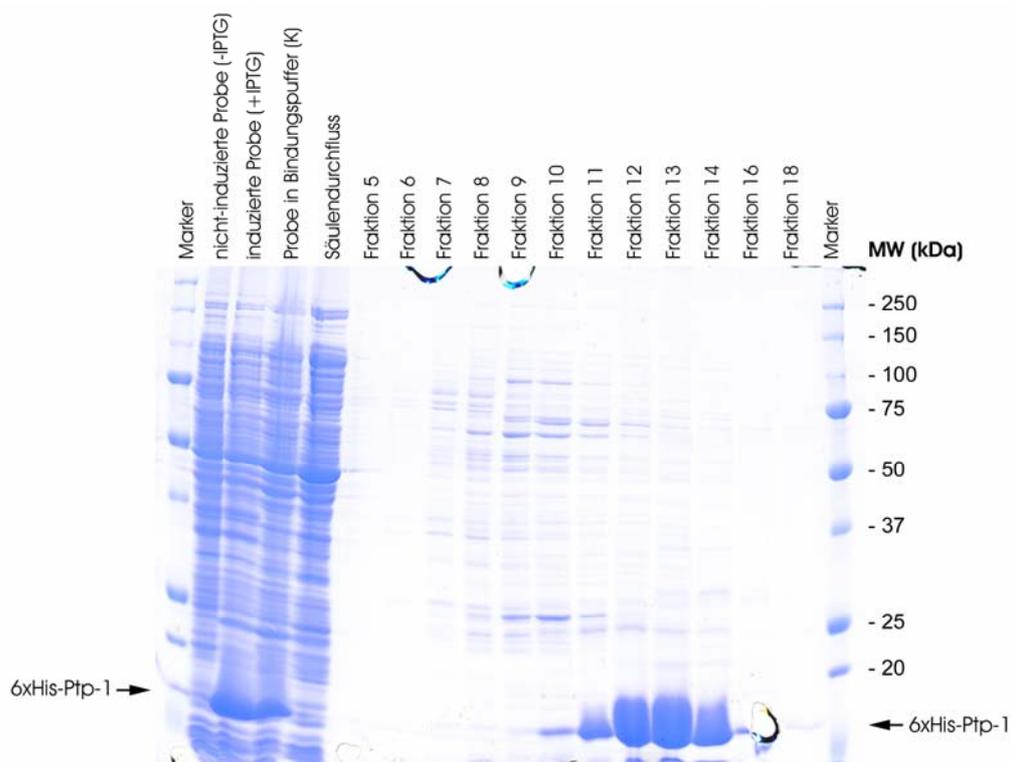


Abb. 30: SDS-PAGE der Expression und Aufreinigung von His-Ptp-1 unter nativen Bedingungen

Wie in Abbildung 30 zu erkennen ist, ließ sich die Expression von His-Ptp-1 durch IPTG sehr stark induzieren. Das aufgereinigte Protein befand sich hauptsächlich in den Fraktionen 12 bis 14. Hier waren auch die Verunreinigungen durch andere Proteine

verhältnismäßig gering. Auch in den anderen Fraktionen konnte zu einem geringen Anteil His-Ptp-1 nachgewiesen werden, jedoch nicht in ausreichender Menge und vor allem im Vergleich zu den Verunreinigungen zu wenig.

Die Fraktionen 12 bis 14 wurden nachfolgend vereinigt und über das „Desalting“-Programm der ÄKTA™prime in 1xPBS + 10% Glycerin umgepuffert und die das aufgereinigte Protein enthaltenden Fraktionen bei -20°C gelagert.

5.9.2 Aufreinigung von Ptp-2

Hierfür wurde ebenfalls das pQE30-Expressionssystem von Qiagen verwendet und die für das codierende Protein entsprechende Sequenz in den pQE-30-Vektor kloniert. Nach erfolgter Überexpression durch IPTG-Zugabe erfolgte die Aufreinigung mittels der ÄKTA™prime.

Die Aufreinigung unter nativen Bedingungen war hier nicht erfolgreich, so dass die Aufreinigung unter denaturierenden Bedingungen (siehe 4.2.7.2) durchgeführt werden musste.

Auch hier wurden die verschiedenen Fraktionen auf einem 12%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und separiert.

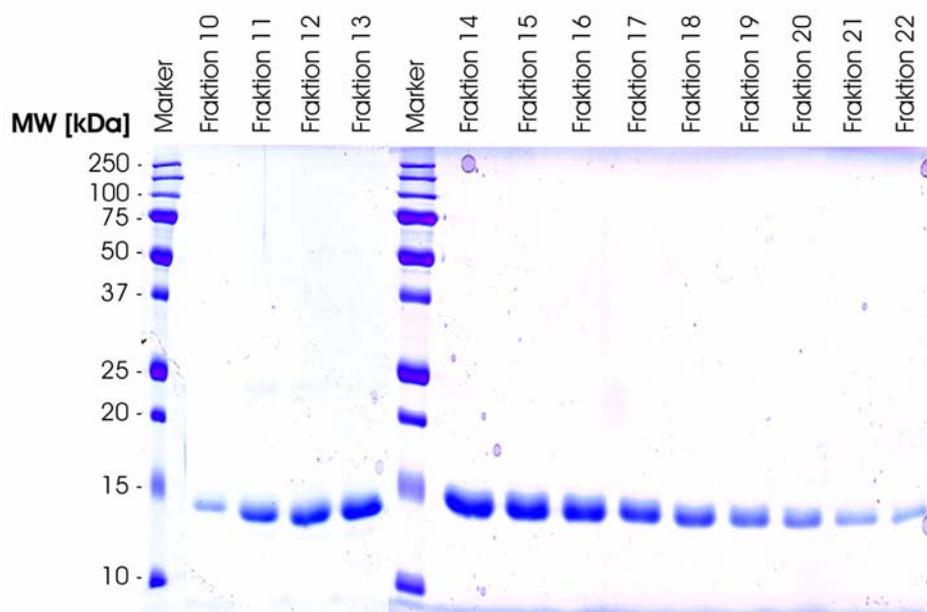


Abb. 31: SDS-PAGE der Expression und Aufreinigung von His-Ptp-2 unter denaturierenden Bedingungen

Die Fraktionen 11 bis 14 und 15 bis 19 wurden nachfolgend vereinigt und über das „Desalting“-Programm der ÄKTA™prime in 1xPBS + 10% Glycerin umgepuffert und die das aufgereinigte Protein enthaltenden Fraktionen bei -20°C gelagert.

6 Diskussion

In dieser Arbeit wurde der Einfluss niedermolekularer Protein-Tyrosin-Phosphatasen von *Listeria monocytogenes* auf das Stressverhalten, die Interaktion mit eukaryontischen Wirtszellen und die Genexpression untersucht. Zu diesem Zweck wurden drei verschiedene Phosphatase-Deletionsmutanten ($\Delta ptp-1$, $\Delta ptp-2$ und $\Delta ptp-1/2$) jeweils mit dem Wildtyp-Stamm von *L. monocytogenes* EGDe verglichen.

Zusätzlich wurden für weitere biochemische Analysen die beiden relevanten Proteine Ptp-1 und Ptp-2 als His-Tag-Fusionsproteine aufgereinigt.

6.1 Versuche zur Replikation der Phosphatase-Mutanten $\Delta ptp-1$, $\Delta ptp-2$ und $\Delta ptp-1/2$ in BHI-Medium unter verschiedenen Stressbedingungen

Bacillus subtilis besitzt zwei zu Ptp-1 und Ptp-2 von *L. monocytogenes* ähnliche LMW-PTPs (YfkJ und YwIE). Dort wurde gezeigt, dass Deletion jeder beiden Phosphatasen zu erhöhter Empfindlichkeit gegen Ethanolstress führt, wobei der Mechanismus ungeklärt blieb (133). Es ist jedoch nachgewiesen, dass Ethanolstress bei *B. subtilis* eine Reihe von Genen induziert, deren Transkription ganz oder teilweise unter der Kontrolle des Stress-Sigmafaktors SigB steht (65) – siehe dazu auch 6.4.

Die Wachstumsversuche der *L. monocytogenes* *ptp*-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp unter verschiedenen Bedingungen (Temperatur, NaCl- bzw. EtOH-Stress) ergaben keine Unterschiede. Die Deletion eines oder beider Phosphatase-Gene bewirkt somit keine Veränderung im Wachstumsverhalten bzw. bei der Anpassung an Temperatur-, osmolaren oder Ethanolstress (letzteres im Gegensatz zu *B. subtilis*).

Lediglich die Empfindlichkeit gegenüber H₂O₂ ist auf Seiten der $\Delta ptp-1/2$ -Doppelmutante leicht erhöht. Die Ursache hierfür ließ sich nicht feststellen.

6.2 Assoziation, Invasion und intrazelluläre Replikation in Caco-2-Epithelzellen

Nachdem vorhergehende Untersuchungen Hinweise auf eine verminderte Invasionsfähigkeit von *L. monocytogenes* *ptp*-Mutanten ergeben hatte, wurde diese Frage näher untersucht.

Zur Ermittlung der Anheftungs- sowie der Invasionsfähigkeit und der intrazellulären Replikation der *ptp*-Mutanten wurden konfluente Zellmonolayer von Caco-2-Epithelzellen mit den entsprechenden *Listeria*-Stämmen infiziert und nach verschiedenen Zeitpunkten, die Anzahl adhärenter bzw. überlebenden Bakterien bestimmt.

Die Invasionsraten von 52% für die $\Delta ptp-1$ -Mutante, 40% für die $\Delta ptp-2$ -Mutante und bei 59% für die $\Delta ptp-1/2$ -Doppelmutante zeigen deutlich, dass die Mutanten im Vergleich zum

Wildtyp wesentlich weniger invasiv sind. Auch die Assoziation an Caco-2-Zellen ist auf Seiten der *ptp*-Mutanten herabgesetzt.

Lediglich bezüglich der intrazellulären Replikation konnten keine Unterschiede zwischen Wildtyp und Mutanten festgestellt werden, alle vier untersuchten Stämme replizierten gleich stark.

Die Assoziation und Invasion in Caco-2-Zellen wird hauptsächlich durch Internalin A vermittelt, ein Protein, das sich auf der Oberfläche der Bakterienzelle befindet und in Wechselwirkung mit E-Cadherin auf der eukaryontischen Zielzelle tritt und somit sowohl Adhäsion als auch Invasion vermittelt (103).

Die herabgesetzte Invasivität und Assoziation der *ptp*-Mutanten lässt sich daher zwanglos durch eine abgeschwächte Expression der dafür notwendigen Gene bzw. Proteine der Internalingruppe (hier speziell Internalin A) erklären (Diplomarbeit S. Link, dieser Lehrstuhl). Auch in dieser Arbeit konnte eine deutlich abgeschwächte Expression von *inA* und auch *inB* in den *ptp*-Mutanten gezeigt werden. Hierauf wird weiter unten näher eingegangen.

Die Versuche zur Assoziation lieferten keine eindeutigen Ergebnisse, sondern deuten vielmehr nur darauf hin, dass die *ptp*-Mutanten – auch aufgrund der verringerten Expression von *inA* – schlechter an Caco-2-Zellen adhären können als der Wildtyp. Die schwankenden Ergebnisse sind hier auf die vermutlich schwache Wechselwirkung zwischen Bakterien und Wirtszelle zurückzuführen, welche in Abhängigkeit von den Versuchsbedingungen (z.B. Intensität des Waschvorgangs) unvermeidlich zu unterschiedlichen Resultaten führt.

6.3 Gesamttranskriptionsprofilierung mittels DNA-Microarrays

Nachdem sich alle *ptp*-Mutanten phänotypisch zumindest hinsichtlich Invasivität (und Motilität, siehe 6.4) vom Wildtyp unterscheiden, stellte sich die Frage nach dem zu Grunde liegenden Mechanismus. Prinzipiell könnte eine Veränderung des listeriellen Protein-Phosphorylierungsmusters, wie sie für die *ptp*-Mutanten angenommen werden muss, i) zur einer Aktivitätsänderung der für die beobachteten Effekte verantwortlichen Proteine (z.B. InIA) oder/und ii) der Transkription der betreffenden Gene führen. Über eine Phosphorylierung von z.B. InIA ist nichts bekannt, wie überhaupt über Proteinphosphorylierungen in *L. monocytogenes*. Angesichts der enormen Zahl von möglichen Protein-Substraten der Ptps konnte diese Frage nur durch eine Analyse des Phosphoproteoms über Zweidimensionale Gelelektrophorese angegangen werden, wozu aber die analytischen Möglichkeiten nicht gegeben waren.

Da bislang keine Erkenntnisse über Gene vorlagen, deren Transkription durch Ptp-1 bzw. Ptp-2 reguliert wird, wurden in dieser Arbeit mittels DNA-Microarray-Experimenten die Transkriptome von *L. monocytogenes* EGDe WT und $\Delta ptp-1$, $\Delta ptp-2$ und $\Delta ptp-1/2$ verglichen.

Der Vergleich zwischen Wildtyp und $\Delta ptp-1$ lieferte eine ganze Reihe von Genen, deren Transkription in der $\Delta ptp-1$ -Mutante deutlich schwächer ausfiel als im Wildtyp. Die meisten

hiervon codieren für Transport- und Bindungsproteine, verschiedenste Stoffwechselproteine sowie für Proteine unbekannter Funktion. Als in der $\Delta ptp-1$ -Mutante stärker exprimiert konnten nur wenige Gene identifiziert werden. Hierzu zählen einige Gene des PrfA-abhängigen Virulenzgenclusters LIPI-1 (*actA*, *plcA*, *plcB*, *hly*) sowie *pflA* (Pyruvat-Formiat-Lyase) und *foA* (Dihydronepterin-Aldolase).

Der Vergleich der Transkriptome von Wildtyp und $\Delta ptp-2$ -Mutante lieferte ein ähnliches Ergebnis wie zwischen Wildtyp und $\Delta ptp-1$ -Mutante. Auch hier konnten vorwiegend Gene identifiziert werden, deren Expression in den Mutanten schwächer ausfällt als im Wildtyp. Die PrfA-abhängigen Virulenzgene konnten hier jedoch nicht gefunden werden. GlyA und lmo1374 wiesen eine in der Mutante deutlich gesteigerte Expression auf. GlyA (Glycin-Hydroxymethyltransferase) ist am Stoffwechsel verschiedener Aminosäuren sowie am Methan-Metabolismus von *L. monocytogenes* beteiligt. lmo1374 (Lipoamid-Acyltransferase) spielt ebenfalls im Aminosäurestoffwechsel eine Rolle.

Der Vergleich zwischen Wildtyp und der $\Delta ptp-1/2$ -Mutante ergab keine wesentlichen Unterschiede zu den Vergleichen mit den jeweiligen Einzelmutanten. Hier konnten insgesamt deutlich weniger regulierte Gene identifiziert werden.

In allen drei Vergleichen fällt eine Reihe von Genen auf, deren Transkription in den Mutanten schwächer ausfällt und zwar unabhängig davon, welche der Phosphatasen deletiert ist. Dies sind im Wesentlichen die Gene für ein Mannose-spezifisches PTS (Phosphotransferase-System) (lmo0781-0784), die Osmoprotektant-Transporter (*opuCABCD* und *opuBA* – lmo1421), lmo0554, *dtpT* (Di-, Tripeptid-Transporter, lmo0555), lmo0722, das Gen für MCP (Methyl-Accepting Protein) (lmo0723), sowie lmo1433. Zusätzlich auffallend ist, dass alle der oben genannten Gene sowie einige weitere, hier nicht genannte, zum so genannten „SigB-Regulon“ von *Listeria* gehören (23, 80).

6.4 Vergleich der Expression ausgewählter durch Ptp-1 bzw. Ptp-2 regulierter Gene

Zur Verifizierung der durch die Microarray-Experimente erhaltenen Transkriptionsdaten wurde nachfolgend die Veränderung der Expression der oben genannten Gene sowie die der Internaline und des PrfA-abhängigen Virulenz-Genclusters LIPI-1 mittels quantitativer Realtime-RT-PCR überprüft. Die Gesamt-Transkriptionsprofilierung mittels der DNA-Microarraytechnik ermöglicht es, einen Überblick über Genomweite Veränderungen zu gewinnen und so Kandidatengene für weitere Untersuchungen zu identifizieren. Deren Transkriptionsverhalten muss dann über eine spezifischere Methode überprüft werden. Hier hat sich die Realtime-RT-PCR als geeignet erwiesen, da hier genspezifische Oligonukleotid-Primer eingesetzt werden (siehe Material und Methoden). Dazu wurden hier Gene ausgewählt, welche in Microarray-Analysen eine deutlich veränderte Transkription

aufwiesen und welche für den Infektionsverlauf bei *L. monocytogenes* nachgewiesenermaßen oder vermutlich wichtig sind.

In Realtime-RT-PCR Analysen zeigte sich die *in vitro* Expression der Virulenz-relevanten und durch den Transkriptionsaktivator PrfA regulierten LIPI-1-Gene (*plcA*, *hly*, *mpl*, *actA*, *plcB*) in den *ptp*-Mutanten annähernd um den Faktor 2, d.h. signifikant, erhöht. Eine Ausnahme bildete hier *prfA* selbst, welches keine erhöhte Expression in den *ptp*-Mutanten aufwies. PrfA wird auf drei Ebenen reguliert: auf transkriptioneller Ebene durch drei Promotoren, davon ein SigB-abhängiger (151), auf posttranskriptioneller Ebene durch Thermoswitch, d.h. unterschiedliche Sekundärstrukturen der mRNA bei unterschiedlichen Temperaturen, welche Translation nur bei Temperaturen über 30°C erlaubt (73), und durch Modulation der PrfA-Aktivität (66). Die verringerte *hly*-Genexpression in der Δ *ptp*-1/2-Mutante muss aufgrund der hohen Standardabweichung als „Ausreißer“ betrachtet werden.

Seit langem ist nachgewiesen, dass die LIPI-1 Gene bei Umgebungstemperatur (20°C) kaum und erst bei 37°C effizient transkribiert werden. Dies konnte unter anderem auf eine verstärkte Transkription von *prfA* zurückgeführt werden.

Die Deletion von *ptp*-1 oder *ptp*-2 zeigt jedoch keinen Einfluss auf die Transkription von *prfA*. Alle Versuche wurden bei 37°C durchgeführt, so dass Thermoswitch als Ursache der beobachteten Transkriptionssteigerung der LIPI-1 Gene ebenfalls nicht in Betracht kommt. Da jedoch der Verlust von *ptp*-1 bzw. *ptp*-2 bei allen anderen Genen des Virulenzclusters eine Expressionssteigerung hervorruft, könnte eine Beeinflussung der PrfA-Aktivität vorliegen. PrfA selbst weist fünf verschiedene putative Tyrosin-Phosphorylierungsstellen auf und könnte somit direkt durch die Phosphatase-Aktivität von Ptp-1 oder Ptp-2 in seiner Aktivität beeinflusst werden. Es ist bislang allerdings noch nichts über eine Aktivitätsbeeinflussung von PrfA durch Phosphorylierung bekannt. Wahrscheinlicher ist ein indirekter Effekt auf die PrfA-Aktivität vermittelt durch andere Regulatoren, die wiederum durch Ptp-1 oder Ptp-2 beeinflusst werden.

Die gesteigerte Expression der LIPI-1-Gene als Folge der Deletion von *ptp*-1 bzw. *ptp*-2 weist auf eine Beteiligung der Phosphatasen am Virulenzgeschehen von *Listeria monocytogenes* hin.

Daher wurde zusätzlich zu den *in vitro* Transkriptionsuntersuchungen die Genexpression aller oben genannten Gene *in vivo*, d.h. nach der Infektion von Caco-2-Zellen mittels Realtime-RT-PCR ermittelt.

Für keines der Gene des PrfA-abhängigen Virulenzgenclusters LIPI-1 – mit Ausnahme von *plcA* – konnte hier eine zum Wildtyp veränderte Genexpression festgestellt werden. Vielmehr wurden alle Gene in den *ptp*-Mutanten in etwa der gleichen Stärke transkribiert wie im Wildtyp. Lediglich für *plcA* konnte eine deutliche Transkriptionssteigerung in den *ptp*-Mutanten nachgewiesen werden. Der *in vitro* beobachtete Einfluss von *ptp*-1 bzw. *ptp*-2 auf *prfA* scheint *in vivo* weitgehend ausgeschaltet zu sein. Bei einer Infektion wird die Transkription der Virulenzgene und von *prfA* selbst sowie die Aktivität von PrfA gesteigert,

da alle im Virulenzgencluster codierten Proteine für die anfängliche Initiation sowie den Fortgang der Infektion unverzichtbar sind. Möglicherweise ist das *in vivo* beobachtete quasi wildtypische Transkriptionsniveau der Virulenzgene auf die grundsätzlich veränderte Transkription von *prfA* und der PrfA-abhängigen Virulenzgene, die veränderten PrfA-Aktivität sowie möglicherweise auch die von SigB (siehe unten) unter Infektionsbedingungen zurückzuführen. Dies könnte die unveränderte Vermehrung der Mutanten nach Invasion von Caco-2 Zellen erklären.

Die Untersuchung der *in vitro* Expression der Internaline ergab eine zweifach reduzierte Transkriptmenge von *inA*, *inB* und *inH* in den *ptp*-Mutanten. Die reduzierte Transkriptmenge von *inA* und *inB* erklärt die verringerte Invasionsfähigkeit der *ptp*-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp. Durch eine geringere Beladung der Bakterienoberfläche mit InA wird die Interaktion mit E-Cadherin auf der Oberfläche von Caco-2-Zellen und somit sowohl die Adhärenz als auch die Invasion erschwert.

Nach Infektion von Caco-2-Zellen (*in vivo*) konnte für die Internaline A, B, C und G kein Unterschied bezüglich der Transkription zwischen Wildtyp und *ptp*-Mutanten nachgewiesen werden. Für *inH* und *inE* konnte in den *ptp*-Mutanten eine deutlich geringere Transkriptmenge detektiert werden. Diese lag für *inH* bei Faktor 20 und für *inE* mindestens bei Faktor 4.

Die *inA*- und die *inB*-Transkription erfolgt über mehrere Promotoren, die zum Teil abhängig von PrfA und auch von SigB (41, 80, 174) sind. Die hier beobachtete durch Ptp-1 bzw. Ptp-2 hervorgerufene reduzierte Transkriptmenge von *inA* und *inB* konnte in ähnlicher Form bereits in einer $\Delta sigB$ -Mutante gezeigt werden (80).

Die beobachtete Transkriptionshemmung in den *ptp*-Mutanten könnte sowohl durch eine verringerte Aktivität von PrfA als auch von SigB erreicht werden. Es existieren inzwischen mehrere Anhaltspunkte, die vermuten lassen, dass Interaktionen und Überlappungen zwischen SigB- und PrfA-abhängiger Genexpression entscheidend dafür sind, dass während einer *Listeria*-Wirt-Interaktion die geeigneten Genexpressionsmuster ablaufen können (175).

Die sowohl *in vitro* als auch *in vivo* beobachtete verringerte Expression von *inH* in den *ptp*-Mutanten lässt sich bislang nicht erklären. Es ist nur bekannt, dass die Internaline A, B, C2, D und E in einer SigB-abhängigen Weise transkribiert werden (80). Auch konnte bislang keine PrfA-abhängige Expression von *inH* nachgewiesen werden. Es ist zwar bekannt, dass auch *inGHE* an der Invasion in Säugerzellen beteiligt sind (7) wie Versuche mit einer $\Delta inGHE$ -Mutante zeigten. Die hier beobachtete verringerte *inH*-Expression steht jedoch nicht mit der Invasion in Caco-2-Zellen in Zusammenhang, da hierfür hauptsächlich *inA* verantwortlich ist.

InIC wird *in vivo* in den *ptp*-Mutanten verstärkt exprimiert, ein Effekt, der wohl ebenfalls durch die gesteigerte Aktivität von PrfA zu erklären ist.

Aus den vorstehend genannten und einigen nachstehend diskutierten Ergebnissen wird deutlich, dass es einen regulatorischen „cross talk“ zwischen dem in der Einleitung beschriebenen PrfA-Regulon, dem SigB-Regulon und der Expression der durch Ptp-1/2 regulierten Gene gibt.

Auf physiologische Bedingungen wie Salz- oder Temperaturstress, aber auch experimentelle Bedingungen wie Exposition gegenüber Ethanol reagieren Bakterien mit der Induktion zahlreicher Gene. Im Fall gram-positiver Bakterien ist dies besonders gut untersucht für *Bacillus subtilis*. Es wurde gezeigt, dass das Schlüsselprotein der generellen Stressantwort der alternative Sigmafaktor B (SigB) ist (65, 69), welcher an eine spezifische DNA-Sequenz (SigB-Box) im Promoterbereich der regulierten Gene bindet.

Die Transkription von SigB selbst ist autoreguliert, seine Aktivität unterliegt einem komplexen Wechselspiel von Aktivatoren und Inhibitoren, siehe nachfolgende Abbildung.

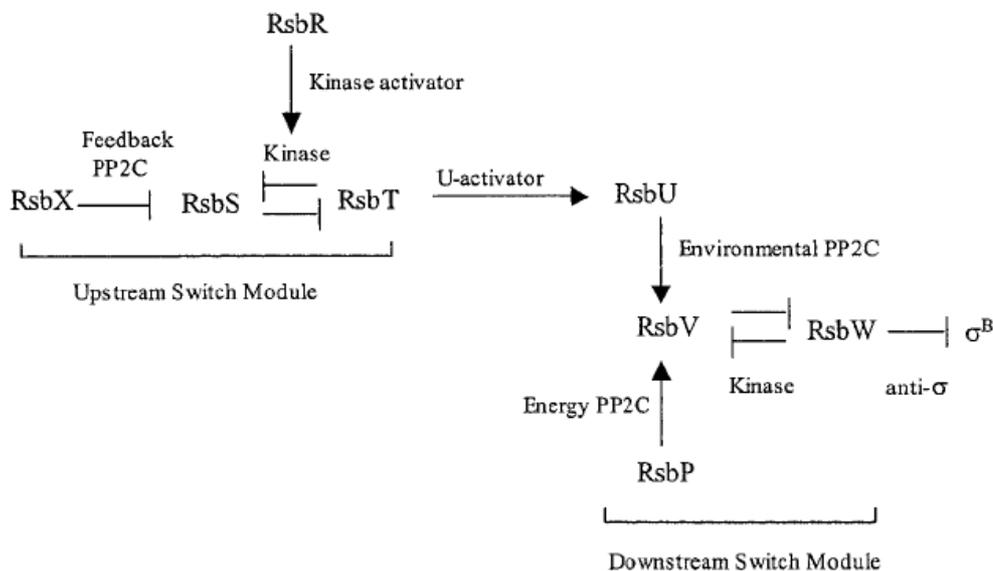


Abb. 32: Schematisches Modell der SigB-Regulation durch Partner-Switch Module.

Die SigB-Aktivität wird durch ein Modulpaar reguliert: ein oberhalb und ein unterhalb gelegenes Switchmodul, die Energie- oder Umweltstresssignale übermitteln. Jedes Modul besteht aus drei Komponenten, einer Serin-Phosphatase (X, U oder P), einem Antagonisten (S oder V), und einer Serinkinase (T oder W). Die Serinkinase arbeitet als das Switch-Protein und bindet – abhängig vom Phosphorylierungszustand des Antagonisten - entweder den Antagonisten oder das Zielprotein. Unter diesen regulatorischen Proteinen ist RsbP das einzige, das außerhalb des sigB-Operons codiert wird. Die Proteinaktivierung und –hemmung sind durch Pfeile und T-Pfeile gekennzeichnet. PP2C bezeichnet eine Proteinphosphatase 2C. (Quelle: siehe (47))

Sowohl bei *B. subtilis* als auch bei *L. monocytogenes* liegen dabei *rsbV* (Aktivator), *rsbW* (Inhibitor), *sigB* und *rsbX* in einer Transkriptionseinheit mit SigB-abhängigem Promotor. Schon früh war gezeigt worden, dass bei *L. monocytogenes* unter anderem die Virulenzgene in LIPI-1 durch Hitze- und Peroxidstress induziert werden (170). In zahlreichen nachfolgenden Arbeiten wurde die Rolle von *L. monocytogenes* SigB in der Stressantwort näher untersucht (24, 48, 49, 80, 175). Dabei zeigte sich, dass auch die an

der Invasion eukaryontischer Wirtszellen beteiligten Internaline A und B in ihrer Expression durch SigB beeinflusst werden (85). Weiter wurde deutlich, dass zahlreiche Gene von *L. monocytogenes*, auch in LIPI-1, sowohl durch SigB als auch durch den Virulenzregulator PrfA kontrolliert werden. Im Fall von LIPI-1 (und anderer PrfA-regulierter Gene) konnte das auf einen SigB-abhängigen PrfA-Promoter zurückgeführt werden (81, 151). In anderen Fällen von nachgewiesener Koregulation (23, 127) ist der Mechanismus unklar, insgesamt ist der „Cross Talk“ zwischen dem PrfA- und dem SigB-Regulon nicht ganz verstanden.

Durch die hier gewonnenen Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass – unter *in vitro*-Versuchsbedingungen - mindestens ein weiterer Regulator an der Transkription von *inA* und auch *inB* beteiligt ist, der möglicherweise mit PrfA und oder auch SigB in Wechselwirkung tritt. Dieser Effekt wird jedoch intrazellulär aufgehoben, was möglicherweise auf die hier auftretende veränderte Aktivität von PrfA und SigB zurückzuführen sein könnte.

Durch die Deletion von *ptp-1* bzw. *ptp-2* werden weitere Gene in ihrer Transkription gehemmt. Hierzu zählen Imo0554 (eine NADH-abhängige Butanol-Dehydrogenase), *dtpT* (Imo0555), Imo0722 (Pyruvat-Oxidase), *mcp* (Imo0723), die Komponenten eines Mannose-spezifischen PTS-Systems (Imo0781 bis Imo0784), Imo1421 (*opuBA*, Transporter für Osmoprotektanten), Imo1433 (Glutathion-Reduktase) und der Osmoprotektanten-Transporter *opuC*. Für Imo0784, Imo1421, Imo1433 und *opuCA* wurde bereits eine SigB-abhängige Expression gezeigt (80, 174). Auch die Gene Imo0554, *dtpT* (Imo0555), Imo0722 und höchstwahrscheinlich auch *mcp* (Imo0723) werden in einer SigB-abhängigen Weise transkribiert.

Die abgeschwächte Expression des Mannose-spezifischen PTS-Systems Lmo0781-0784 resultiert nicht in einem Wachstumsdefekt in einem Medium (TSB) mit Mannose als alleiniger C-Quelle (siehe 5.1). Allerdings ist bislang nicht biochemisch geklärt, ob es sich bei diesem Aufnahmesystem tatsächlich um eines für Mannose handelt, die Zuschreibung beruht auf Proteinhomologien zu bekannten Mannose-PTS. Zudem existieren in *Listeria* noch drei weitere putative Aufnahmesysteme für Mannose. Das Vorkommen multipler Aufnahmesysteme für die gleichen Zucker ist ein Charakteristikum von Listerien (59, 134). Vermutlich werden diese in Abhängigkeit von unbekanntem Parametern alternativ benutzt.

Lmo0722 katalysiert die Umwandlung von Pyruvat zu Acetyl-Phosphat und übernimmt damit eine zentrale Funktion im Pyruvat-Stoffwechsel von *L. monocytogenes*. Die abgeschwächte Transkription von Imo0722 resultierte jedoch nicht in einem Wachstumsdefekt auf Seiten der *ptp*-Mutanten. Welche Auswirkungen die reduzierte Expression haben könnte, gilt es noch herauszufinden.

Die verringerte Transkriptmenge von *mcp* resultiert – wie Motilitätstests zeigten – in einer deutlich eingeschränkten Bewegungsfähigkeit der *ptp*-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp. Aufgrund von Sequenzhomologien zu MCP's anderer Bakterienstämme und der Tatsache, dass in *L. monocytogenes* nur dieses eine MCP existiert, kann davon ausgegangen werden,

dass es sich hierbei tatsächlich um das *mcp* von *L. monocytogenes* handelt. Da *mcp* mit lmo0722 und lmo0724 in einer Transkriptionseinheit liegt und diese beiden Gene durch SigB reguliert werden, ist zu vermuten, dass auch *mcp* durch SigB reguliert wird.

MCP übernimmt als membranständiges Protein in der Chemotaxis von Bakterien die wichtige Rolle der Reizwahrnehmung aus der Umwelt. Über verschiedene Methylierungskaskaden von Che-Proteinen wird so – angepasst an den jeweiligen Reiz – die bakterielle Flagelle angetrieben und damit die Bewegung des Bakteriums ermöglicht.

Fehlt das MCP auf der Oberfläche der Bakterienzelle, ist keine oder nur noch eine eingeschränkte Reizwahrnehmung möglich, was die Unbeweglichkeit der *ptp*-Mutanten erklären könnte. Allerdings sind an der bakteriellen Bewegung noch viele weitere Faktoren beteiligt, darunter sämtliche Proteinbestandteile der Flagelle sowie die Motorproteine, die die Flagelle antreiben. Da in dieser Arbeit keine Expressionsanalysen für diese Gene bzw. Proteine durchgeführt wurden, kann nicht abschließend geklärt werden, woraus der unbewegliche Phänotyp der *ptp*-Mutanten resultiert.

Interessanterweise resultiert auch die Deletion des Gens für den Zwei-Komponenten-System Response-Regulator DegU in einem unbeweglichen Phänotyp (189). Ein Zusammenhang mit dem Ptp-System ist jedoch nicht erkennbar.

Listerien verfügen über mehrere Systeme zur Abwehr von oxidativem Stress. Neben Katalase, Superoxid-Dismutase, Thioredoxin spielt hier Glutathion eine Rolle. Dieses muss aus seiner oxidierten Disulfidform durch Glutathionreduktase regeneriert werden.

Obwohl für Lmo1433, das als Glutathion-Reduktase annotiert ist, ebenfalls eine Transkriptionshemmung in den *ptp*-Mutanten beobachtet werden konnte, konnte kein Effekt auf die Empfindlichkeit gegenüber oxidativem Stress gezeigt werden. Der Empfindlichkeitstest gegenüber Wasserstoffperoxid zeigte keine Unterschiede zwischen Wildtyp und *ptp*-Mutanten. Lediglich die Doppelmutante wurde bei einer Konzentration von 25 μ M H₂O₂ stärker in ihrem Wachstum gehemmt als die übrigen Stämme. Woher dieser Effekt stammt, kann nicht geklärt werden, zumal auch fraglich ist, ob Lmo1433 tatsächlich eine Glutathion-Reduktase darstellt. Tatsächlich kodiert lmo0983 für ein Protein mit wesentlich größerer Ähnlichkeit zu bekannten Glutathionreduktasen als Lmo1433 (J. Kreft, pers. Mitteilung).

Die reduzierte Expression von *dtpT*, *opuC* und lmo1421 (*opuBA*) müsste eigentlich in einer veränderten Anfälligkeit gegenüber osmotischem Stress resultieren, da alle diese Gene an der listeriellen Stressantwort beteiligt sind. DtpT wirkt als Transporter für Valin- und Leucin-Di- und Tripeptide, die unter Stressbedingungen als Quellen für diese Aminosäuren dienen können. Eine Δ *dtpT*-Mutante wurde als Virulenz-assoziiert im Mausmodell beschrieben. Das *dtpT*-Gen wird indirekt über PrfA reguliert (190).

Über *opuC* und lmo1421 werden Cholin, Carnitin und Betain transportiert, wenn die Bakterienzelle osmotischem Stress ausgesetzt ist. Diese kleinen Moleküle dienen der osmotischen Balance und dem Schutz von Enzymfunktionen gegenüber Salzhaltigkeit, hohen Temperaturen und Austrocknung. OpuCA und lmo1421 werden über SigB reguliert (80). Weshalb die in dieser Arbeit beobachtete Transkriptionshemmung dieser Gene keinen Einfluss auf die Antwort auf osmotischen Stress hervorruft, ist noch unklar. Möglich wäre,

dass unter osmotischen Stress auch in den *ptp*-Mutanten die Transkription der fraglichen Gene ein ausreichendes Niveau erreicht, dies bedarf weiterer Untersuchungen.

Auch die *in vivo* Genexpression der oben aufgeführten Gene lag in den *ptp*-Mutanten um das 5- bis 20-fache niedriger als im Wildtyp.

Die durch Ptp-1 bzw. Ptp-2 hervorgerufenen Effekte ähneln denen, die für eine $\Delta sigB$ -Mutante beschrieben wurden (80). Durch die Deletion von *sigB* wurde auch hier eine deutliche Expressionshemmung der oben aufgeführten Gene nachgewiesen. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass auch die Expression von *rsbW*, dem negativen Regulator der SigB-Aktivität in den *ptp*-Mutanten deutlich abgeschwächt ist, woraus eigentlich eine höhere SigB-Aktivität resultieren sollte. Wahrscheinlich wird auch die Expression von *rsbV*, *sigB* und *rsbX* gehemmt, da diese zusammen mit *rsbW* in einem Operon organisiert sind und eine Transkriptionseinheit bilden (47).

Es ist folglich anzunehmen, dass Ptp-1 und / oder Ptp-2 mit dem SigB-Regulon auf eine bislang noch unbekannt Weise interagieren und dadurch die normalerweise durch SigB verursachte Transkriptionsaktivierung bestimmter Gene aufgehoben wird.

Die Expression von *ptp-1* und *ptp-2* selbst wurde sowohl *in vitro* als auch *in vivo* bestimmt. Hier zeigten sich keine Unterschiede in Abhängigkeit der Kulturbedingungen. Für *ptp-1* konnte im Wildtyp eine stärkere Expression als für *ptp-2* nachgewiesen werden. Auch durch die Deletion von *ptp-1* wird die *ptp-2*-Expression nicht erhöht und vice versa. Somit lässt sich ein unmittelbarer Einfluss von Ptp-1 auf die Expression von *ptp-2* bzw. umgekehrt ausschließen.

Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die Transkription von *ptp-1* und auch von *ptp-2* durch PrfA leicht erhöht wird, d.h. in einer $\Delta prfA$ Mutante erniedrigt ist. Dieser Einfluss ist vermutlich auf einen indirekten PrfA-Effekt zurückzuführen, da keines der Phosphatase-Gene eine PrfA-Box aufweist.

Zusätzlich konnte in einer $\Delta sigB$ -Mutante eine gesteigerte Transkription von *ptp-1* und *ptp-2* nachgewiesen werden. Die Identifizierung putativer SigB-Boxen oberhalb von *ptp-1* und *ptp-2* deuten auf eine Beteiligung von SigB an der Regulation von *ptp-1* und *ptp-2* hin. Untersuchungen zur Transkription von *rsbW*, dem negativen Regulator von SigB, zeigten eine deutliche Expressionshemmung wenn *ptp-1* bzw. *ptp-2* deletiert sind. Da *rsbW* als zweites Gen innerhalb eines Operons aus den Genen *rsbV*, *rsbW*, *sigB* und *rsbX* liegt, ist anzunehmen, dass auch die anderen vier Gene in ihrer Transkription abgeschwächt sind. Ptp-1 bzw. Ptp-2 führen also vermutlich zu einer indirekten Transkriptionssteigerung dieser Gene des SigB-Regulons und damit zu einer verringerten Aktivität von SigB.

6.5 Vergleich der Proteinprofile

Zwar liefert eine Transkriptionsanalyse ausreichend Hinweise auf regulatorische und biochemische Zusammenhänge sowie Genfunktionen. Das physiologische Geschehen wird letztendlich jedoch durch Menge und Aktivität der zugehörigen Proteine bestimmt. Diese wird außer durch Transkriptmenge wesentlich durch Translationseffizienz sowie durch Stabilität, unter Umständen durch Proteinmodifikation determiniert.

Mittels der 2D-Gelelektrophorese wurden die Unterschiede zwischen Wildtyp und den *ptp*-Mutanten auch auf Proteinebene ermittelt. Hierzu wurden Zellextraktproteine aus den zu vergleichenden Stämmen isoliert und mittels der 2D-gelelektrophoretischen Auftrennung die resultierenden Proteinmuster verglichen.

Auch hier fiel auf, dass – unabhängig davon, welches der Phosphatase-Gene deletiert war – dieselben Proteine reguliert schienen. Mittels MALDI-TOF-MS konnten folgende Proteine als reguliert identifiziert werden: PfIA (Format-Acetyltransferase), SepA, Imo1254 (Phosphotrehalase), Imo0722 (Pyruvat-Oxidase), Imo0913 (Succinat-Semialdehyd-Dehydrogenase), OpuCA, Imo2695 (Dihydroxyaceton-Kinase), Imo0539 (Tagatose-1,6-Diphosphat-Aldolase), Imo1437 (Aspartat-Semialdehyd-Dehydrogenase), bsh (Imo2067), Imo0669 (Oxidoreduktase), Imo0799 (unbekannte Funktion), RsbR (positiver Regulator der SigB-Aktivität), Imo1029 (hypothetisches Protein), Imo2205 (Phosphoglyceromutase) sowie RsbW (negativer Regulator der SigB-Aktivität). Einzig für RsbW konnte in den *ptp*-Mutanten eine abgeschwächte Expression gezeigt werden. Alle übrigen genannten Proteine werden in den *ptp*-Mutanten stärker exprimiert als im Wildtyp. Die unterstrichen markierten Proteine geben solche Proteine wieder, die auch über die Microarray-Experimente als Ptp-1- bzw. Ptp-2-reguliert identifiziert wurden. PfIA wird sowohl auf Transkriptions- als auch auf Proteinebene in den *ptp*-Mutanten verstärkt exprimiert. PfIA übernimmt im Pyruvat-Stoffwechsel (siehe Abb. 33) von *L. monocytogenes* die Umwandlung von Pyruvat in Acetyl-CoA und umgekehrt und ist auch in den Propanoat- und Butanoat-Metabolismus involviert.

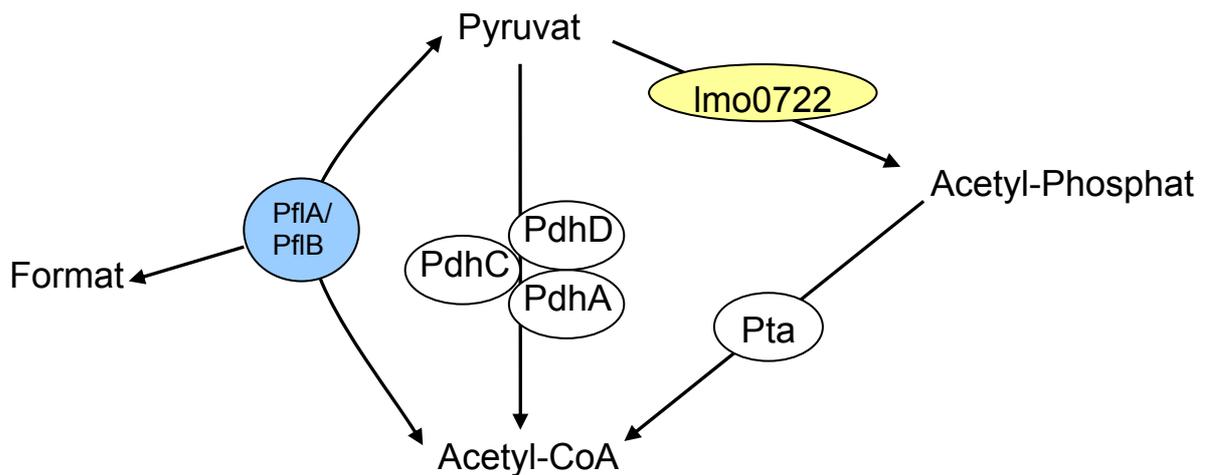


Abb. 33: Ausschnitt aus dem Pyruvat-Metabolismus von *L. monocytogenes*
 PdhACD = Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex; Pta = Phosphotransacetylase; PflA/B = Pyruvat-Format-Lyase; Imo0722 = Pyruvat-Oxidase

Zusätzlich existiert in *L. monocytogenes* auch noch PflB, das die gleiche Funktion wie PflA übernimmt.

Wie die Abbildung zeigt ist auch Imo0722 – wie oben bereits erwähnt – in den Pyruvat-Metabolismus involviert (Umwandlung Pyruvat in Acetyl-Phosphat).

Für die Pyruvat-Oxidase Imo0722 wurde ebenfalls eine differentielle Expression auf Transkriptions- bzw. Proteinebene nachgewiesen. Dieses Enzym ist im Pyruvat-Stoffwechsel für die Umwandlung von Pyruvat in Acetyl-Phosphat verantwortlich (siehe: http://www.kegg.com/dbget-bin/show_pathway?lmo00620+lmo0722). Im Pyruvat-Stoffwechsel könnte Acetyl-Phosphat auch über Umwege aus Acetyl-CoA oder über Acetat generiert werden. Da jedoch auf Proteinebene eine deutlich höhere Menge an Imo0722 in den *ptp*-Mutanten nachgewiesen werden konnte, ist auch hier vermutlich die höhere Stabilität des Proteins dafür verantwortlich, dass keine Wachstumsdefekte bei den *ptp*-Mutanten auftreten. Das wildtypische Wachstum der *ptp*-Mutanten ist auch nicht auf das Vollmedium BHI beschränkt, sondern gilt auch für Wachstum in Minimalmedium (P. Herrmann, dieser Lehrstuhl) sowie *in vivo*.

Ob hier allerdings ein funktionaler Zusammenhang zwischen der Expression von PflA und Imo0722 besteht, ist noch unklar.

Lmo0539, *opuCA* und Lmo0669 werden auf Transkriptionsebene in den *ptp*-Mutanten schwächer exprimiert, weisen auf Proteinebene jedoch eine stärkere Expression als im Wildtyp auf. Die Ursache für diese Unterschiede liegen vermutlich in einer stärkeren Stabilität dieser Proteine begründet, möglicherweise hervorgerufen durch einen veränderten Phosphorylierungszustand.

Wie die Wachstumsanalysen zeigten, weisen die *ptp*-Mutanten keine höhere Anfälligkeit für osmotischen Stress auf als der Wildtyp, wie man eigentlich aufgrund der Transkriptionsergebnisse für *opuC* vermuten könnte. Sollte allerdings der OpuC-

Proteinkomplex durch die Deletion von *ptp-1* oder *ptp-2* stabiler sein, wäre die Aufnahme von Osmoprotektanten weiterhin gewährleistet, was auch die Resistenz gegen osmotischen Stress bei den *ptp*-Mutanten erklären würde.

Für Lmo0913 wurden drei Proteinspots identifiziert, die vermutlich aufgrund von Konformationsänderungen (8) oder auch aufgrund unterschiedlicher Phosphorylierungszustände resultieren könnten. Lmo0913 ist am Glutamat-, Tyrosin- und Butanoat-Stoffwechsel beteiligt und katalysiert die Umwandlung von Succinat-Semialdehyd in Succinat.

6.6 Mögliche Wechselwirkungen zwischen Ptp-1 und Ptp-2

Insgesamt lässt sich sagen, dass unabhängig davon, welches der *ptp*-Gene deletiert ist, die gleichen Auswirkungen resultieren, sprich dieselben Gene und Proteine reguliert erscheinen und derselbe Phänotyp auftritt. Ähnliches wurde bereits für *Bacillus subtilis* und die dort vorhandenen Phosphatasen YwIE und YfkJ beschrieben (133). Eine gegenseitige Beeinflussung der beiden listeriellen Phosphatasen auf Transkriptionsebene kann ausgeschlossen werden, da die Transkription von *ptp-1* nicht durch Deletion von *ptp-2* bzw. umgekehrt erhöht wird. Auch liefert die Doppelmutante die gleichen Effekte wie die beiden Einfachmutanten.

Insgesamt muss vermutet werden, dass der Effekt von Ptp-1 bzw. Ptp-2 nicht direkt auf die Expression von Transkriptionsfaktoren gerichtet ist, sondern vielmehr die Aktivität von Regulatoren und alternativen Sigma-Faktoren beeinflusst wird. Allerdings konnte hier nicht festgestellt werden um welche Faktoren es sich hierbei handelt, da schon die hohe Anzahl von 209 (59) möglichen Regulatoren in *L. monocytogenes* die Suche erheblich erschwert. Es scheint auch wahrscheinlich, dass mehr als nur ein Faktor beeinflusst wird und zusätzlich sowohl PrfA als auch SigB – vermutlich in ihrer Aktivität – durch Ptp-1 und / oder Ptp-2 verändert werden.

Alle regulierten Gene bzw. Proteine werden vermutlich von Transkriptionsfaktoren beeinflusst, die i) entweder nur an einer Stelle von entweder der einen oder der anderen Phosphatase oder ii) einem Komplex (als Di- oder auch Multimer) aus beiden dephosphoryliert werden müssen oder iii) es existieren hier jeweils zwei Phosphatgruppen, die einen Angriff beider Phosphatasen notwendig machen um die volle Aktivität des Transkriptionsfaktors auszubilden. Möglich wäre auch eine durch die Dephosphorylierung hervorgerufene Konformationsänderung, die eine veränderte Bindung der betroffenen Regulatoren an ihre Zielsequenzen verursacht.

Erste Bindungsstudien (Daten nicht gezeigt) weisen auf eine mögliche Interaktion zwischen Ptp-1 und Ptp-2 hin. Dies muss jedoch durch weiterführende Versuche erst noch bestätigt werden.

Es lässt sich eindeutig ein Zusammenhang zwischen der Deletion von *ptp-1* bzw. *ptp-2* und dem SigB-Regulon aufzeigen, allerdings ist noch unklar wie dieser Zusammenhang genau aussieht. Viele der hier identifizierten – durch Ptp-1 bzw. Ptp-2 regulierten Gene – gehören nachweislich zum SigB-Regulon (23, 80), auch wenn der hervorgerufene Effekt genau umgekehrt auftritt. So werden durch die Deletion von *ptp-1* bzw. *ptp-2* Gene hauptsächlich in ihrer Transkription gehemmt, die normalerweise durch SigB aktiviert werden. Erstaunlicherweise lässt sich bei den *ptp*-Mutanten keine veränderte Stressresistenz feststellen, obwohl mehrere an der listeriellen Stressantwort beteiligte Gene und Proteine in ihrer Expression deutlich beeinflusst sind.

Zur genaueren Analyse dieser Effekte müssen weitere Versuche durchgeführt werden. Im Rahmen einer Diplomarbeit sollen Komplementationsmutanten hergestellt und nachfolgend charakterisiert werden. Auch müssen weitere Interaktionsstudien zwischen Ptp-1 und Ptp-2 durchgeführt werden, um den Mechanismus genauer zu verstehen. Immer noch unbekannt ist auch das exakte Substrat für die beiden Phosphatasen und ob diese tatsächlich nur auf Tyrosinreste wirken oder eventuell Serin- oder Threoninreste als Angriffspunkt haben.

6.7 Überexpression und Aufreinigung von Ptp-1 und Ptp-2 als His-Tag-Fusionsproteine

Zur Aufreinigung von Ptp-1 und Ptp-2 wurde jeweils die codierende Sequenz in den Vektor pQE30 kloniert, dieser in *E. coli* M15-Zellen transformiert und durch IPTG-Induktion eine Überexpression der Proteine als His-Tag-Fusionsproteine durchgeführt. Nachfolgend wurden die rekombinanten Proteine mittels Affinitätschromatographie über eine Ni-NTA-Agarosesäule und dem ÄKTA™prime –System aufgereinigt.

Ptp-1 konnte unter nativen Bedingungen aufgereinigt werden, Ptp-2 nur unter denaturierenden Bedingungen.

Leider konnten nachfolgend keine Funktionsanalysen mehr durchgeführt werden. Im Rahmen einer Diplomarbeit sollen jedoch Bindungsaspekte sowie die Substratspezifität der aufgereinigten Proteine untersucht werden.

Zusätzlich sind weitere Untersuchungen notwendig um klarere Aussagen über die Beteiligung von SigB und PrfA tätigen zu können. Auch müssen die beteiligten Regulatoren identifiziert sowie die Art und Weise der Regulation durch Ptp-1 und Ptp-2 ermittelt werden.

7 Literaturverzeichnis

1. **Alex, L. A., and M. I. Simon.** 1994. Protein histidine kinases and signal transduction in prokaryotes and eukaryotes. *Trends Genet* **10**:133-8.
2. **Alouf, J. E. a. C. G.** 1991. The family of the antigenically-related, cholesterol-binding ("sulfhydryl-activated") cytolytic toxins. Academic Press Ltd.:147-186.
3. **Alvarez-Dominguez, C., J. A. Vazquez-Boland, E. Carrasco-Marin, P. Lopez-Mato, and F. Leyva-Cobian.** 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**:78-88.
4. **Andre, P., and A. Genicot.** 1987. [First isolation of *Listeria welshimeri* in a human]. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg [A]* **263**:605-6.
5. **Archambaud, C., E. Guin, J. Pizarro-Cerda, P. Cossart, and O. Dussurget.** 2005. Translation elongation factor EF-Tu is a target for Stp, a serine-threonine phosphatase involved in virulence of *Listeria monocytogenes*. *Mol Microbiol* **56**:383-96.
6. **Bender, M. H., and J. Yother.** 2001. CpsB is a modulator of capsule-associated tyrosine kinase activity in *Streptococcus pneumoniae*. *J Biol Chem* **276**:47966-74.
7. **Bergmann, B., D. Raffelsbauer, M. Kuhn, M. Goetz, S. Hom, and W. Goebel.** 2002. InIA- but not InIB-mediated internalization of *Listeria monocytogenes* by non-phagocytic mammalian cells needs the support of other internalins. *Mol Microbiol* **43**:557-70.
8. **Berven, F. S., O. A. Karlsen, J. C. Murrell, and H. B. Jensen.** 2003. Multiple polypeptide forms observed in two-dimensional gels of *Methylococcus capsulatus* (Bath) polypeptides are generated during the separation procedure. *Electrophoresis* **24**:757-61.
9. **Bliska, J. B., K. L. Guan, J. E. Dixon, and S. Falkow.** 1991. Tyrosine phosphate hydrolysis of host proteins by an essential *Yersinia* virulence determinant. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**:1187-91.
10. **Bohne, J., Z. Sokolovic, and W. Goebel.** 1994. Transcriptional regulation of *prfA* and PrfA-regulated virulence genes in *Listeria monocytogenes*. *Mol Microbiol* **11**:1141-50.
11. **Braun, L., S. Dramsi, P. Dehoux, H. Bierne, G. Lindahl, and P. Cossart.** 1997. InIB: an invasion protein of *Listeria monocytogenes* with a novel type of surface association. *Mol Microbiol* **25**:285-94.
12. **Braun, L., B. Ghebrehiwet, and P. Cossart.** 2000. gC1q-R/p32, a C1q-binding protein, is a receptor for the InIB invasion protein of *Listeria monocytogenes*. *Embo J* **19**:1458-66.
13. **Braun, L., F. Nato, B. Payrastre, J. C. Mazie, and P. Cossart.** 1999. The 213-amino-acid leucine-rich repeat region of the *Listeria monocytogenes* InIB protein is sufficient for entry into mammalian cells, stimulation of PI 3-kinase and membrane ruffling. *Mol Microbiol* **34**:10-23.
14. **Brundage, R. A., G. A. Smith, A. Camilli, J. A. Theriot, and D. A. Portnoy.** 1993. Expression and phosphorylation of the *Listeria monocytogenes* ActA protein in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**:11890-4.
15. **Bubert, A., S. Kohler, and W. Goebel.** 1992. The homologous and heterologous regions within the *iap* gene allow genus- and species-specific identification of *Listeria* spp. by polymerase chain reaction. *Appl Environ Microbiol* **58**:2625-32.
16. **Bubert, A., M. Kuhn, W. Goebel, and S. Kohler.** 1992. Structural and functional properties of the p60 proteins from different *Listeria* species. *J Bacteriol* **174**:8166-71.
17. **Bubert, A., P. Schubert, S. Kohler, R. Frank, and W. Goebel.** 1994. Synthetic peptides derived from the *Listeria monocytogenes* p60 protein as antigens for the generation of polyclonal antibodies specific for secreted cell-free *L. monocytogenes* p60 proteins. *Appl Environ Microbiol* **60**:3120-7.

18. **Bugert, P., and K. Geider.** 1995. Molecular analysis of the *ams* operon required for exopolysaccharide synthesis of *Erwinia amylovora*. *Mol Microbiol* **15**:917-33.
19. **Camilli, A., L. G. Tilney, and D. A. Portnoy.** 1993. Dual roles of *plcA* in *Listeria monocytogenes* pathogenesis. *Mol Microbiol* **8**:143-57.
20. **Carmichael, W. W.** 1997. The cyanotoxins. *Adv Botanical Res* **8**:153-158.
21. **Chakraborty, T., and W. Goebel.** 1988. Recent developments in the study of virulence in *Listeria monocytogenes*. *Curr Top Microbiol Immunol* **138**:41-58.
22. **Chakraborty, T., M. Leimeister-Wachter, E. Domann, M. Hartl, W. Goebel, T. Nichterlein, and S. Notermans.** 1992. Coordinate regulation of virulence genes in *Listeria monocytogenes* requires the product of the *prfA* gene. *J Bacteriol* **174**:568-74.
23. **Chatterjee, S. S., H. Hossain, S. Otten, C. Kuenne, K. Kuchmina, S. Machata, E. Domann, T. Chakraborty, and T. Hain.** 2006. Intracellular gene expression profile of *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun* **74**:1323-38.
24. **Chaturongakul, S., and K. J. Boor.** 2004. RsbT and RsbV contribute to sigmaB-dependent survival under environmental, energy, and intracellular stress conditions in *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol* **70**:5349-56.
25. **Chico-Calero, I., M. Suarez, B. Gonzalez-Zorn, M. Scortti, J. Slaghuis, W. Goebel, and J. A. Vazquez-Boland.** 2002. Hpt, a bacterial homolog of the microsomal glucose-6-phosphate translocase, mediates rapid intracellular proliferation in *Listeria*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:431-6.
26. **Collins, M. D., S. Wallbanks, D. J. Lane, J. Shah, R. Nietupski, J. Smida, M. Dorsch, and E. Stackebrandt.** 1991. Phylogenetic analysis of the genus *Listeria* based on reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA. *Int J Syst Bacteriol* **41**:240-6.
27. **Cook, D., and L. Sequeira.** 1991. Genetic and biochemical characterization of a *Pseudomonas solanacearum* gene cluster required for extracellular polysaccharide production and for virulence. *J Bacteriol* **173**:1654-62.
28. **Cossart, P., and J. Mengaud.** 1989. *Listeria monocytogenes*. A model system for the molecular study of intracellular parasitism. *Mol Biol Med* **6**:463-74.
29. **Cossart, P., J. Pizarro-Cerda, and M. Lecuit.** 2003. Invasion of mammalian cells by *Listeria monocytogenes*: functional mimicry to subvert cellular functions. *Trends Cell Biol* **13**:23-31.
30. **Cozzone, A. J.** 2005. Role of protein phosphorylation on serine/threonine and tyrosine in the virulence of bacterial pathogens. *J Mol Microbiol Biotechnol* **9**:198-213.
31. **Dabiri, G. A., J. M. Sanger, D. A. Portnoy, and F. S. Southwick.** 1990. *Listeria monocytogenes* moves rapidly through the host-cell cytoplasm by inducing directional actin assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**:6068-72.
32. **Deutscher, J., R. Herro, A. Bourand, I. Mijakovic, and S. Poncet.** 2005. P-Ser-HPr--a link between carbon metabolism and the virulence of some pathogenic bacteria. *Biochim Biophys Acta* **1754**:118-25.
33. **Deutscher, J., and M. H. Saier, Jr.** 2005. Ser/Thr/Tyr protein phosphorylation in bacteria - for long time neglected, now well established. *J Mol Microbiol Biotechnol* **9**:125-31.
34. **Domann, E., M. Leimeister-Wachter, W. Goebel, and T. Chakraborty.** 1991. Molecular cloning, sequencing, and identification of a metalloprotease gene from *Listeria monocytogenes* that is species specific and physically linked to the listeriolysin gene. *Infect Immun* **59**:65-72.
35. **Domann, E., J. Wehland, K. Niebuhr, C. Haffner, M. Leimeister-Wachter, and T. Chakraborty.** 1993. Detection of a *prfA*-independent promoter responsible for listeriolysin gene expression in mutant *Listeria monocytogenes* strains lacking the PrfA regulator. *Infect Immun* **61**:3073-5.
36. **Domann, E., J. Wehland, M. Rohde, S. Pistor, M. Hartl, W. Goebel, M. Leimeister-Wachter, M. Wuenscher, and T. Chakraborty.** 1992. A novel bacterial virulence gene in *Listeria monocytogenes* required for host cell microfilament interaction with homology to the proline-rich region of vinculin. *Embo J* **11**:1981-90.

37. **Domann, E., S. Zechel, A. Lingnau, T. Hain, A. Darji, T. Nichterlein, J. Wehland, and T. Chakraborty.** 1997. Identification and characterization of a novel PrfA-regulated gene in *Listeria monocytogenes* whose product, IrpA, is highly homologous to internalin proteins, which contain leucine-rich repeats. *Infect Immun* **65**:101-9.
38. **Dramsi, S., I. Biswas, E. Maguin, L. Braun, P. Mastroeni, and P. Cossart.** 1995. Entry of *Listeria monocytogenes* into hepatocytes requires expression of inIB, a surface protein of the internalin multigene family. *Mol Microbiol* **16**:251-61.
39. **Dramsi, S., F. Bourdichon, D. Cabanes, M. Lecuit, H. Fsihi, and P. Cossart.** 2004. FbpA, a novel multifunctional *Listeria monocytogenes* virulence factor. *Mol Microbiol* **53**:639-49.
40. **Dramsi, S., P. Dehoux, M. Lebrun, P. L. Goossens, and P. Cossart.** 1997. Identification of four new members of the internalin multigene family of *Listeria monocytogenes* EGD. *Infect Immun* **65**:1615-25.
41. **Dramsi, S., C. Kocks, C. Forestier, and P. Cossart.** 1993. Internalin-mediated invasion of epithelial cells by *Listeria monocytogenes* is regulated by the bacterial growth state, temperature and the pleiotropic activator prfA. *Mol Microbiol* **9**:931-41.
42. **Dussurget, O., J. Pizarro-Cerda, and P. Cossart.** 2004. Molecular Determinants of *Listeria Monocytogenes* Virulence. *Annu Rev Microbiol*.
43. **Egger, L. A., H. Park, and M. Inouye.** 1997. Signal transduction via the histidyl-aspartyl phosphorelay. *Genes Cells* **2**:167-84.
44. **Engelbrecht, F., S. K. Chun, C. Ochs, J. Hess, F. Lottspeich, W. Goebel, and Z. Sokolovic.** 1996. A new PrfA-regulated gene of *Listeria monocytogenes* encoding a small, secreted protein which belongs to the family of internalins. *Mol Microbiol* **21**:823-37.
45. **Farber, J. M., and P. I. Peterkin.** 1991. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiol Rev* **55**:476-511.
46. **Fauman, E. B., and M. A. Saper.** 1996. Structure and function of the protein tyrosine phosphatases. *Trends Biochem Sci* **21**:413-7.
47. **Ferreira, A., M. Gray, M. Wiedmann, and K. J. Boor.** 2004. Comparative genomic analysis of the sigB operon in *Listeria monocytogenes* and in other Gram-positive bacteria. *Curr Microbiol* **48**:39-46.
48. **Ferreira, A., C. P. O'Byrne, and K. J. Boor.** 2001. Role of sigma(B) in heat, ethanol, acid, and oxidative stress resistance and during carbon starvation in *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol* **67**:4454-7.
49. **Fraser, K. R., D. Sue, M. Wiedmann, K. Boor, and C. P. O'Byrne.** 2003. Role of sigmaB in regulating the compatible solute uptake systems of *Listeria monocytogenes*: osmotic induction of opuC is sigmaB dependent. *Appl Environ Microbiol* **69**:2015-22.
50. **Freitag, N. E., and D. A. Portnoy.** 1994. Dual promoters of the *Listeria monocytogenes* prfA transcriptional activator appear essential *in vitro* but are redundant *in vivo*. *Mol Microbiol* **12**:845-53.
51. **Freitag, N. E., L. Rong, and D. A. Portnoy.** 1993. Regulation of the prfA transcriptional activator of *Listeria monocytogenes*: multiple promoter elements contribute to intracellular growth and cell-to-cell spread. *Infect Immun* **61**:2537-44.
52. **Freitag, N. E., P. Youngman, and D. A. Portnoy.** 1992. Transcriptional activation of the *Listeria monocytogenes* hemolysin gene in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **174**:1293-8.
53. **Freshney, R. I.** 1987. Culture of animal cells. Alan R. Lis. Inc. New York.
54. **Gaillard, J. L., P. Berche, C. Frehel, E. Gouin, and P. Cossart.** 1991. Entry of *L. monocytogenes* into cells is mediated by internalin, a repeat protein reminiscent of surface antigens from gram-positive cocci. *Cell* **65**:1127-41.
55. **Gaillard, J. L., P. Berche, J. Mounier, S. Richard, and P. Sansonetti.** 1987. *In vitro* model of penetration and intracellular growth of *Listeria monocytogenes* in the human enterocyte-like cell line Caco-2. *Infect Immun* **55**:2822-9.
56. **Garnak, M., and H. C. Reeves.** 1979. Phosphorylation of Isocitrate dehydrogenase of *Escherichia coli*. *Science* **203**:1111-2.
57. **Gellin, B. G., and C. V. Broome.** 1989. Listeriosis. *Jama* **261**:1313-20.

58. **Geoffroy, C., J. L. Gaillard, J. E. Alouf, and P. Berche.** 1987. Purification, characterization, and toxicity of the sulfhydryl-activated hemolysin listeriolysin O from *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun* **55**:1641-6.
59. **Glaser, P., L. Frangeul, C. Buchrieser, C. Rusniok, A. Amend, F. Baquero, P. Berche, H. Bloecker, P. Brandt, T. Chakraborty, A. Charbit, F. Chetouani, E. Couve, A. de Daruvar, P. Dehoux, E. Domann, G. Dominguez-Bernal, E. Duchaud, L. Durant, O. Dussurget, K. D. Entian, H. Fsihi, F. Garcia-del Portillo, P. Garrido, L. Gautier, W. Goebel, N. Gomez-Lopez, T. Hain, J. Hauf, D. Jackson, L. M. Jones, U. Kaerst, J. Kreft, M. Kuhn, F. Kunst, G. Kurapkat, E. Madueno, A. Maitournam, J. M. Vicente, E. Ng, H. Nedjari, G. Nordsiek, S. Novella, B. de Pablos, J. C. Perez-Diaz, R. Purcell, B. Rimmel, M. Rose, T. Schlueter, N. Simoes, A. Tierrez, J. A. Vazquez-Boland, H. Voss, J. Wehland, and P. Cossart.** 2001. Comparative genomics of *Listeria* species. *Science* **294**:849-52.
60. **Gouin, E., J. Mengaud, and P. Cossart.** 1994. The virulence gene cluster of *Listeria monocytogenes* is also present in *Listeria ivanovii*, an animal pathogen, and *Listeria seeligeri*, a nonpathogenic species. *Infect Immun* **62**:3550-3.
61. **Grangeasse, C., P. Doublet, E. Vaganay, C. Vincent, G. Deleage, B. Duclos, and A. J. Cozzone.** 1997. Characterization of a bacterial gene encoding an autophosphorylating protein tyrosine kinase. *Gene* **204**:259-65.
62. **Grangeasse, C., P. Doublet, C. Vincent, E. Vaganay, M. Riberty, B. Duclos, and A. J. Cozzone.** 1998. Functional characterization of the low-molecular-mass phosphotyrosine-protein phosphatase of *Acinetobacter johnsonii*. *J Mol Biol* **278**:339-47.
63. **Gray, M. L., and A. H. Killinger.** 1966. *Listeria monocytogenes* and listeric infections. *Bacteriol Rev* **30**:309-82.
64. **Greiffenberg, L., W. Goebel, K. S. Kim, J. Daniels, and M. Kuhn.** 2000. Interaction of *Listeria monocytogenes* with human brain microvascular endothelial cells: an electron microscopic study. *Infect Immun* **68**:3275-9.
65. **Hecker, M., and U. Volker.** 1998. Non-specific, general and multiple stress resistance of growth-restricted *Bacillus subtilis* cells by the expression of the sigmaB regulon. *Mol Microbiol* **29**:1129-36.
66. **Herro, R., S. Poncet, P. Cossart, C. Buchrieser, E. Gouin, P. Glaser, and J. Deutscher.** 2005. How seryl-phosphorylated HPr inhibits PrfA, a transcription activator of *Listeria monocytogenes* virulence genes. *J Mol Microbiol Biotechnol* **9**:224-34.
67. **Hof, H., T. Nichterlein, and M. Kretschmar.** 1997. Management of listeriosis. *Clin Microbiol Rev* **10**:345-57.
68. **Holm, L., C. Sander, H. Ruterjans, M. Schnarr, R. Fogh, R. Boelens, and R. Kaptein.** 1994. LexA repressor and iron uptake regulator from *Escherichia coli*: new members of the CAP-like DNA binding domain superfamily. *Protein Eng* **7**:1449-53.
69. **Hoper, D., U. Volker, and M. Hecker.** 2005. Comprehensive characterization of the contribution of individual SigB-dependent general stress genes to stress resistance of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **187**:2810-26.
70. **Ireton, K., B. Payraastre, H. Chap, W. Ogawa, H. Sakaue, M. Kasuga, and P. Cossart.** 1996. A role for phosphoinositide 3-kinase in bacterial invasion. *Science* **274**:780-2.
71. **Ireton, K., B. Payraastre, and P. Cossart.** 1999. The *Listeria monocytogenes* protein InlB is an agonist of mammalian phosphoinositide 3-kinase. *J Biol Chem* **274**:17025-32.
72. **Ivanov, I.** 1962. Untersuchungen über die Listeriose der Schafe in Bulgarien. *Monatsheft Veterinärmed.* **17**:729-736.
73. **Johansson, J., P. Mandin, A. Renzoni, C. Chiaruttini, M. Springer, and P. Cossart.** 2002. An RNA thermosensor controls expression of virulence genes in *Listeria monocytogenes*. *Cell* **110**:551-61.
74. **Jones, D.** 1990. Foodborne listeriosis. *Lancet* **336**:1171-4.
75. **Jones, D., and H.P.R. Seeliger.** 1992. The Genus *Listeria*. *The Prokaryotes Second Edition, A Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology,*

- Isolation, Identification, Applications. Balows, A., H.G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder, and K.-H. Schleider (eds.) Springer Verlag:**1595-1616.
76. **Jonquieres, R., H. Bierne, F. Fiedler, P. Gounon, and P. Cossart.** 1999. Interaction between the protein InlB of *Listeria monocytogenes* and lipoteichoic acid: a novel mechanism of protein association at the surface of gram-positive bacteria. *Mol Microbiol* **34**:902-14.
77. **Jonquieres, R., J. Pizarro-Cerda, and P. Cossart.** 2001. Synergy between the N- and C-terminal domains of InlB for efficient invasion of non-phagocytic cells by *Listeria monocytogenes*. *Mol Microbiol* **42**:955-65.
78. **Junttila, J. R., S. I. Niemela, and J. Hirn.** 1988. Minimum growth temperatures of *Listeria monocytogenes* and non-haemolytic *Listeria*. *J Appl Bacteriol* **65**:321-7.
79. **Kaniga, K., J. Uralil, J. B. Bliska, and J. E. Galan.** 1996. A secreted protein tyrosine phosphatase with modular effector domains in the bacterial pathogen *Salmonella typhimurium*. *Mol Microbiol* **21**:633-41.
80. **Kazmierczak, M. J., S. C. Mithoe, K. J. Boor, and M. Wiedmann.** 2003. *Listeria monocytogenes* sigma B regulates stress response and virulence functions. *J Bacteriol* **185**:5722-34.
81. **Kazmierczak, M. J., M. Wiedmann, and K. J. Boor.** 2006. Contributions of *Listeria monocytogenes* {sigma}B and PrfA to expression of virulence and stress response genes during extra- and intracellular growth. *Microbiology* **152**:1827-38.
82. **Kennelly, P. J.** 2002. Protein kinases and protein phosphatases in prokaryotes: a genomic perspective. *FEMS Microbiol Lett* **206**:1-8.
83. **Kennelly, P. J., and M. Potts.** 1996. Fancy meeting you here! A fresh look at "prokaryotic" protein phosphorylation. *J Bacteriol* **178**:4759-64.
84. **Kennelly, P. J., and M. Potts.** 1999. Life among the primitives: protein O-phosphatases in prokaryotes. *Front Biosci* **4**:D372-85.
85. **Kim, H., H. Marquis, and K. J. Boor.** 2005. SigmaB contributes to *Listeria monocytogenes* invasion by controlling expression of inlA and inlB. *Microbiology* **151**:3215-22.
86. **Kirstein, J., and K. Turgay.** 2005. A new tyrosine phosphorylation mechanism involved in signal transduction in *Bacillus subtilis*. *J Mol Microbiol Biotechnol* **9**:182-8.
87. **Kirstein, J., D. Zuhlke, U. Gerth, K. Turgay, and M. Hecker.** 2005. A tyrosine kinase and its activator control the activity of the CtsR heat shock repressor in *B. subtilis*. *Embo J* **24**:3435-45.
88. **Klose, J.** 1975. Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals. *Humangenetik* **26**:231-243.
89. **Klose, J., and U. Kobalz.** 1995. Two-dimensional electrophoresis of proteins: an updated protocol and implications for a functional analysis of the genome. *Electrophoresis* **16**:1034-59.
90. **Kocks, C., E. Guin, M. Tabouret, P. Berche, H. Ohayon, and P. Cossart.** 1992. *L. monocytogenes*-induced actin assembly requires the actA gene product, a surface protein. *Cell* **68**:521-31.
91. **Kocks, C., R. Hellio, P. Gounon, H. Ohayon, and P. Cossart.** 1993. Polarized distribution of *Listeria monocytogenes* surface protein ActA at the site of directional actin assembly. *J Cell Sci* **105 (Pt 3)**:699-710.
92. **Kohler, S., A. Bubert, M. Vogel, and W. Goebel.** 1991. Expression of the iap gene coding for protein p60 of *Listeria monocytogenes* is controlled on the posttranscriptional level. *J Bacteriol* **173**:4668-74.
93. **Kohler, S., M. Leimeister-Wachter, T. Chakraborty, F. Lottspeich, and W. Goebel.** 1990. The gene coding for protein p60 of *Listeria monocytogenes* and its use as a specific probe for *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun* **58**:1943-50.
94. **Kreft, J.** 1992. *Listeria monocytogenes* - ein Modell für fakultativ intrazelluläre Bakterien. *BioEng* **1**:65-70.
95. **Kreft, J., and J. A. Vazquez-Boland.** 2001. Regulation of virulence genes in *Listeria*. *Int J Med Microbiol* **291**:145-57.

96. **Kreft, J., J. A. Vazquez-Boland, S. Altrock, G. Dominguez-Bernal, and W. Goebel.** 2002. Pathogenicity islands and other virulence elements in *Listeria*. *Curr Top Microbiol Immunol* **264**:109-25.
97. **Kuhn, M., and W. Goebel.** 1989. Identification of an extracellular protein of *Listeria monocytogenes* possibly involved in intracellular uptake by mammalian cells. *Infect Immun* **57**:55-61.
98. **Kuhn, M., and W. Goebel.** 1995. Molecular studies on the virulence of *Listeria monocytogenes*. *Genet Eng (N Y)* **17**:31-51.
99. **Kuhn, M., S. Kathariou, and W. Goebel.** 1988. Hemolysin supports survival but not entry of the intracellular bacterium *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun* **56**:79-82.
100. **Lampidis, R., R. Gross, Z. Sokolovic, W. Goebel, and J. Kreft.** 1994. The virulence regulator protein of *Listeria ivanovii* is highly homologous to PrfA from *Listeria monocytogenes* and both belong to the Crp-Fnr family of transcription regulators. *Mol Microbiol* **13**:141-51.
101. **LaPorte, D. C., and D. E. Koshland, Jr.** 1982. A protein with kinase and phosphatase activities involved in regulation of tricarboxylic acid cycle. *Nature* **300**:458-60.
102. **Leblond-Francillard, M., J. L. Gaillard, and P. Berche.** 1989. Loss of catalase activity in Tn1545-induced mutants does not reduce growth of *Listeria monocytogenes in vivo*. *Infect Immun* **57**:2569-73.
103. **Lecuit, M.** 2005. Understanding how *Listeria monocytogenes* targets and crosses host barriers. *Clin Microbiol Infect* **11**:430-436.
104. **Lecuit, M., S. Dramsi, C. Gottardi, M. Fedor-Chaiken, B. Gumbiner, and P. Cossart.** 1999. A single amino acid in E-cadherin responsible for host specificity towards the human pathogen *Listeria monocytogenes*. *Embo J* **18**:3956-63.
105. **Lecuit, M., S. Vandormael-Pournin, J. Lefort, M. Huerre, P. Gounon, C. Dupuy, C. Babinet, and P. Cossart.** 2001. A transgenic model for listeriosis: role of internalin in crossing the intestinal barrier. *Science* **292**:1722-5.
106. **Leimeister-Wachter, M., E. Domann, and T. Chakraborty.** 1992. The expression of virulence genes in *Listeria monocytogenes* is thermoregulated. *J Bacteriol* **174**:947-52.
107. **Leimeister-Wachter, M., C. Haffner, E. Domann, W. Goebel, and T. Chakraborty.** 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**:8336-40.
108. **Li, Y., and W. R. Strohl.** 1996. Cloning, purification, and properties of a phosphotyrosine protein phosphatase from *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J Bacteriol* **178**:136-42.
109. **Lingnau, A., E. Domann, M. Hudel, M. Bock, T. Nichterlein, J. Wehland, and T. Chakraborty.** 1995. Expression of the *Listeria monocytogenes* EGD inlA and inlB genes, whose products mediate bacterial entry into tissue culture cell lines, by PrfA-dependent and -independent mechanisms. *Infect Immun* **63**:3896-903.
110. **Lorber, B.** 1997. Listeriosis. *Clin Infect Dis* **24**:1-9; quiz 10-1.
111. **Luo, Q., M. Herler, S. Muller-Altrock, and W. Goebel.** 2005. Supportive and inhibitory elements of a putative PrfA-dependent promoter in *Listeria monocytogenes*. *Mol Microbiol* **55**:986-97.
112. **Luo, Q., M. Rauch, K. M. A, S. Muller-Altrock, and W. Goebel.** 2004. *In vitro* transcription of the *Listeria monocytogenes* virulence genes inlC and mpl reveals overlapping PrfA-dependent and -independent promoters that are differentially activated by GTP. *Mol Microbiol* **52**:39-52.
113. **MacDonald, T. T., and P. B. Carter.** 1980. Cell-mediated immunity to intestinal infection. *Infect Immun* **28**:516-23.
114. **Mansell, A., L. Braun, P. Cossart, and L. A. O'Neill.** 2000. A novel function of InlB from *Listeria monocytogenes*: activation of NF-kappaB in J774 macrophages. *Cell Microbiol* **2**:127-36.
115. **Mansell, A., N. Khelef, P. Cossart, and L. A. O'Neill.** 2001. Internalin B activates nuclear factor-kappa B via Ras, phosphoinositide 3-kinase, and Akt. *J Biol Chem* **276**:43597-603.

116. **Marino, M., M. Banerjee, R. Jonquieres, P. Cossart, and P. Ghosh.** 2002. GW domains of the *Listeria monocytogenes* invasion protein InlB are SH3-like and mediate binding to host ligands. *Embo J* **21**:5623-34.
117. **Marino, M., L. Braun, P. Cossart, and P. Ghosh.** 1999. Structure of the InlB leucine-rich repeats, a domain that triggers host cell invasion by the bacterial pathogen *L. monocytogenes*. *Mol Cell* **4**:1063-72.
118. **Marks, F.** 1996. Protein phosphorylation. Ed. Marks, F., VCH publishers, NY:1-35.
119. **Mengaud, J., J. Chenevert, C. Geoffroy, J. L. Gaillard, and P. Cossart.** 1987. Identification of the structural gene encoding the SH-activated hemolysin of *Listeria monocytogenes*: listeriolysin O is homologous to streptolysin O and pneumolysin. *Infect Immun* **55**:3225-7.
120. **Mengaud, J., S. Dramsi, E. Gouin, J. A. Vazquez-Boland, G. Milon, and P. Cossart.** 1991. Pleiotropic control of *Listeria monocytogenes* virulence factors by a gene that is autoregulated. *Mol Microbiol* **5**:2273-83.
121. **Mengaud, J., M. F. Vicente, J. Chenevert, C. Geoffroy, F. Baquero, J. C. Perez-Diaz, and P. Cossart.** 1989. A genetic approach to demonstrate the role of listeriolysin O in the virulence of *Listeria monocytogenes*. *Acta Microbiol Hung* **36**:177-82.
122. **Mengaud, J., M. F. Vicente, and P. Cossart.** 1989. Transcriptional mapping and nucleotide sequence of the *Listeria monocytogenes* hlyA region reveal structural features that may be involved in regulation. *Infect Immun* **57**:3695-701.
123. **Michel, E., J. Mengaud, S. Galsworthy, and P. Cossart.** 1998. Characterization of a large motility gene cluster containing the cheR, motAB genes of *Listeria monocytogenes* and evidence that PrfA downregulates motility genes. *FEMS Microbiol Lett* **169**:341-7.
124. **Mijakovic, I., L. Musumeci, L. Tautz, D. Petranovic, R. A. Edwards, P. R. Jensen, T. Mustelin, J. Deutscher, and N. Bottini.** 2005. *In vitro* Characterization of the *Bacillus subtilis* Protein Tyrosine Phosphatase YwqE. *J Bacteriol* **187**:3384-90.
125. **Mijakovic, I., D. Petranovic, N. Bottini, J. Deutscher, and P. Ruhdal Jensen.** 2005. Protein-tyrosine phosphorylation in *Bacillus subtilis*. *J Mol Microbiol Biotechnol* **9**:189-97.
126. **Mijakovic, I., D. Petranovic, B. Macek, T. Cepo, M. Mann, J. Davies, P. R. Jensen, and D. Vujaklija.** 2006. Bacterial single-stranded DNA-binding proteins are phosphorylated on tyrosine. *Nucleic Acids Res* **34**:1588-96.
127. **Milohanic, E., P. Glaser, J. Y. Coppee, L. Frangeul, Y. Vega, J. A. Vazquez-Boland, F. Kunst, P. Cossart, and C. Buchrieser.** 2003. Transcriptome analysis of *Listeria monocytogenes* identifies three groups of genes differently regulated by PrfA. *Mol Microbiol* **47**:1613-25.
128. **Milohanic, E., R. Jonquieres, P. Cossart, P. Berche, and J. L. Gaillard.** 2001. The autolysin Ami contributes to the adhesion of *Listeria monocytogenes* to eukaryotic cells via its cell wall anchor. *Mol Microbiol* **39**:1212-24.
129. **Morona, J. K., R. Morona, D. C. Miller, and J. C. Paton.** 2002. *Streptococcus pneumoniae* capsule biosynthesis protein CpsB is a novel manganese-dependent phosphotyrosine-protein phosphatase. *J Bacteriol* **184**:577-83.
130. **Morona, J. K., J. C. Paton, D. C. Miller, and R. Morona.** 2000. Tyrosine phosphorylation of CpsD negatively regulates capsular polysaccharide biosynthesis in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol* **35**:1431-42.
131. **Mounier, J., A. Ryter, M. Coquis-Rondon, and P. J. Sansonetti.** 1990. Intracellular and cell-to-cell spread of *Listeria monocytogenes* involves interaction with F-actin in the enterocytelike cell line Caco-2. *Infect Immun* **58**:1048-58.
132. **Murray, E. G. D., R.A. Webb, and M.B.R. Swann.** 1926. A disease of rabbits characterised by large mononuclear leucocytosis, caused by a hitherto undescribed bacillus, *Bacterium monocytogenes* (n.sp.). *J Pathol Bacteriol* **29**:407-439.
133. **Musumeci, L., C. Bongiorno, L. Tautz, R. A. Edwards, A. Osterman, M. Perego, T. Mustelin, and N. Bottini.** 2005. Low-molecular-weight protein tyrosine phosphatases of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **187**:4945-56.
134. **Nelson, K. E., D. E. Fouts, E. F. Mongodin, J. Ravel, R. T. DeBoy, J. F. Kolonay, D. A. Rasko, S. V. Angiuoli, S. R. Gill, I. T. Paulsen, J. Peterson, O.**

- White, W. C. Nelson, W. Nierman, M. J. Beanan, L. M. Brinkac, S. C. Daugherty, R. J. Dodson, A. S. Durkin, R. Madupu, D. H. Haft, J. Selengut, S. Van Aken, H. Khouri, N. Fedorova, H. Forberger, B. Tran, S. Kathariou, L. D. Wonderling, G. A. Uhlich, D. O. Bayles, J. B. Luchansky, and C. M. Fraser.** 2004. Whole genome comparisons of serotype 4b and 1/2a strains of the food-borne pathogen *Listeria monocytogenes* reveal new insights into the core genome components of this species. *Nucleic Acids Res* **32**:2386-95.
135. **Niebuhr, K., T. Chakraborty, M. Rohde, T. Gazlig, B. Jansen, P. Kollner, and J. Wehland.** 1993. Localization of the ActA polypeptide of *Listeria monocytogenes* in infected tissue culture cell lines: ActA is not associated with actin "comets". *Infect Immun* **61**:2793-802.
136. **Nieman, R. E., and B. Lorber.** 1980. Listeriosis in adults: a changing pattern. Report of eight cases and review of the literature, 1968-1978. *Rev Infect Dis* **2**:207-27.
137. **Ninfa, E. G., and J. E. Dixon.** 1994. Protein tyrosine phosphatases in disease processes. *Trends Cell Biol* **4**:427-30.
138. **O'Farrell, P. H.** 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* **250**:4007-4021.
139. **Ofek, I., K. Kabha, A. Athamna, G. Frankel, D. J. Wozniak, D. L. Hasty, and D. E. Ohman.** 1993. Genetic exchange of determinants for capsular polysaccharide biosynthesis between *Klebsiella pneumoniae* strains expressing serotypes K2 and K21a. *Infect Immun* **61**:4208-16.
140. **Park, S. F., and G. S. Stewart.** 1990. High-efficiency transformation of *Listeria monocytogenes* by electroporation of penicillin-treated cells. *Gene* **94**:129-32.
141. **Peel, M., W. Donachie, and A. Shaw.** 1988. Temperature-dependent expression of flagella of *Listeria monocytogenes* studied by electron microscopy, SDS-PAGE and western blotting. *J Gen Microbiol* **134 (Pt 8)**:2171-8.
142. **Pirie, J. H. H.** 1940. *Listeria*: Change of name for the a genus of bacteria. *Nature* **145**:264.
143. **Pistor, S., T. Chakraborty, K. Niebuhr, E. Domann, and J. Wehland.** 1994. The ActA protein of *Listeria monocytogenes* acts as a nucleator inducing reorganization of the actin cytoskeleton. *Embo J* **13**:758-63.
144. **Poncet, S., I. Mijakovic, S. Nessler, V. Gueguen-Chaignon, V. Chaptal, A. Galinier, G. Boel, A. Maze, and J. Deutscher.** 2004. HPr kinase/phosphorylase, a Walker motif A-containing bifunctional sensor enzyme controlling catabolite repression in Gram-positive bacteria. *Biochim Biophys Acta* **1697**:123-35.
145. **Portnoy, D. A., T. Chakraborty, W. Goebel, and P. Cossart.** 1992. Molecular determinants of *Listeria monocytogenes* pathogenesis. *Infect Immun* **60**:1263-7.
146. **Poyart, C., E. Abachin, I. Razafimanantsoa, and P. Berche.** 1993. The zinc metalloprotease of *Listeria monocytogenes* is required for maturation of phosphatidylcholine phospholipase C: direct evidence obtained by gene complementation. *Infect Immun* **61**:1576-80.
147. **Preneta, R., S. Jarraud, C. Vincent, P. Doublet, B. Duclos, J. Etienne, and A. J. Cozzone.** 2002. Isolation and characterization of a protein-tyrosine kinase and a phosphotyrosine-protein phosphatase from *Klebsiella pneumoniae*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* **131**:103-12.
148. **Racz, P., K. Tenner, and E. Mero.** 1972. Experimental *Listeria enteritis*. I. An electron microscopic study of the epithelial phase in experimental *Listeria* infection. *Lab Invest* **26**:694-700.
149. **Raffelsbauer, D., A. Bubert, F. Engelbrecht, J. Scheinpflug, A. Simm, J. Hess, S. H. Kaufmann, and W. Goebel.** 1998. The gene cluster *inlC2DE* of *Listeria monocytogenes* contains additional new internalin genes and is important for virulence in mice. *Mol Gen Genet* **260**:144-58.
150. **Ramponi, G., and M. Stefani.** 1997. Structure and function of the low Mr phosphotyrosine protein phosphatases. *Biochim Biophys Acta* **1341**:137-56.
151. **Rauch, M., Q. Luo, S. Muller-Altrock, and W. Goebel.** 2005. SigB-dependent *in vitro* transcription of *prfA* and some newly identified genes of *Listeria monocytogenes* whose expression is affected by PrfA *in vivo*. *J Bacteriol* **187**:800-4.

152. **Raveneau, J., C. Geoffroy, J. L. Beretti, J. L. Gaillard, J. E. Alouf, and P. Berche.** 1992. Reduced virulence of a *Listeria monocytogenes* phospholipase-deficient mutant obtained by transposon insertion into the zinc metalloprotease gene. *Infect Immun* **60**:916-21.
153. **Reizer, J., C. Hoischen, F. Titgemeyer, C. Rivolta, R. Rabus, J. Stulke, D. Karamata, M. H. Saier, Jr., and W. Hillen.** 1998. A novel protein kinase that controls carbon catabolite repression in bacteria. *Mol Microbiol* **27**:1157-69.
154. **Ripio, M. T., K. Brehm, M. Lara, M. Suarez, and J. A. Vazquez-Boland.** 1997. Glucose-1-phosphate utilization by *Listeria monocytogenes* is PrfA dependent and coordinately expressed with virulence factors. *J Bacteriol* **179**:7174-80.
155. **Ripio, M. T., G. Dominguez-Bernal, M. Lara, M. Suarez, and J. A. Vazquez-Boland.** 1997. A Gly145Ser substitution in the transcriptional activator PrfA causes constitutive overexpression of virulence factors in *Listeria monocytogenes*. *J Bacteriol* **179**:1533-40.
156. **Ripio, M. T., G. Dominguez-Bernal, M. Suarez, K. Brehm, P. Berche, and J. A. Vazquez-Boland.** 1996. Transcriptional activation of virulence genes in wild-type strains of *Listeria monocytogenes* in response to a change in the extracellular medium composition. *Res Microbiol* **147**:371-84.
157. **Ripio, M. T., J. A. Vazquez-Boland, Y. Vega, S. Nair, and P. Berche.** 1998. Evidence for expressional crosstalk between the central virulence regulator PrfA and the stress response mediator ClpC in *Listeria monocytogenes*. *FEMS Microbiol Lett* **158**:45-50.
158. **Rocourt, J., H. Hof, A. Schrettenbrunner, R. Malinverni, and J. Bille.** 1986. [Acute purulent *Listeria seelingeri* meningitis in an immunocompetent adult]. *Schweiz Med Wochenschr* **116**:248-51.
159. **Sanger, J. M., J. W. Sanger, and F. S. Southwick.** 1992. Host cell actin assembly is necessary and likely to provide the propulsive force for intracellular movement of *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun* **60**:3609-19.
160. **Sau, S., N. Bhasin, E. R. Wann, J. C. Lee, T. J. Foster, and C. Y. Lee.** 1997. The *Staphylococcus aureus* allelic genetic loci for serotype 5 and 8 capsule expression contain the type-specific genes flanked by common genes. *Microbiology* **143 (Pt 7)**:2395-405.
161. **Schubert, W. D., G. Gobel, M. Diepholz, A. Darji, D. Kloer, T. Hain, T. Chakraborty, J. Wehland, E. Domann, and D. W. Heinz.** 2001. Internalins from the human pathogen *Listeria monocytogenes* combine three distinct folds into a contiguous internalin domain. *J Mol Biol* **312**:783-94.
162. **Schubert, W. D., C. Urbanke, T. Ziehm, V. Beier, M. P. Machner, E. Domann, J. Wehland, T. Chakraborty, and D. W. Heinz.** 2002. Structure of internalin, a major invasion protein of *Listeria monocytogenes*, in complex with its human receptor E-cadherin. *Cell* **111**:825-36.
163. **Schuchat, A., B. Swaminathan, and C. V. Broome.** 1991. Epidemiology of human listeriosis. *Clin Microbiol Rev* **4**:169-83.
164. **Seeliger, H. P. R.** 1961. *Listeriosis*. 2nd ed.- Karger, Basel.
165. **Seeliger, H. P. R., and D. Jones.** 1986. Genus *Listeria*. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Vol. 2:1235-1245.
166. **Sheehan, B., C. Kocks, S. Dramsi, E. Gouin, A. D. Klarsfeld, J. Mengaud, and P. Cossart.** 1994. Molecular and genetic determinants of the *Listeria monocytogenes* infectious process. *Curr Top Microbiol Immunol* **192**:187-216.
167. **Shen, Y., M. Naujokas, M. Park, and K. Ireton.** 2000. InIB-dependent internalization of *Listeria* is mediated by the Met receptor tyrosine kinase. *Cell* **103**:501-10.
168. **Shi, L., M. Potts, and P. J. Kennelly.** 1998. The serine, threonine, and/or tyrosine-specific protein kinases and protein phosphatases of prokaryotic organisms: a family portrait. *FEMS Microbiol Rev* **22**:229-53.
169. **Smith, G. A., D. A. Portnoy, and J. A. Theriot.** 1995. Asymmetric distribution of the *Listeria monocytogenes* ActA protein is required and sufficient to direct actin-based motility. *Mol Microbiol* **17**:945-51.

170. **Sokolovic, Z., A. Fuchs, and W. Goebel.** 1990. Synthesis of species-specific stress proteins by virulent strains of *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun* **58**:3582-7.
171. **Sokolovic, Z., J. Riedel, M. Wuenscher, and W. Goebel.** 1993. Surface-associated, PrfA-regulated proteins of *Listeria monocytogenes* synthesized under stress conditions. *Mol Microbiol* **8**:219-27.
172. **Stock, J. B., M. G. Surette, W. R. McCleary, and A. M. Stock.** 1992. Signal transduction in bacterial chemotaxis. *J Biol Chem* **267**:19753-6.
173. **Suarez, M., B. Gonzalez-Zorn, Y. Vega, I. Chico-Calero, and J. A. Vazquez-Boland.** 2001. A role for ActA in epithelial cell invasion by *Listeria monocytogenes*. *Cell Microbiol* **3**:853-64.
174. **Sue, D., K. J. Boor, and M. Wiedmann.** 2003. sigma(B)-dependent expression patterns of compatible solute transporter genes *opuCA* and *lmo1421* and the conjugated bile salt hydrolase gene *bsh* in *Listeria monocytogenes*. *Microbiology* **149**:3247-56.
175. **Sue, D., D. Fink, M. Wiedmann, and K. J. Boor.** 2004. sigmaB-dependent gene induction and expression in *Listeria monocytogenes* during osmotic and acid stress conditions simulating the intestinal environment. *Microbiology* **150**:3843-55.
176. **Theriot, J. A., T. J. Mitchison, L. G. Tilney, and D. A. Portnoy.** 1992. The rate of actin-based motility of intracellular *Listeria monocytogenes* equals the rate of actin polymerization. *Nature* **357**:257-60.
177. **Theriot, J. A., J. Rosenblatt, D. A. Portnoy, P. J. Goldschmidt-Clermont, and T. J. Mitchison.** 1994. Involvement of profilin in the actin-based motility of *L. monocytogenes* in cells and in cell-free extracts. *Cell* **76**:505-17.
178. **Tilney, L. G., and D. A. Portnoy.** 1989. Actin filaments and the growth, movement, and spread of the intracellular bacterial parasite, *Listeria monocytogenes*. *J Cell Biol* **109**:1597-608.
179. **van Schaik, W., and T. Abee.** 2005. The role of sigmaB in the stress response of Gram-positive bacteria -- targets for food preservation and safety. *Curr Opin Biotechnol* **16**:218-24.
180. **Vazquez-Boland, J. A., G. Dominguez-Bernal, B. Gonzalez-Zorn, J. Kreft, and W. Goebel.** 2001. Pathogenicity islands and virulence evolution in *Listeria*. *Microbes Infect* **3**:571-84.
181. **Vazquez-Boland, J. A., C. Kocks, S. Dramsi, H. Ohayon, C. Geoffroy, J. Mengaud, and P. Cossart.** 1992. Nucleotide sequence of the lecithinase operon of *Listeria monocytogenes* and possible role of lecithinase in cell-to-cell spread. *Infect Immun* **60**:219-30.
182. **Vega, Y., C. Dickneite, M. T. Ripio, R. Bockmann, B. Gonzalez-Zorn, S. Novella, G. Dominguez-Bernal, W. Goebel, and J. A. Vazquez-Boland.** 1998. Functional similarities between the *Listeria monocytogenes* virulence regulator PrfA and cyclic AMP receptor protein: the PrfA* (Gly145Ser) mutation increases binding affinity for target DNA. *J Bacteriol* **180**:6655-60.
183. **Vega, Y., M. Rauch, M. J. Banfield, S. Ermolaeva, M. Scotti, W. Goebel, and J. A. Vazquez-Boland.** 2004. New *Listeria monocytogenes* prfA* mutants, transcriptional properties of PrfA* proteins and structure-function of the virulence regulator PrfA. *Mol Microbiol* **52**:1553-65.
184. **Vincent, C., P. Doublet, C. Grangeasse, E. Vaganay, A. J. Cozzone, and B. Duclos.** 1999. Cells of *Escherichia coli* contain a protein-tyrosine kinase, Wzc, and a phosphotyrosine-protein phosphatase, Wzb. *J Bacteriol* **181**:3472-7.
185. **Vincent, C., B. Duclos, C. Grangeasse, E. Vaganay, M. Riberty, A. J. Cozzone, and P. Doublet.** 2000. Relationship between exopolysaccharide production and protein-tyrosine phosphorylation in gram-negative bacteria. *J Mol Biol* **304**:311-21.
186. **Walker, S. J., and F. Stringer.** 1987. Growth of *Listeria monocytogenes* and *Aeromonas hydrophila* at chill temperatures. *Journal of Applied Bacteriology* **63**:R20.
187. **Welch, M. D., A. Iwamatsu, and T. J. Mitchison.** 1997. Actin polymerization is induced by Arp2/3 protein complex at the surface of *Listeria monocytogenes*. *Nature* **385**:265-9.

188. **Welch, M. D., J. Rosenblatt, J. Skoble, D. A. Portnoy, and T. J. Mitchison.** 1998. Interaction of human Arp2/3 complex and the *Listeria monocytogenes* ActA protein in actin filament nucleation. *Science* **281**:105-8.
189. **Williams, T., B. Joseph, D. Beier, W. Goebel, and M. Kuhn.** 2005. Response regulator DegU of *Listeria monocytogenes* regulates the expression of flagella-specific genes. *FEMS Microbiol Lett.*
190. **Wouters, J. A., T. Hain, A. Darji, E. Hufner, H. Wemekamp-Kamphuis, T. Chakraborty, and T. Abee.** 2005. Identification and Characterization of Di- and Tripeptide Transporter DtpT of *Listeria monocytogenes* EGD-e. *Appl Environ Microbiol* **71**:5771-8.
191. **Wuenscher, M. D., S. Kohler, A. Bubert, U. Gerike, and W. Goebel.** 1993. The *iap* gene of *Listeria monocytogenes* is essential for cell viability, and its gene product, p60, has bacteriolytic activity. *J Bacteriol* **175**:3491-501.
192. **Wuenscher, M. D., S. Kohler, W. Goebel, and T. Chakraborty.** 1991. Gene disruption by plasmid integration in *Listeria monocytogenes*: insertional inactivation of the listeriolysin determinant *lisA*. *Mol Gen Genet* **228**:177-82.
193. **Zhang, C. C.** 1996. Bacterial signalling involving eukaryotic-type protein kinases. *Mol Microbiol* **20**:9-15.
194. **Zhou, G., J. M. Denu, L. Wu, and J. E. Dixon.** 1994. The catalytic role of Cys124 in the dual specificity phosphatase VHR. *J Biol Chem* **269**:28084-90.

8 Anhang

8.1 Chromosomale Organisation von Ptp-1

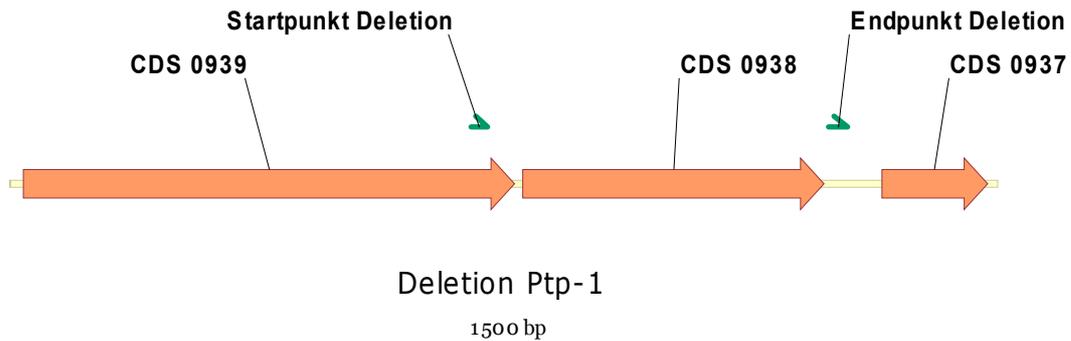


Abb. 34: Lage der Deletion inkl. Start- und Endpunkten in $\Delta ptp-1$

8.2 Proteinsequenz Ptp-1

```
MVKVVFVCLGNICRSPMAEGLFRKEVANAGLTDEIKIDSAAATGTWNLGKPPHRGTQEVLK
KHGVDYQAMRARKISDADFKEADFIIGMDQQNLADLNALNNNPDVIIRSLMSFVSGQEDK
DIPDPYYTGDFDETERMVTEGVKALLAYITKK
```

8.3 Chromosomale Organisation von Ptp-2

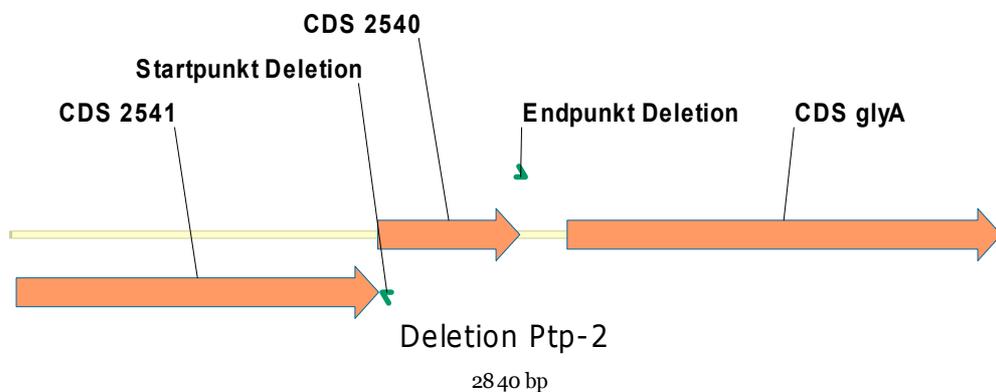


Abb. 35: Lage der Deletion inkl. Start- und Endpunkten in $\Delta ptp-2$

8.4 Proteinsequenz Ptp-2

MNVLFVCTGNTCRSPLAEKILQNLRPDLDVRSAGTRALNGDAISENSRQILAQMNLPTTH
 QAKKITEADIDWADQIYVMTQNHQAEKLSLFPKENDKIQLISEEKTDIPDPYGGSEIQYE
 ITYYELKSAISERFL

8.5 Abkürzungen

A	Adenosin
Abb.	Abbildung
ActA/ <i>actA</i>	Aktin-bindender Faktor A/-Gen
Amp	Ampicillin
Amp ^R	Ampicillinresistenz
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosintriphosphat
<i>B.</i>	<i>Bacillus</i>
BHI	Brain Heart Infusion
bp	Basenpaare
BPB	Bromphenolblau
BSA	Bovine Serum Albumine (Rinderserumalbumin)
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
ca.	circa
cDNA	komplementäre DNA
CIP	Calf Intestinal Phosphatase
Cm	Chloramphenicol
Cm ^R	Chloramphenicolresistenz
Da	Dalton
dco	„double crossover“
DEPC	Diethylpyrocarbonat
deion.	deionisiert
dest.	destilliert
d.h.	das heißt
DMFA	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP's	Desoxyribonukleosidtriphosphate
ds	doppelsträngig
DTT	Dithiothreitol
<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Em	Erythromycin
Em ^R	Erythromycinresistenz

et al.	und andere
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
evtl.	eventuell
F-Aktin	filamentöses Aktin
g	Gramm
G	Guanosin
G-Aktin	globuläres Aktin
h	Stunde
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinethansulfonsäure
HSPG	Heparansulfat-Proteoglykane
i.d.R.	in der Regel
InIA/ <i>inIA</i>	Internalin A/-Gen
IPTG	Isopropyl- β -D-Thiogalaktosid
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
KE	Klett-Einheiten
Km	Kanamycin
kV	Kilovolt
l	Liter
<i>L.</i>	<i>Listeria</i>
LB	Luria-Bertani
<i>ldh</i>	Lactatdehydrogenase-Gen
LLO/ <i>hly</i>	Listeriolysin O/-Gen
log.	logarithmisch
LRR's	Leucin-reiche Repeats
Lsg.	Lösung
LZZ	Lebendzellzahl
μ	mikro (10^{-6})
m	milli (10^{-3})
M	Molar
MCS	Multiple Cloning Site
MEM	Minimum Essential Medium
min.	Minute
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
Mpl/ <i>mpl</i>	Metalloprotease/-Gen
mRNA	Messenger RNA
MW	Molekulargewicht
n	nano (10^{-9})
N	Normal
OD...	optische Dichte bei ... nm
o.g.	oben genannt
ORF	Open Reading Frame
p	pico (10^{-12})
p60/ <i>iap</i>	60 kDa-Protein/-Gen
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PC-PLC/ <i>plcB</i>	Phosphatidylcholin-spezifische Phospholipase C/-Gen
PCR	Polymerase Chain Reaction
PNK	Polynukleotidkinase
PrfA/ <i>prfA</i>	Positiver Regulationsfaktor A/-Gen

<i>prs</i>	Phosphoribosyl-Pyrophosphat-Synthetase-Gen
Ptp-1	Protein-Tyrosin-Phosphatase 1
Ptp-2	Protein-Tyrosin-Phosphatase 2
PTP	Protein-Tyrosin-Phosphatase
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
<i>rpoB</i>	RNA-Polymerase (β -Untereinheit)
RT	Raumtemperatur; Reverse Transkription
s	Sekunde
s.	siehe
sco	„single crossover“
SDS	Natriumdodecylsulfat
s.o.	siehe oben
SOD/ <i>sod</i>	Superoxiddismutase/-Gen
sog.	So genannt
ss	einzelsträngig
s.u.	siehe unten
Sv	Serovar
T	Thymidin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TEMED	Tetramethylethyldiamin
T_m	Schmelztemperatur
Tris	Tetramethyl Rhodamine Isocyanat
U	Unit (Einheit)
u.a.	unter anderem
ÜN	über Nacht
ÜNK	Übernachtkultur
UV	Ultraviolett
vgl.	vergleiche
Vol.	Volumen
v/v	„volume to volume“
W	Watt
w/v	„weight to volume“
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

Lebenslauf

Persönliche Daten: Barbara Gareiß, geb. Burkhardt

geb. am 13. September 1976 in Stuttgart, verheiratet, deutsch

Schule: **06/1996** Hochschulreife am Albert-Schweitzer-Gymnasium, Leonberg

**Hochschul-
Ausbildung:** **11/1996–05/2002** Studium der Biologie an der Julius-Maximilians-
Universität Würzburg mit dem Abschluss

Diplom Biologin Univ.

- Mikrobiologie (Hauptfach)
- Biochemie (1. Nebenfach)
- Humangenetik (2. Nebenfach)

05/2001–05/2002 Anfertigung der Diplomarbeit

Diplomarbeit

- Der Flagellen-Exportapparat – mögliche Rolle in der Virulenz von *L. monocytogenes* u. Charakterisierung eines für Säuretoleranzgene codierenden Chromosomenabschnittes von *L. monocytogenes*

Doktorarbeit: **06/2002-04/2006** Anfertigung der Dissertation am Lehrstuhl für
Mikrobiologie

Dissertation

- Einfluss niedermolekularer Protein-Tyrosin-Phosphatasen von *L. monocytogenes* auf die listerielle Genexpression und Virulenz

Würzburg, den 1. August 2006