
BAYERISCHE JULIUS-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT WÜRZBURG
FAKULTÄT FÜR BIOLOGIE
LEHRSTUHL FÜR MIKROBIOLOGIE

**Einfluss des Kohlenstoff-Metabolismus auf die Aktivität des
Virulenzfaktors PrfA von *Listeria monocytogenes***



DISSERTATION

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

vorgelegt von
Sonja Mertins
aus München

Würzburg, Juni 2008

Vielen Dank!

Hiermit bedanke ich mich bei allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Bedanken möchte ich mich vor allem bei Herrn Prof. Dr. W. Goebel für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes in seinem Lehrstuhl sowie für sein großes Interesse an dieser Arbeit.

Auch danke ich Herrn Prof. Dr. R. Benz für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Meinen LaborkollegInnen Dr. Stefanie Müller-Altrock, Regina Stoll, Norman Mauder und Dr. Biju Joseph danke ich für die hilfsbereite Atmosphäre im Labor und im Postdoc-Zimmer. Sie hatten in jeder noch so hektischen Situation ein offenes Ohr für meine Fragen und haben mit ihrem fachlichen Wissen sowie praktischen Tipps und Ratschlägen mich bei der Durchführung dieser Arbeit unterstützt.

Bedanken möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Instituts, die in irgendeiner Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben und mir mit Rat und Tat zur Seite standen.

Danke an Frau Seibrecher und Frau Stapf in unserer Spülküche und natürlich auch an „Ellen“, für den bewältigten bürokratischen Aufwand, den meine Vertragsverlängerungen so mitgebracht haben. Ein besonderer Dank gilt der „Mensa-Gruppe“, deren Zusammensetzung sich ständig geändert hat und immer für interessante und lustige Gesprächsthemen sorgte.

Ein spezielles Dankeschön geht an Daniela Löffler, Kristina Keidel, Melanie Lechner, und Regina Stoll für das Korrekturlesen, die Diskussionsbereitschaft und ihre wissenschaftlichen aber auch persönlichen Aufmunterungen.

Ein großes Dankeschön gilt natürlich auch meinen Eltern sowie meiner Familie, die mich in jeglicher Hinsicht mit allen Kräften unterstützt haben.

Ein herzliches Dankeschön geht an meinen Ehemann Pascal, der mir während der gesamten Doktorarbeit liebevolle Unterstützung gab.

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
1	Summary	4
2	Einleitung	7
2.1	Allgemeine Mikrobiologie von Listerien	7
2.2	Pathogenese	8
2.3	Intrazellulärer Infektionszyklus und Virulenzfaktoren von <i>L. monocytogenes</i>	9
2.3.1	Ein Überblick über den Infektionszyklus.....	10
2.3.2	Adhäsion und Invasion in eukaryotische Zelle	12
2.3.3	Überleben im - und Entkommen aus dem primären Phagosom.....	15
2.3.4	Vermehrung und Verbreitung im Zytoplasma	17
2.3.5	Zell-zu-Zell-Ausbreitung.....	19
2.3.6	Neue Virulenzfaktoren in <i>Listeria monocytogenes</i>	20
2.4	Organisation der Virulenzgene von <i>Listeria monocytogenes</i>	21
2.5	Regulation der Virulenzgenexpression	22
2.5.1	PrfA-abhängige Promotoren.....	22
2.5.2	PrfA – der zentrale Regulator der Virulenzgene in <i>L. monocytogenes</i>	23
2.5.3	Regulation der <i>prfA</i> -Synthese	25
2.5.4	Einfluss von Umweltfaktoren auf die Virulenzgenexpression.....	25
2.6	Das bakterielle Phosphoenolpyruvat-Phosphotransferase-System (PEP-PTS)	27
2.6.1	Komponenten des bakteriellen PEP-PTS	28
2.6.2	Nicht-PTS-abhängiger Transport von Glycerin	29
2.6.3	Das Dihydroxyaceton (Dha)-PTS – die Dha-Kinase	32
2.7	Kohlenstoff-Katabolitrepression (KKR)	33
2.7.1	Katabolitrepression in Gram-negativen Bakterien	34
2.7.2	Katabolitrepression in Gram-positiven Bakterien.....	36
2.7.3	Komponenten der Kohlenstoff-Katabolitrepression (KKR): HPr, HPrK/P, CcpA und <i>cre</i> -Box.....	38
2.8	Zielsetzung	41
3	Material	42
3.1	Geräte	42
3.2	Verbrauchsmaterial	43
3.3	Medien und Agarplatten	43
3.4	Antibiotika	44
3.5	Plasmide	45
3.6	Bakterienstämme	46
3.7	Oligonukleotide	47
3.8	Eukaryotische Zelltypen	50
3.9	Kits	50
3.10	Molekulargewichtsstandard	50

3.10.1	Molekulargewichtsmarker für DNA	50
3.10.2	Molekulargewichtsmarker für Proteine.....	50
4	Methoden.....	52
4.1	Molekulargenetische Methoden	52
4.1.1	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	52
4.1.2	Reinigung von DNA/PCR-Produkten und Verdau.....	52
4.1.3	Konzentrationsbestimmung von DNA	52
4.1.4	Elektrophoretische Auftrennung von DNA.....	53
4.1.5	Polymerase Chain Reaction (PCR)	54
4.1.6	Restriktionsverdau von DNA	56
4.1.7	Ligation von DNA-Fragmenten	57
4.1.8	Transformation in <i>E. coli</i>	57
4.1.9	Elektroporation in Listerien.....	58
4.1.10	Mutagenese durch homologe Rekombination (Wuenschel <i>et al.</i> , 1991)	59
4.1.11	DNA-Sequenzierung	60
4.1.12	Herstellung von Glycerinkulturen	60
4.1.13	RNA-Isolierung aus <i>Listeria monocytogenes</i>	60
4.1.14	DNase-Behandlung mit DNA-free™ Kit von Ambion.....	62
4.1.15	Konzentrationsbestimmung von RNA	62
4.1.16	Reverse Transkription von RNA für die Real-time RT-PCR.....	62
4.1.17	Quantitative Real-time RT-PCR (RT-PCR).....	63
4.2	Arbeiten mit Bakterien	65
4.2.1	Untersuchung des Wachstumsverhaltens von <i>Listeria monocytogenes</i>	65
4.2.2	Anzucht von Listerien in XAD-4-haltigem Medium	65
4.2.3	Überführungs-Experiment mit <i>Listeria monocytogenes</i>	65
4.2.4	Messung der [¹⁴ C]-Glukose-Aufnahme in <i>Listeria monocytogenes</i>	66
4.3	Methoden zur Aufreinigung und Analyse von Proteinen.....	66
4.3.1	TCA-Fällung von Überstandsproteinen	66
4.3.2	Herstellung von bakteriellen Zellextrakten	67
4.3.3	Proteinbestimmung nach Bradford.....	67
4.3.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	68
4.3.5	Native Polyacrylamidgelelektrophorese (native-PAGE)	69
4.3.6	Bestimmung der HPr-Phosphorylierungs-Zustände in <i>Listeria monocytogenes</i> (Halbedel & Stülke, 2005, Huynh <i>et al.</i> , 2000).....	70
4.3.7	Coomassiefärbung von Polyacrylamidgelen	71
4.3.8	Proteinanalyse im Western Blot	71
4.3.9	Spektralphotometrischer Hämolyse-Assay	73
4.4	Microarray-Assay.....	73
4.4.1	Herstellung der Sonden	74
4.4.2	Hybridisierung.....	75
4.4.3	Scannen und Auswertung.....	76
4.5	Arbeiten mit J744 Makrophagen.....	76
4.5.1	Auftauen und Einfrieren von J744 Makrophagen	77

4.5.2	Subkultivierung von J744 Makrophagen	77
4.5.3	Bestimmung der Lebendzellzahl (LZZ)	78
4.5.4	Herstellung von Infektionsaliquots	78
4.5.5	Infektion mit <i>Listeria monocytogenes</i>	78
5	Ergebnisse	80
5.1	Untersuchung der Katabolitrepression in <i>L. monocytogenes</i> in Hinblick auf die PrfA-Regulation	80
5.1.1	Überprüfung der pLSV101SM1-3 Vektorinsertion in Genen der Katabolitrepression (<i>ccpA</i> , <i>hprk</i> und <i>ptsH</i>)	80
5.1.2	Einfluss der Vektorinsertion pSM1-3 auf das Wachstum	85
5.1.3	Untersuchung der <i>::ccpA</i> -, <i>::hprK</i> - und <i>::ptsH</i> -Mutanten in ihrer Virulenzgenexpression	87
5.1.4	Gesamtgenom-Transkriptom-Analysen der <i>::ccpA</i> und <i>::hprK</i> -Insertionsmutanten	93
5.1.5	Invasion und intrazelluläre Replikation der <i>::ptsH</i> -Insertionsmutante	94
5.2	Untersuchung der Korrelation zwischen PrfA-Aktivität und HPr-Phosphorylierung in Minimalmedium mit verschiedenen Kohlenstoffquellen	96
5.2.1	Wachstum in Minimalmedium mit Glukose, Cellobiose, Glycerin und Glukose-6-Phosphat als Kohlenstoffquelle	96
5.2.2	Einfluss der Glukose-, Cellobiose-, Glycerin- und Glukose-6-Phosphat-Verwertung auf die PrfA-abhängige Virulenzgenexpression	99
5.2.3	HPr-Phosphorylierungszustände in Minimalmedium mit Glukose, Cellobiose, Glycerin und Glukose-6-Phosphat als Kohlenstoffquelle	106
5.2.4	Herstellung der <i>uhpT</i> -Deletionsmutante ($\Delta uhpT$)	109
5.2.5	Gesamtgenom-Transkriptom-Analyse von <i>L. monocytogenes</i> EGD-e, gewachsen in LB-Medium mit Glukose-6-Phosphat	110
5.3	Charakterisierung der Glukose-spezifischen Enzym IIA (<i>eIIA</i>^{Glc})-Deletionsmutante in <i>L. monocytogenes</i>	114
5.3.1	Herstellung der <i>eIIA</i> ^{Glc} -Deletionsmutante ($\Delta lmo1017$)	114
5.3.2	Untersuchung des Wachstums der $\Delta eIIA$ ^{Glc} -Mutante mit den verschiedene Kohlenstoffquellen: Glukose, Glycerin, Cellobiose und Mannose	116
5.3.3	Untersuchung der PrfA-abhängigen Virulenzgenexpression in der $\Delta eIIA$ ^{Glc} -Mutante	117
5.4	Untersuchung des C3-Metabolismus in <i>L. monocytogenes</i>	119
5.4.1	Wachstum von <i>L. monocytogenes</i> auf verschiedenen C3-Quellen: Glycerin, Glycerin-3-Phosphat, Dihydroxyaceton und Pyruvat	119
5.4.2	Transkriptom-Studien von <i>L. monocytogenes</i> nach dem Wachstum in Glycerin-haltigem Medium	123
5.4.3	Herstellung von Deletionsmutanten im Glycerin-Metabolismus in <i>L. monocytogenes</i>	125
5.4.4	Charakterisierung der Glycerin-Metabolismus-Deletionsmutanten in Bezug auf Wachstum und PrfA-Aktivität	126

5.4.5	Intrazelluläre Replikation der Deletionsmutanten im Glycerin-Metabolismus ..	128
6	Diskussion.....	128
6.1	Charakterisierung der <i>Listeria monocytogenes</i> ::<i>ccpA</i>-, ::<i>hprK</i>- und ::<i>ptsH</i>-	
	Insertionsmutanten	130
6.1.1	Gesamtgenom-Transkriptom-Analysen der :: <i>ccpA</i> - und :: <i>hprK</i> -Insertionsmutanten	132
6.1.2	Virulenzgenexpression der :: <i>ccpA</i> -, :: <i>hprK</i> - und :: <i>ptsH</i> -Insertionsmutanten.....	133
6.2	Einfluss der Kohlenstoff-Katabolitrepression auf die PrfA-abhängige	
	Virulenzgenexpression in <i>L. monocytogenes</i>	136
6.2.1	Untersuchung der HPr-Phosphorylierungsmuster und der PrfA-Aktivität in Glukose-, Cellobiose- und Glycerin-haltigem Minimalmedium.....	137
6.3	Einfluss der Phosphoenolpyruvat-Phosphotransferase-Systeme auf die PrfA-	
	Aktivität.....	139
6.4	Die Glukose-6-Phosphat-Verwertung in <i>L. monocytogenes</i>	143
6.4.1	Wachstum in Glukose-6-Phosphat-haltigem Medium	143
6.4.2	Einfluss der G6P-Verwertung auf die PrfA-abhängige Virulenzgenexpression.	145
6.4.3	Einfluss der Glukose-6-Phosphat-Verwertung auf die Kohlenstoff- Katabolitrepression.....	147
6.5	C3-Metabolismus in <i>Listeria monocytogenes</i>	151
6.5.1	Die Verwertung verschiedener C3-Quellen	151
6.5.2	Charakterisierung des Glycerin-Metabolismus in <i>L. monocytogenes</i>	154
6.5.3	Verwertbare Kohlenstoffquelle im Zytoplasma der Wirtszelle	157
7	Literatur	156
8	Anhang.....	179
8.1	Gesamtgenom-Transkriptom-Daten	179
8.2	ClustalW Alignments	194
8.3	Abkürzungsverzeichnis.....	196
9	Curriculum vitae	200

1 Zusammenfassung

Listeria monocytogenes gehört zu den Gram-positiven fakultativ intrazellulären Bakterien, ist aber auch zu einem saprophytischen Leben in freier Natur fähig. Zahlreiche, umfassend charakterisierte Virulenzfaktoren sind für die verschiedenen Schritte im Infektionszyklus von *L. monocytogenes* erforderlich: InlA und InlB induzieren die Aufnahme von *L. monocytogenes* in nicht-phagozytische Zellen, LLO und PlcA sind für die Freisetzung aus dem primären Phagosom, ActA für die Zell-zu-Zell-Ausbreitung und LLO zusammen mit PlcA und vor allem PlcB für die Freisetzung der Listerien aus dem sekundären Phagosom erforderlich. Der Hexose-Phosphat-Transporter UhpT ist teilweise für die Vermehrung von *L. monocytogenes* im Zytosol der infizierten Wirtszelle verantwortlich. Die Gene, die für diese Virulenzfaktoren kodieren, sind größtenteils in dem 9,6 kb-großen Virulenzgencluster LIPI-1 zusammengefasst oder liegen verteilt auf dem Chromosom. Alle diese Virulenzgene werden durch den positiven Regulationsfaktor PrfA (PrfA = positive regulatory factor A) in ihrer Transkription kontrolliert. Das *prfA*-Gen, kodierend für PrfA, ist ebenfalls Bestandteil des Virulenzgenclusters (LIPI-1).

In bisherigen Studien konnte gezeigt werden, dass die Verwertung der Kohlenstoffquellen Glukose, Mannose und Cellobiose zur Hemmung der PrfA-Aktivität in *L. monocytogenes* führt. Basierend auf Literaturdaten und eigenen Ergebnissen wurde die Hypothese aufgestellt, dass Komponenten der globalen Kohlenstoff-Katabolitrepression (KKR) oder des PTS (Phosphoenolpyruvat-Phosphotransferase-System)-abhängigen Zuckertransports an der Modulation der PrfA-Aktivität beteiligt sind.

Um zu überprüfen, ob über die KKR die Aktivität von PrfA gesteuert wird und dadurch auch die Regulation der PrfA-abhängigen Virulenzgenexpression, wurden in dieser Arbeit pLSV101-Insertionsmutanten für die Gene *ccpA* (kodierend für CcpA = catabolite control protein A), *hprK* (kodierend für die HPr-Kinase/Phosphorylase, die HPr am Ser46 phosphoryliert) und *ptsH* (kodierend für das hitzestabile HPr) charakterisiert. Die Insertionsmutanten *::ccpA* und *::hprK* zeigten sowohl in BHI (undefiniertes nährstoffreiches Medium) als auch in definiertem Minimalmedium (MM) mit 50 mM Glukose ein verlangsamtes Wachstum und eine verringerte [¹⁴C]-Glukose-Aufnahme im Vergleich zum Wildtyp (WT). Die *::ptsH*-Insertionsmutante war nur zu einem Wachstum in BHI fähig und zeigte erwartungsgemäß (fehlendes HPr) kein Wachstum in definiertem MM mit Glukose als einziger Kohlenstoffquelle. Die *::hprK*- und (unter bestimmten Wachstumsbedingungen) auch die *::ptsH*-Mutante wiesen sowohl auf Transkriptions- als auch auf Translationsebene eine gesteigerte Expression PrfA-abhängiger Virulenzgene auf. Cellobiose-Verwertung führte auch in der *::hprK*-Insertionsmutante zu einer Hemmung der PrfA-Aktivität. Dagegen wurde in der *::ccpA*-Insertionsmutante eine geringere Expression aller PrfA-abhängigen Virulenzgene im Vergleich zum WT festgestellt. Die Revertanten *RccpA*, *RhprK* und *RptsH* wiesen im Wachstumsverhalten und in der PrfA-abhängigen Virulenzgenexpression wieder einen wildtypischen Phänotyp auf. Trotz der etwas gesteigerten Virulenzgenexpression zeigte die *::ptsH*-Mutante eine deutlich verringerte Replikationsrate in J744 Makrophagen gegenüber dem WT.

Die Transkriptomprofile der *::ccpA*- und *::hprK*-Insertionsmutanten zeigten im Vergleich zum WT viele hochregulierte Gene. Diese umfassen Gene, die v.a. für den PTS-abhängigen

Zuckertransport, ABC-Transporter und Enzyme des C- und N-Metabolismus kodieren und im WT wahrscheinlich unter den gegebenen Wachstumsbedingungen unter KKR-Kontrolle stehen. Die erhöhte PrfA-abhängige Virulenzgenexpression in der *::hprK*-Mutante korreliert mit der Herunterregulation einiger Gene, die in ihrer Transkription durch einen aktiven PTS-vermittelten Glukose-Transport kontrolliert werden.

Die gesteigerte PrfA-Aktivität und die Abwesenheit von HPr-Ser46~P (neben CcpA eine wichtige Komponente der KKR) in den *::hprK*- und *::ptsH*-Insertionsmutanten führten zu der Annahme, dass eine Korrelation zwischen der Menge an HPr-Ser46~P und der PrfA-Aktivität bestehen könnte. Die Untersuchung der PrfA-Aktivität und parallel dazu die Mengenbestimmung von HPr-Ser46~P in MM mit Glukose, Cellobiose und Glyzerin zeigte jedoch, dass weder HPr-Ser46~P noch HPr-His15~P direkte Modulatoren der PrfA-Aktivität sind. Eine direkte Interaktion zwischen HPr-Ser46~P und PrfA konnte mittels Biacor-Analyse ebenfalls nicht nachgewiesen werden. Auch *in vitro* Transkriptions-Studien zeigten keinen inhibitorischen Effekt von HPr-Ser46~P auf die Initiation der Transkription bei PrfA-abhängigen Promotoren (S. Müller-Altrock, persönliche Mitteilung).

Interessanterweise war bei einem aktiven Glukose-Transport, bei Bedingungen also, wo die EIIA-Komponenten aller aktiven Glukose-spezifischen PTS im unphosphoryliertem Zustand vorliegen (EIIA-Komponenten übertragen über EIIB das aktive Phosphat auf die über EIIC in die Bakterienzelle transportierte Glukose), die PrfA-Aktivität gering. Erst in der spät-logarithmischen bis stationären Wachstumsphasen, wenn Glukose nur noch in geringem Umfang von der Bakterienzelle aufgenommen wird und die Glukose-spezifischen EIIA-Komponenten in phosphorylierter Form vorliegen, steigt die PrfA-Aktivität. Die Verwertung der PTS-unabhängigen Kohlenstoffquelle Glyzerin zeigte gegenüber den PTS Zuckern Glukose und Cellobiose schon in der frühen Wachstumsphase eine erhöhte PrfA-Aktivität. Demnach scheint sich die Expression spezifischer PTS und der Phosphorylierungszustand von EIIA dieser PTS regulatorisch auf die PrfA-Aktivität auszuwirken. Die Glukose-Aufnahme in *L. monocytogenes* ist noch nicht vollständig aufgeklärt (R. Stoll, unveröffentlichte Ergebnisse). Doch kann aufgrund des Wachstumsverlustes der *::ptsH*-Insertionsmutante in Glukose-haltigem MM davon ausgegangen werden, dass die Glukose-Aufnahme in *L. monocytogenes* ausschließlich PTS-abhängig erfolgt. Ein Glukose-spezifisches PtsG, das in *B. subtilis* und anderen Bakterien als wichtiger Glukose-Transporter beschrieben wurde, existiert in *L. monocytogenes* nicht. Hier konnte nur eine PtsG-spezifische EIIA-Komponente (kodiert von lmo1017) identifiziert werden. Wachstumsuntersuchungen in definiertem MM mit den Kohlenstoffquellen Glukose, Mannose, Cellobiose und Glyzerin ergaben keinen Wachstumsunterschied zwischen der in dieser Komponente defekten $\Delta eIIA^{Glc}$ -Mutante und dem WT. Die PrfA-Aktivität dieser Mutante war leicht erhöht, was sich in einer etwas gesteigerten ActA- bzw. PrfA-Expression und einer höheren LLO-Aktivität gegenüber dem WT ausprägte. Es konnte jedoch keine eindeutige Interaktion zwischen dieser gereinigten EIIA^{Glc}-Komponente und dem PrfA-Protein mittels Biacor-Analyse nachgewiesen werden (S. Müller-Altrock und G. Seidel, persönliche Mitteilung). Welche EIIA-Komponenten spezifischer PTS an der Modulation der PrfA-Aktivität beteiligt sind, konnte in dieser Arbeit damit nicht abschließend geklärt werden.

Der Transport von phosphorylierten Zuckern, wie Glukose-1-, Glukose-6- oder Mannose-6-Phosphat, erfolgt in *L. monocytogenes* über den Hexose-Phosphat-Transporter UhpT, der von dem strikt PrfA-abhängig *uhpT*-Gen kodiert wird. Durch die Zugabe von Amberlite XAD-4 zu LB-Medium oder durch vorherigen Anzucht in Glyzerin-haltigem MM, Bedingungen, die

sich stimulierend auf die PrfA-Aktivität auswirken, konnte ein effizientes Wachstum von *L. monocytogenes* in Glukose-6-Phosphat-haltigem Medium erreicht werden. Obwohl die Kohlenstoff-Verbindungen (Glukose, Cellobiose und Glukose-6-Phosphat) in die Glykolyse eingeschleust werden, führte die Verwertung von Glukose-6-Phosphat zur Aufhebung der KKR. Dies konnte durch vergleichende Gesamtgenom-Transkriptom-Analysen und an der Bestimmung der HPr-Ser46~P Meng gezeigt werden. Die PTS-unabhängige Glukose-6-Phosphat-Aufnahme führt, ähnlich wie die von Glycerin, zu einer erhöhten Aktivität von PrfA.

Neben Glycerin können auch Dihydroxyaceton (Dha) und Pyruvat (letztere allerdings mit niedriger Wachstumseffizienz), nicht aber Glycerin-3-Phosphat *in vitro* als C3-Quellen dienen. Da die *ptsH*-Insertionsmutante kein Wachstum in Glycerin- oder Dha-haltigem Medium zeigte, lässt sich vermuten, dass die listeriellen Glycerin-Kinase(n) (GlpK), ähnlich wie die von *B. subtilis*, durch HPr-His15~P aktiviert werden muss und die Dha-Kinase(n) (DhaK) von *L. monocytogenes* ebenfalls HPr-His15~P als Kofaktor für die Phosphorylierung von Dha verwendet.

Der Glycerin-Metabolismus in *L. monocytogenes* wurde vor allem über Gesamtgenom-Transkriptom-Analysen und Real-time RT-PCR Untersuchungen näher charakterisiert. Es konnte gezeigt werden, dass *L. monocytogenes* mehrere Gene besitzt, die in Glycerin-haltigem Medium verstärkt exprimiert werden und vermutlich am Glycerin- bzw. Dha-Metabolismus beteiligt sind. *L. monocytogenes* besitzt zwei Dha-Kinasen (kodiert von lmo0347-48 und lmo2695-96), die beide eine hohe Homologie zur DhaK aus *E. coli* besitzen. Eine Deletion beider Dha-Kinasen ($\Delta dhaK = \Delta lmo0347-48/lmo2695-96$) führte zu einer starken Wachstumshemmung in Glycerin-haltigem MM und zur weitgehenden Inaktivierung von PrfA.

Die $\Delta dhaK$ - und die $\Delta glpD/dhaK$ -Mutante wiesen in J744 Makrophagen eine verringerte Replikationsrate im Vergleich zum WT auf, was für eine Verwertung von Glycerin und/oder Dha durch *L. monocytogenes* im Zytoplasma von Wirtszellen spricht. Da diese Mutanten aber noch –wenn auch mit verringerter Effizienz – in diesem Zellkompartiment der Makrophagen wachsen können, muss *L. monocytogenes* wohl auch in der Lage sein, weitere Kohlenstoffquellen dieser Wirtszelle verwerten zu können.

1 Summary

Listeria monocytogenes is a Gram-positive facultative intracellular bacterium of mammals naturally inhabiting decayed plant matter in the soil. Several well-characterised virulence factors are necessary for the different steps in the infection cycle of *L. monocytogenes*: InlA and InlB for active internalization of *L. monocytogenes* into nonprofessional phagocytic cells, LLO and PlcA for the release of the primary phagosome, ActA for cell-to-cell spreading, LLO together with PlcA and mainly PlcB are responsible for the escape from the secondary phagosome. The hexose-phosphate-transporter (UhpT) is partially involved in intracellular replication in the cytosol of the host. The genes that encode these virulence factors are clustered mainly in a single 9,6 kb region of the chromosome (LIPI-1) or dispersed elsewhere on the listerial chromosome. The transcriptions of these genes are regulated by the positive regulatory factor A (PrfA), encoded by *prfA*, which is itself a member of the same gene cluster (LIPI-1).

Previous studies have indicated that the utilization fermentable sugars like glucose, mannose, and cellobiose repressed the PrfA-controlled virulence gene expression in *L. monocytogenes*. Based on the published results and the results obtained in this study, it is tempting to hypothesise that components of the carbon catabolite repression (CCR) or of the PTS- (Phosphoenolpyruvate Phosphotransferase System) dependent sugar transport are involved in modulation of PrfA activity.

To show that components of CCR could be involved in modulation of PrfA activity and therefore in regulation of PrfA-dependent virulence gene expression in *L. monocytogenes*, insertion mutants of *ccpA* (coding for CcpA = catabolite control protein A), *hprK* (coding for HPr kinase/phosphatase which phosphorylates HPr at Ser46) and *ptsH* (coding for HPr) were characterised. The $::ccpA$ and $::hprK$ mutants showed reduced growth in BHI (undefined nutrient rich medium) as well as in defined minimal medium (MM) with 50 mM glucose and decreased [^{14}C]-glucose uptake compared to wild-type. The $::ptsH$ mutant could only grow in a rich culture medium and as expected was unable to grow in MM with glucose as sole carbon source because of its inability to produce HPr.

$::hprK$ and $::ptsH$ mutant (under certain growth conditions) too showed increased expression of PrfA-controlled genes both at the transcriptional and translational level. Cellobiose utilisation in the $::hprK$ mutant led to inhibition of PrfA activity. In contrast, the $::ccpA$ mutant showed decreased expression of the PrfA-dependent virulence genes in comparison to wild-type. Revertants, *RccpA* *RhprK* and *RptsH* again showed a wild type phenotype with respect to growth and expression of the PrfA regulated genes. In spite of slight increased virulence gene expression, the $::ptsH$ mutant showed reduced replication in J744 macrophages compared to wild-type.

The transcript profiles of the $::ccpA$ and $::hprK$ mutants revealed in comparison to the wild-type several upregulated genes. Amongst others, genes coding for PTS-dependent sugar transport, ABC-transporter and enzymes of the C- and N-metabolism were upregulated, suggesting that they were repressed in wild-type under those growth conditions. Up-regulation of the PrfA-dependent virulence genes in the $::hprK$ mutant correlates with the

down-regulation of genes which are controlled by the efficiency of PTS-mediated glucose transport.

The increased PrfA activity and the absence of the HPr-Ser46~P (beside CcpA a main key player of CCR) in *::hprK* and *::ptsH* mutants led to assumption that there is an inverse correlation between the level of HPr-Ser46~P and PrfA activity. However, the determination of the PrfA activity and quantification of the amount of HPr-Ser46~P in the medium with glucose cellobiose and glycerol respectively showed that neither HPr-Ser46~P nor HPr-His15~P could act as direct negative modulators of PrfA activity. Recent studies aimed at demonstrating direct binding of purified HPr-Ser46~P and PrfA using Biacore assays also failed. In addition *in vitro* transcription showed no inhibition effect by HPr-Ser46~P to initiated transcription from several PrfA-dependent promoters (S. Müller-Altrock, personal communication).

Interestingly, during active glucose transport, conditions where EIIA components of active glucose-specific PTS are unphosphorylated (EIIA components transfer the phosphate via EIIB to the glucose being transported by EIIC into the bacterial cell) the PrfA activity is low. In the late log phase and the early stationary phase where less glucose is taken up by the bacteria and glucose-specific EIIA components are phosphorylated, the PrfA activity increased. *L. monocytogenes* grown in the presence of the non-PTS carbon source glycerol showed already in the early growth phase a higher PrfA activity in comparison to growth with PTS-dependent sugars like glucose or cellobiose. Based on these results, the expression of specific PTS and the phosphorylation state of EIIA components of these PTS seems to affect the regulation of PrfA activity.

The exact mechanism of glucose uptake in *L. monocytogenes* is still unclear (R. Stoll; unpublished data). Due to the growth deficiency of the *::ptsH* mutant in glucose-containing MM glucose uptake must be PTS-dependent. The glucose-specific PtsG described for *B. subtilis* and other bacteria as important glucose transporter is not present in *L. monocytogenes*. Only a PtsG-specific EIIA component (encoded by *lmo1017*) has been identified. Growth analysis in defined MM supplemented with glucose, mannose, cellobiose and glycerol respectively showed no differences in growth between *eIIA^{Glc}* mutant and wild-type. The PrfA activity in that mutant was slightly increased, shown in a slight increased expression of ActA and PrfA and a higher LLO activity compared to wild-type. However, studies aimed at demonstrating direct binding of purified *eIIA^{Glc}* and PrfA with in Biacore assays failed (S. Müller-Altrock and G. Seidel, personal communication). Which of the EIIA components of specific PTS are involved in modulation of PrfA activity needs further clarification.

Transport of phosphate sugars like glucose-1-, glucose-6- or mannose-6-phosphate is mediated by the hexose-phosphate-transporter UhpT encoded by the strictly PrfA-dependent gene *uhpT*. Addition of Amberlite XAD-4 to LB-Medium or preincubation in glycerol-containing MM conditions which induce PrfA activity led to efficient growth of *L. monocytogenes* in glucose-6-phosphate containing medium. Even though, glucose, cellobiose and glucose-6-phosphate are catabolised via glycolysis, glucose-6-phosphate utilisation led to deregulation of the CCR. This deregulation was shown on the basis of wholegenome-transcriptom analysis and quantification of the amount of HPr-Ser46~P. The

non-PTS-dependent transport of glucose-6-phosphate resulted similar to that of glycerol to a higher activation of PrfA.

Besides glycerol, dihydroxyacetone (dha) and pyruvate (with lower growth efficiencies) but not glycerol-3-phosphate seem to be suitable C3 sources for *L. monocytogenes*. The $\Delta ptsH$ mutant was unable to grow in glycerol- or dha-containing medium which suggests that the listerial glycerol kinase(s) (GlpK) similar to that of *B. subtilis* is activated by HPr-His15~P and that the dha kinase(s) (DhaK) also use HPr-His15~P as a cofactor for dha phosphorylation.

The glycerol metabolism of *L. monocytogenes* was mainly characterized by wholegenome transcriptome analysis and Real-time RT-PCR. It was shown that *L. monocytogenes* exhibits many genes highly upregulated in glycerol-containing MM indicating an involvement in glycerol and dha metabolism, respectively. *L. monocytogenes* possesses two dha kinases (encoded by lmo0347-48 and lmo2695-96) with high sequence homology to the dha kinase of *E. coli*. Deletion of both dha kinases ($\Delta dhaK = \Delta lmo0347-48/lmo2695-96$) led to high growth inhibition and to almost complete PrfA inactivation.

The *dhaK* and *glpD/dhaK* mutants exhibited a reduction in intracellular replication in J744 macrophages compared to wild-type, suggesting an utilisation of glycerol and/or dha in the host cytosol by *L. monocytogenes*. The fact that these mutants could still grow in this cell compartment of macrophages (however with lower efficiencies) indicates that *L. monocytogenes* must be able to utilise additional carbon sources in the host cell.

2 Einleitung

2.1 Allgemeine Mikrobiologie von Listerien

Listerien sind Gram-positive, nicht sporulierende, stäbchenförmige, bewegliche Bakterien mit fakultativ anaerober Lebensweise. Die kurzen Stäbchen ($0,4 \times 1-1,5 \mu\text{m}$) sind in der Natur ubiquitär verbreitet. Sie können nicht nur aus Pflanzenmaterial, Wasser, Abwasser und dem Boden isoliert werden, sondern auch aus zahlreichen Nahrungsmitteln. Listerien sind zudem im Gastrointestinaltrakt des Menschen, verschiedener Säugetiere (Schaf, Ziege) und Vögeln zu finden. Etwa 10 % der Bevölkerung tragen *Listeria monocytogenes* als Bestandteil ihrer Darmflora, ohne dass dies zu einer Beeinträchtigung ihrer Gesundheit führt (Gray & Killinger, 1966). Als natürliches Habitat der Listerien dient verfaultes Pflanzenmaterial, in dem *Listeria* spp. saprophytisch leben (Farber & Peterkin, 1991, Vázquez-Boland *et al.*, 2001). *Listeria* kann ebenfalls eine große Anzahl von Oberflächen kolonisieren und ist in der Lage, Biofilme zu bilden (Roberts & Wiedmann, 2003).

Die Gattung *Listeria* umfasst derzeit sechs Arten: *Listeria monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, *L. innocua*, *L. welshimeri* und *L. grayi*. Von den sechs Arten sind nur *L. monocytogenes* und *L. ivanovii* als Krankheitserreger bekannt. *Listeria monocytogenes* ist die einzige human- und tierpathogene Art. Bei der Art *L. ivanovii* handelt es sich bis auf Einzelfälle um einen reinen tierpathogenen Erreger, hauptsächlich bei Schafen und Rindern. Die übrigen Arten gelten als harmlose Saprophyten. Obwohl *L. seeligeri* viele listerielle Virulenzgene trägt, ist diese Art avirulent. Es wurden jedoch Einzelfälle beschrieben, bei denen *L. ivanovii* und *L. seeligeri* aus Listeriose-Patienten isoliert wurden (Cummins *et al.*, 1994, Rocourt *et al.*, 1986). 2004 isolierte die Arbeitsgruppe von A.D. Hitchens einen atypischen *Listeria innocua* Stamm mit dem für *Listeria monocytogenes* typischen Virulenzgencluster LIPI-1. Aufgrund des Fehlens weiterer Virulenzgene wie *iap*, *inlA*, *inlB* und *inlC* zeigt dieser Stamm jedoch einen avirulenten Phänotyp im Mausmodell (Johnson *et al.*, 2004).

Listerien sind in die Gruppe der Gram-positiven Bakterien mit niedrigem GC-Gehalt einzuordnen (36 – 42 %) und sind phylogenetisch eng mit den Gattungen *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterococcus*, *Streptococcus* und *Staphylococcus* verwandt (Sallen *et al.*, 1996, Collins *et al.*, 1991). Anhand der Expression von O-Antigenen (Lipoteichonsäuren) und H-Antigenen lassen sich Listerien in dreizehn verschiedenen Serotypen unterteilen (Seeliger & Langer, 1989, Allerberger, 2003). 95 % der Isolate aus Listeriose-Patienten konnten den Serotypen 4b, 1/2a und 1/2b zugeordnet werden (Farber & Peterkin, 1991).

Listerien sind fakultativ anaerobe Bakterien, was ihnen während der Infektion eukaryotischer Zellen einen Vorteil verschaffen könnte. Unter aeroben Laborbedingungen wachsen Listerien vorzugsweise in BHI (*brain heart infusion*), einem Vollmedium. Jedoch ist *Listeria* in der Lage, auf weiteren Medien zu wachsen, dazu zählt Luria Bertani Medium (LB-Medium) und ein speziell, auf Genom-Analysen basierendes, zusammengestelltes Minimalmedium für

Listerien (Premaratne *et al.*, 1991, Tsai & Hodgson, 2003). Kohlenhydrate, Aminosäuren (Cystein, Glutamin, Isoleucin, Leucin und Valin) und Vitamine (Biotin, Riboflavin, Thiamin und Liponsäure) sind für das listerielle Wachstum erforderlich. Eisen und einige Aminosäuren, wie Arginin, Histidin, Methionin und Tryptophan stimulieren das Wachstum der Listerien (Seeliger, 1986).

Listerien tolerieren einen weiten Temperaturbereich und können bei -0,4 - 50°C (Rocourt & Bille, 1997) überleben, wobei das Temperaturoptimum bei 30 - 37°C liegt. Bei 20 - 25°C sind die Bakterien peritrich begeißelt und zeichnen sich durch eine charakteristische Taumelbewegung aus. Dagegen ist bei den optimalen Wachstumstemperaturen von 30 - 37°C keine Bewegung mehr zu erkennen und die Flagellin-Synthese ist deutlich reduziert (Way *et al.*, 2004). Listerien sind in der Lage, sich noch bei Salzkonzentrationen von 10 - 20 % NaCl und pH-Werten im Bereich von pH 5,5 - 9,6 zu vermehren. Die Bakterien können selbst längere Perioden des Trocknens und Gefrierens mit anschließendem Auftauen überleben (Gray & Killinger, 1966). Ein optimales Wachstum erfolgt aber bei einem neutralen pH-Wert und einer Salzkonzentration von 0,5 % (McClure *et al.*, 1991).

Aufgrund der Eigenschaften, wie Toleranz gegenüber hoher Salzkonzentrationen, Wachstum bei geringem pH-Wert und der Kryotoleranz, sind Listerien in der Lage, die konventionellen Methoden der Nahrungsmittelkonservierung überleben zu können. Diese Eigenschaften machen Listerien zu einem potentiell pathogenen Nahrungsmittelkeim und stellen ein ernsthaftes Problem der Nahrungsmittelindustrie dar (Schlech, 2000, Gandhi & Chikindas, 2007).

2.2 Pathogenese

Listeria monocytogenes wurde 1926 in Cambridge zum ersten Mal von Murray *et al.* beschrieben (Murray, 1926). Er bezeichnete den Keim aufgrund der auftretenden Monozytose bei Labortieren (Kaninchen und Meerschweinchen) als *Bacterium monocytogenes*. 1927 wurde der bakterielle Erreger als *Listerella hepatolytica* betitelt und schließlich 1940 von Pirie in *Listeria monocytogenes* umbenannt (Pirie, 1940). *Listeria monocytogenes* ist jedoch nicht nur tierpathogen, sondern verursacht als einzige Art auch die humane Listeriose, deren erster Fall 1929 in Dänemark beschrieben wurde (Nyfelt, 1929, Gray & Killinger, 1966).

Die durch *L. monocytogenes* und *L. ivanovii* verursachte Infektionskrankheit wird als Listeriose bezeichnet und kann neben dem Menschen eine Vielzahl anderer Vertebraten, einschließlich Vögel und Säuger, betreffen. Unter der Listeriose ist kein einheitliches Krankheitsbild zu verstehen, sondern vielmehr ist es ein Oberbegriff für eine Reihe von Krankheitsbildern, die beim Menschen bzw. beim Tier durch eine listerielle Infektion ausgelöst werden können. Dazu zählen influenzaähnliche Symptome, Gastroenteritis, Sepsis und Erkrankungen des zentralen Nervensystems, wie Meningitis und Meningoenzephalitis, weil die Bakterien die Blut-Hirn-Schranke überwinden können. Außerdem sind Listerien in der Lage, die Plazenta-Barriere zu durchdringen, was zu Fehl- und Totgeburten, sowie einer Krankheitsübertragung auf das Neugeborene (neonatale Listeriose) führen kann (Lorber, 1997, Dalton *et al.*, 1997, Wing & Gregory, 2002).

Obwohl Listerien in der Natur weit verbreitet sind, ist die humane Listeriose selten, stellt jedoch eine ernsthafte Infektionskrankheit mit einer Mortalitätsrate von über 30 % dar (Gellin & Broome, 1989, Jones, 1990). Ein aktueller Bericht des Robert-Koch-Institut zur Analyse der Listeriose-Melddaten zeigt eine kontinuierliche Zunahme der Listeriose-Erkrankungen in Deutschland und einigen europäischen Ländern, wie England und den Niederlanden, für den Zeitraum 2001-2005. Ein Anstieg ist vor allem bei der Infektion von älteren Menschen ab 60 Jahren zu erkennen (Robert-Koch-Institut, 2006).

Bei immunkompetenten Personen tritt nur in vereinzelten Fällen die Listeriose auf. Die Aufnahme von stark kontaminierten Nahrungsmitteln kann jedoch auch in kurzer Zeit in gesunden Menschen zu einer Gastroenteritis führen (Cossart, 2007). Zu den Risikogruppen zählen schwangere Frauen und ihre Föten, Neugeborene, ältere Menschen und immungeschwächte Personen, wie z.B. immunsupprimierte Transplantationspatienten und AIDS-Kranke. Von den 13 verschiedenen *L. monocytogenes*-Serotypen verursachen 1/2a, 1/2b und 4b mehr als 90 % aller Listeriosefälle bei Menschen und Tier und zeigten sich zudem virulenter als andere Serotypen (Gellin & Broome, 1989).

Als Hauptübertragungsweg gelten kontaminierte tierische und pflanzliche Lebensmittel, wie Rohmilchprodukte, Weichkäse, Geflügel, Fleisch, Fisch, aber auch Obst und Gemüse sowie industriell hergestellte, gekühlte Fertigprodukte, die ohne vorheriges Kochen oder Erhitzen verzehrt werden. *L. monocytogenes* ist auch im Kot von gesunden Menschen und Tieren nachweisbar, weshalb der Gastrointestinaltrakt ein weiteres Reservoir für den pathogenen Keim darstellt (Farber & Peterkin, 1991, Schuchat *et al.*, 1991).

Die Erfolge der antimikrobiellen Chemotherapie gegen Listerien sind bislang unbefriedigend. Die besten Ergebnisse werden durch eine Behandlung mit Ampicillin in Kombination mit Aminoglykosiden erzielt (Hof *et al.*, 1997, Troxler *et al.*, 2000). Dennoch stirbt jeder dritte Listeriose-Patient, da die Antibiotikagabe durch unklare Symptomatik und die schwierige, zeitaufwendige Diagnose oft verzögert wird. Praktisch einsetzbare Impfstoffe für den Menschen sind bisher noch nicht verfügbar.

2.3 Intrazellulärer Infektionszyklus und Virulenzfaktoren von *L. monocytogenes*

L. monocytogenes gehört wie viele andere pathogene Mikroorganismen (z.B. *Mycobacterium*, *Salmonella*, *Shigella*, *Legionella* und *Yersinia*) zu den fakultativ intrazellulären Bakterien. Diese Lebensweise ist jedoch nicht obligat und die krankheitserregenden Bakterien sind auch in freier Natur anzutreffen.

Listeria monocytogenes ist in der Lage, in nicht-professionell phagozytische, eukaryotische Wirtszellen einzudringen, dort zu überleben und sich in einer Vielzahl von Zellen zu vermehren. Intrazellulär nutzen Listerien das wirtseigene Zytoskelett zur Aktin-abhängigen Fortbewegung. Durch die direkte Zell-zu-Zell-Ausbreitung, ohne in Kontakt mit dem extrazellulären Bereich zu kommen, weichen die Listerien dem Wirtsimmunsystem aus (Chakraborty & Goebel, 1988, Tilney & Portnoy, 1989, Cossart & Mengaud, 1989).

Listerien dienen als Modellsystem zur Erforschung von Infektions- und Vermehrungsstrategien fakultativ intrazellulärer Bakterien und spielen eine wichtige Rolle bei der Untersuchung von T-Zell-vermittelter Immunantwort (Pamer, 2004). Da Listerien für gesunde Menschen kaum infektiös sind und sich leicht unter Laborbedingungen kultivieren lassen, eignen sie sich gut für die Laborarbeit. Das Vorkommen von sowohl pathogenen als auch apathogenen Arten innerhalb der Gattung ermöglicht vergleichende Untersuchungen.

2.3.1 Ein Überblick über den Infektionszyklus

Der Infektionsverlauf von *L.monocytogenes* wurde im Mausmodell eingehend untersucht. Da kontaminierte Lebensmittel die Hauptquelle einer Infektion darstellen, wird der Gastrointestinaltrakt als Haupteintrittsstelle der Listerien in den Wirtsorganismus angesehen. Im Darm infizieren die Listerien zunächst das Darmepithel und dringen dann durch die Enterozyten und M-Zellen in das dahinter liegende lymphoide Gewebe vor (Jensen *et al.*, 1998, Racz *et al.*, 1972). Dort werden die Bakterien von professionellen Phagozyten, wie Makrophagen und dendritischen Zellen, phagozytiert. Über Blut und Lymphe gelangen die Listerien in Leber und Milz (Marco *et al.*, 1997). Die Leber stellt einen kritischen Punkt für die Etablierung einer systemischen Listerien-infektion dar (Mackaness, 1962). Abhängig vom immunologischen Status des Wirts und der Virulenz des Bakterienstammes, werden die Listerien entweder von den Kupfferschen Zellen phagozytiert und abgetötet oder können sich weiter vermehren und in die Blutbahn gelangen. Über die Blutbahn können sie sich auf andere Organe (Gehirn, Placenta) ausbreiten und somit eine systemische Infektion bewirken.

In vivo und in Zellkultur konnte gezeigt werden, dass *L. monocytogenes* von Makrophagen (Harrington-Fowler *et al.*, 1981), Neutrophilen (Arnold & König, 1998) und dendritischen Zellen (Kolb-Maurer *et al.*, 2003) phagozytiert werden können. Jedoch sind Listerien invasive Pathogene, die ihre eigene Internalisation in verschiedene, nicht-professionell phagozytischen Zelltypen induzieren können: Enterozyten (Gaillard *et al.*, 1987), Hepatozyten (Gregory *et al.*, 1996), Endothelzellen (Greiffenberg *et al.*, 2000), Fibroblasten (Kuhn *et al.*, 1988) und Gliazellen (Dramsı *et al.*, 1998).

In all diesen Zellen durchläuft *L. monocytogenes* einen charakteristischen intrazellulären Infektionszyklus (siehe Abb. 2.1). Verschiedene eukaryotische Zellrezeptoren, wie das E-Cadherin, der Met-Rezeptor und Bestandteile der extrazellulären Matrix, dienen *Listeri* spp. zur Wirtszellerkennung. Die Invasion in nicht-professionell phagozytierende Zellen erfolgt über den Zipper-Mechanismus (Mengaud *et al.*, 1996). Die Bakterien werden dabei von der Zytoplasmamembran der Wirtszelle umflossen und ohne größere Veränderungen der Zytoskelettstruktur ins Zellinnere verfrachtet. Beim so genannten Trigger-Mechanismus, der sich bei der Invasion von *Salmonella* oder *Shigella* in die Wirtszelle ereignet, wird dagegen das Wirtszell-Zytoskelett wesentlich verändert (membrane ruffling) (Jones *et al.*, 1993).

Nach der Invasion liegen die Listerien in einer von der Wirtszellmembran gebildeten Vakuole, dem primären Phagosom, vor und sind dort einer Vielzahl antibakterieller Abwehrmechanismen ausgesetzt (Ansäuerung, reaktive Sauerstoffmetabolite). Möglicherweise können die Bakterien diesen bakteriziden Einflüssen durch den Einsatz einer

Superoxid-Dismutase (SOD) sowie einer **Katalase (KAT)** entgehen. Da diese Enzyme an der bakteriellen Verteidigung gegen die Abwehrmechanismen der eukaryotischen Wirtszelle beteiligt sind, können sie als mögliche Virulenzfaktoren von Listerien angesehen werden (Brehm *et al.*, 1992, Swartz *et al.*, 1991). Durch die Sekretion eines Hämolytins, dem **Listeriolysin O (LLO)**, und die Wirkung listerieller **Phospholipasen (PlcA und PlcB)** wird das Phagosom lysiert und die Bakterien gelangen ins Zytoplasma der Wirtszelle (Portnoy *et al.*, 1988, Smith *et al.*, 1995). Im Zytoplasma vermehrt sich *L. monocytogenes* mit einer Verdopplungszeit von ungefähr einer Stunde (Gaillard *et al.*, 1987). Das intrazelluläre Wachstum hängt unter anderem von dem Hexose-Phosphat-Transporter **UhpT** ab, der, wie viele andere listerielle Virulenzgene, unter der Kontrolle des Transkriptionsaktivators PrfA (*positive regulatory factor A*) steht (Goetz *et al.*, 2001). Intrazytoplasmatische Bakterien werden sofort nach dem Entkommen aus dem Phagosom von Aktin-Filamenten und Aktin-Bindeproteinen umgeben. Durch Rearrangement dieser Filamente bildet sich ein gerichteter, kometartiger Aktinschweif mit einer Länge von 5 - 40 μm an einem Pol des Bakteriums. Die Polymerisation von Wirtzellaktin treibt die Listerien ungerichtet und rein zufällig durch das Zytoplasma. Die Geschwindigkeit der Fortbewegung korreliert mit der Länge des Aktinschweifes und liegt durchschnittlich bei 0,25 $\mu\text{m/s}$ (Theriot *et al.*, 1992, Tilney & Portnoy, 1989).

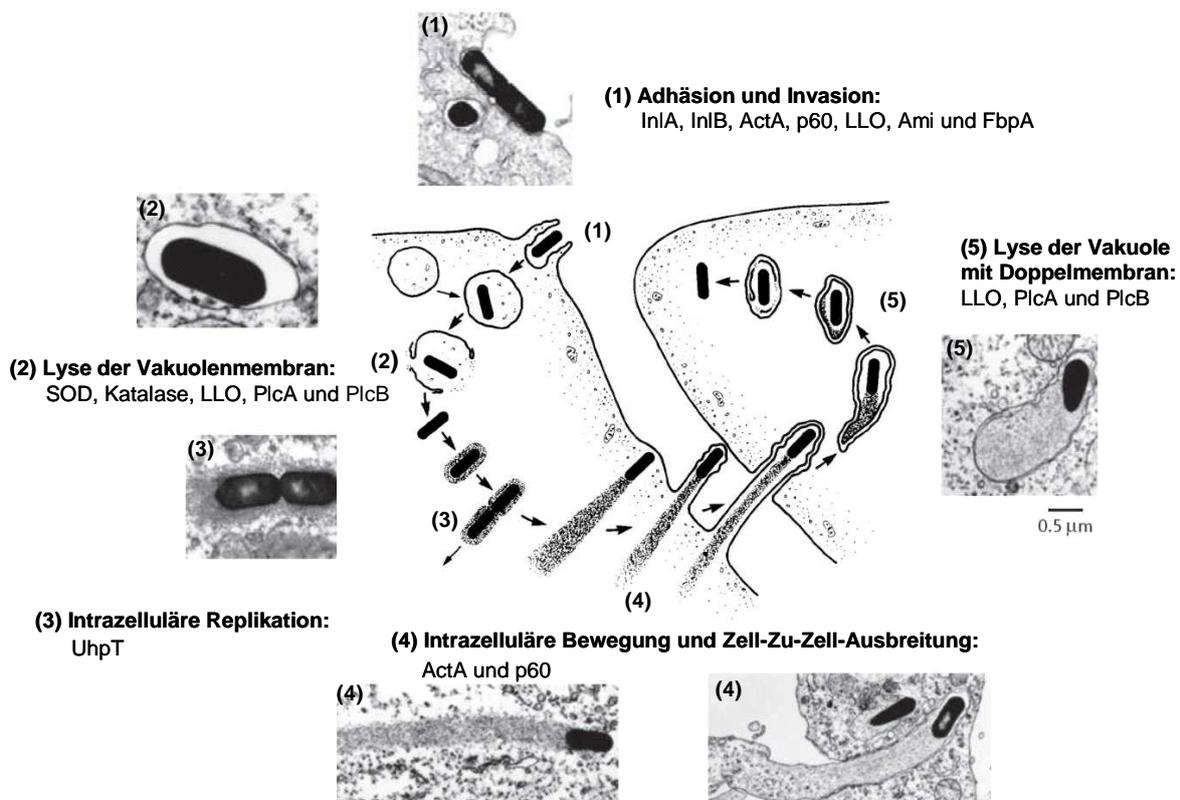


Abb. 2.1: Infektionszyklus von *L. monocytogenes* und die daran beteiligten Virulenzfaktoren; (modifiziert nach (Tilney & Portnoy, 1989, Cossart & Lecuit, 1998).

Gelangt das Bakterium an die Zellperipherie, induziert es dort eine pseudopodienartige Ausstülpung der Wirtszellmembran, die von der Nachbarzelle erkannt und phagozytiert wird. In der neu infizierten Wirtszelle sind die Listerien infolgedessen von einer Doppelmembran umgeben, die jedoch rasch lysiert werden kann. Diese Lyse erfordert **Listeriolysin O (LLO)** und die Phosphatidylcholin-spezifische **Phospholipase C (PlcB)**, die mittels der **Metalloprotease Mpl** in den enzymatisch aktiven Zustand überführt wird (Mengaud *et al.*, 1991b, Vazquez-Boland *et al.*, 1992). Die Bakterien kommen so schnell ins Zytoplasma und können dort einen neuen intrazellulären Vermehrungs- und Ausbreitungszyklus durchführen. Durch diese Art von Zell-zu-Zell-Ausbreitung können ganze Gewebe infiziert werden. Da sich die Bakterien stets intrazellulär aufhalten, sind sie der humoralen Immunantwort des Wirts nicht zugänglich. Die Eliminierung der Listerien erfolgt daher nur über die T-Zell-vermittelte Immunantwort (Robbins *et al.*, 1999, Kaufmann, 1988).

2.3.2 Adhäsion und Invasion in eukaryotische Zelle

L. monocytogenes benötigt verschiedene bakterielle Faktoren, um in nicht-professionelle Phagozyten (z.B. Darmepithelzellen) eindringen zu können. Zu diesen Faktoren zählen die sogenannten Internaline, sowie die Proteine p60, ActA, Ami, FpbA und LLO.

Internaline

Zu den derzeit neun genauer charakterisierten Internalinen von *L. monocytogenes* zählen das kleine Internalin InlC (Engelbrecht *et al.*, 1996) und die großen Internaline InlA, B, C2, D, E, F, G und H (Raffelsbauer *et al.*, 1998, Dramsi *et al.*, 1997). Durch Überprüfung der Genomsequenz von *L. monocytogenes* EGDe konnten eine Reihe weiterer Oberflächenproteine identifiziert werden. Unter diesen Proteinen befinden sich zahlreiche Internalin-ähnliche LPXTG-Proteine, die teilweise putative PrfA-Boxen besitzen und somit PrfA-reguliert sein könnten (Glaser *et al.*, 2001, Cabanes *et al.*, 2002).

Die Internaline zählen zur Multigenfamilie der LRR-Proteine (LLR = leucin rich repeats), besitzen ein Signalpeptid und lassen sich in drei Gruppen einteilen. Die erste Klasse beinhaltet Internaline (z.B. InlA) mit einem C-terminalen LPXTG-Motiv, über welches sie kovalent an die Zellwand verankert sind. Die zweite Gruppe der Internaline, z.B. InlB, ist durch ein C-terminales GW-Modul gekennzeichnet. Dieses Modul ermöglicht eine nicht-kovalente Anlagerung des Proteins an Lipoteichonsäuren der Zellwand. Die dritte Gruppe besteht aus Internalinen (z.B. InlC), die keine Domäne für die Zellwandverankerung besitzen, sondern ins extrazelluläre Medium sekretiert werden.

Die ersten Internaline, die charakterisiert wurden, InlA und InlB, sind die Haupteffektoren für die Aufnahme in nicht-professionell phagozytierende Zellen. Die Funktion der anderen exprimierten Internaline (C, C2, D, E, F, G und H) ist noch relativ unklar (Raffelsbauer *et al.*, 1998). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die Invasion in Säugerzelllinien durch eine Deletion des *inlGHE* Genclusters beeinflusst wird (Bergmann *et al.*, 2002).

Die Internalingene *inlA*, *inlB* und *inlC* stehen unter der Kontrolle des Transkriptionsfaktors PrfA (auch PrfA-unabhängige Promotoren), wobei die *inlGHE*-Gene einzeln von einem PrfA-unabhängigen Promotor transkribiert werden (Lingnau *et al.*, 1995, Raffelsbauer *et al.*,

1998, Sheehan *et al.*, 1995). Einige Internaline (InlA, InlB, InlC2, InlD und InlE) werden ebenfalls durch den Sigmafaktor B positiv reguliert (Kazmierczak *et al.*, 2003).

Bei **Internalin A** (InlA), das vom *inlA*-Gen kodiert wird, handelt es sich um ein 88 kD-schweres Oberflächenprotein. Das C-terminale LPXTG-Motiv ermöglicht eine kovalente Bindung des Proteins an das Peptidoglykan. Diese kovalente Verankerung an die bakterielle Zellwand wird durch die Sortase SrtA katalysiert. Eine *srtA*-Deletionsmutante zeigt einen attenuierten Phänotyp im Mausmodell (Bierne *et al.*, 2002).

Das E-Cadherin wurde als spezifischer eukaryotischer Rezeptor für das InlA-Protein identifiziert. Das Ca²⁺-abhängige Adhäsionsmolekül E-Cadherin ist ein Mitglied der Cadherinfamilie, einer Gruppe von Glykoproteinen, und wird vor allem in epithelialen Geweben, wie Haut, Leber und Intestinaltrakt, exprimiert. Die Invasion wird durch die intrazytoplasmatische Domäne des E-Cadherins vermittelt und führt vermutlich zum Rearrangement des Aktinzytoskeletts über α - und β -Catenine (Mengaud *et al.*, 1996). *inlA*-negative Mutanten sind nicht mehr in der Lage, in Caco-2 Enterozyten zu penetrieren. Umgekehrt erzielt man durch das Einbringen des *inlA*-Gens in die nicht-invasive, apathogene Art *L. innocua* die Fähigkeit der Invasion in Caco-2 Zellen (Gaillard *et al.*, 1991).

Die Interaktion von InlA und dem E-Cadherin ist artenspezifisch. Diese Spezifität ist auf einen einzigen Aminosäureaustausch in der Bindestelle des humanen E-Cadherins zurückzuführen. Der Austausch von Prolin zu Glutamat im murinen E-Cadherin verhindert die InlA-abhängige Listerien-Aufnahme (Lecuit *et al.*, 1999).

Internalin B (InlB) besitzt ein Molekulargewicht von 65 kD und ist im gleichen Operon wie InlA lokalisiert (Gaillard *et al.*, 1991). InlB ist für die Aufnahme in ein breites Spektrum von eukaryotischen Wirtszellen, wie z.B. Hepatozyten und Fibroblasten verantwortlich, bei dem InlA keine Rolle spielt (Gregory *et al.*, 1997, Parida *et al.*, 1998). Am C-Terminus besitzt InlB drei Tandem-Repeats aus 80 Aminosäuren, beginnend mit der Sequenz GW. Dieses GW-Modul vermittelt die nicht-kovalente Anheftung von InlB an die bakterielle Oberfläche über die Teichon- oder Lipoteichonsäuren der bakteriellen Zellwand (Braun *et al.*, 1997).

Der Met-Rezeptor (Hepatozyten-Wachstumsfaktor-Rezeptor) wurde als Hauptrezeptor für InlB identifiziert. InlB bindet mit seiner LRR-Region an den Met-Rezeptor auf der Zielzelle. Es kommt zur Phosphorylierung des Rezeptors, zur Rekrutierung bzw. Phosphorylierung von Adapterproteinen Cb1, Gab1 und Shc und zur Aktivierung der Phosphatidylinositol (PI) 3-Kinase (Shen *et al.*, 2000, Ireton *et al.*, 1996, Ireton *et al.*, 1999). Diese Kinase ist an der Kontrolle des Aktinzytoskeletts beteiligt und bewirkt dadurch eine effiziente Aufnahme in epitheliale Zellen. *inlB*-negative Mutanten zeichnen sich durch eine verringerte Virulenz aus und können nicht mehr in Hepatozyten und einige Epithelzelllinien eindringen (Lingnau *et al.*, 1995).

Internalin C (InlC oder IrpA) besitzt ein Molekulargewicht von 30 kD und wird im Gegensatz zu den großen Internalinen sekretiert und ausschließlich im Kulturüberstand gefunden. Diesem Internalin fehlt die C-terminale Membranankersequenz.

InlC besitzt sowohl einen PrfA-abhängigen, als auch einen PrfA-unabhängigen Promotor und wird vor allem in der späten Phase der Infektion während der Zell-zu-Zell-Ausbreitung exprimiert (Luo *et al.*, 2004, Engelbrecht *et al.*, 1996).

Die Untersuchung einer *inlC*-Deletionsmutante zeigt zwar eine reduzierte Virulenz im Mausmodell, jedoch normale intrazelluläre Replikation in Caco-2 Zellen und J774 Makrophagen (Engelbrecht *et al.*, 1996).

p60-Protein

Das 60 kD-schwere p60-Protein ist vermutlich als weiterer Faktor an der Aufnahme der pathogenen Listerien in nicht-professionell phagozytische Zellen beteiligt. Dieses vom *iap*-Gen (*invasion-associated protein*) kodierte Protein wird PrfA-unabhängig exprimiert.

Das p60-Protein ist ein basisches Protein mit einer hohen positiven Ladung. Man findet p60 zum Teil oberflächengebunden, der Hauptteil wird jedoch in das Medium sekretiert (Kuhn & Goebel, 1989).

p60 konnte in allen *Listeria*-Arten nachgewiesen werden und besteht aus einer variablen mittleren Region und hoch konservierten C- und N-terminalen Bereichen. Die variable Region ist charakteristisch für jede *Listeria*-Art, weshalb p60 bzw. das *iap*-Gen zur schnellen Identifizierung einzelner *Listeria*-Spezies mittels immunologischer Methoden oder PCR herangezogen werden kann (Bubert *et al.*, 1992a, Bubert *et al.*, 1992b).

Eine Δiap -Mutante ist im Mausmodell stark attenuiert. *In vitro* war die Aufnahme in 3T6 Fibroblasten und Caco-2 Epithelzellen nur leicht verringert. Jedoch zeigte die Mutante eine stark verminderte intrazelluläre Bewegung und Zell-zu-Zell-Ausbreitung, da kein Aktinschweif mehr ausgebildet wurde (Pilgrim *et al.*, 2003).

ActA

Neben dem Aktin-vermittelten, intrazellulären Bewegungsvermögen und der Ausbreitung von Zelle zu Zelle ist ActA als bakterieller Ligand für die Erkennung des HSPG-Rezeptors auf verschiedenen Wirtszellen verantwortlich. Heparansulfat-Proteoglykane (HSPG) sind Bestandteile der extrazellulären Matrix und Plasmamembran und sind in eukaryotischen Zellen ubiquitär verbreitet. HSPGs befinden sich sowohl auf professionellen als auch auf nicht-professionellen Phagozyten und vermitteln ebenfalls die Anheftung und Invasion von *L. monocytogenes* in diese Zellen. Das Oberflächenprotein ActA besitzt in seinem N-terminalen Bereich ein Heparansulfat (HS)-Bindungsmotiv und mehrere Cluster positiv geladener Aminosäuren, die als HS-Bindedomänen fungieren könnten (Alvarez-Dominguez *et al.*, 1997). Untersuchungen an *actA*-Mutanten haben gezeigt, dass diese in ihrer Adhärenz und Invasivität aufgrund der veränderten HS-Erkennung beeinträchtigt sind, wenn auch nicht vollständig. Zudem wurde festgestellt, dass die normalerweise nicht-invasive *Listeria*-Art *L. innocua* durch heterologe Expression des *actA*-Gens in Epithelzellen eindringen konnte (Suarez *et al.*, 2001).

Ami

Ami kodiert für eine Amidase mit 917 Aminosäuren. C-terminal besitzt diese Amidase eine Zellwandverankerungs-Domäne aus GW-Modulen und am N-Terminus eine Domäne, die der des Atl-Autolysins von *Staphylococcus aureus* ähnlich ist (McLaughlan & Foster, 1998, Braun et al., 1997). Ami Deletionsmutanten sind in ihrer Virulenz attenuiert, was für eine wichtige Rolle von Ami in der Virulenz in *Listeria monocytogenes* spricht (Milohanic et al., 2001). Vermutlich dienen Autolysine/Adhäsine als primitive Kolonisierungsfaktoren, die es Bakterien ermöglichen, mit Oberflächen zu interagieren, die analoge Moleküle ihrer natürlichen Rezeptoren (Teichonsäuren oder Lipoteichonsäuren) exprimieren (Dussurget et al., 2004).

FbpA

Das Gen *fbpA* kodiert für ein 570 Aminosäuren langes Protein, das große Homologie zu den Fibronektin-Bindeproteinen PavA (*Streptococcus pneumoniae*), Fbp54 (*S. pyogenes*) und FbpA (*S. gordonii*) aufweist. Obwohl das listerielle FbpA kein typisches Signalpeptid trägt, wird es an der bakteriellen Oberfläche exprimiert. Neueste Studien zeigen, dass FbpA möglicherweise über den SecA2-Sekretionsweg exportiert wird (Dramsi et al., 2004).

Eine große Anzahl an Fibronektin-bindenden Proteinen unterstützt die Adhärenz an eukaryotische Zellen durch die Affinität zu Fibronektin. Aufgereinigtes listerielle FbpA-Protein bindet an humanes Fibronektin und könnte so die Adhärenz steigern.

Eine Inaktivierung des *fbpA*-Gens führt auf posttranskriptioneller Ebene zu einer Reduktion der LLO- und InlB-Menge. Dies führt zu der Annahme, dass FbpA als ein Chaperon fungieren kann, welches so den Abbau einiger Virulenzfaktoren verhindert. Anders als der Großteil der bekannten Virulenzfaktoren in *L. monocytogenes* wird die *fbpA*-Expression nicht durch PrfA reguliert (Dramsi et al., 2004, Dussurget et al., 2004).

2.3.3 Überleben im - und Entkommen aus dem primären Phagosom

Nach dem Eindringen in die eukaryotische Wirtszelle sind virulente Listerien im Phagosom in der Lage, die antibakteriellen Mechanismen des Wirts zu überleben und besitzen die Fähigkeit, aus dem Phagosom zu entkommen.

Superoxid-Dismutase, Katalase

L. monocytogenes ist nach der Aufnahme ins Phagosom einer Vielzahl antibakterieller Abwehrmechanismen des Wirts ausgesetzt. Dazu gehören die Ansäuerung des Phagosoms und die Bildung großer Mengen reaktiver Sauerstoffmetabolite (z.B. H₂O₂, O₂⁻, OH[•] und HOCl), die normalerweise innerhalb weniger Minuten zur Abtötung avirulenter Bakterien führen. Pathogene Listerien verfügen jedoch über die Enzyme Superoxid-Dismutase (SOD) und Katalase (KAT), mit deren Hilfe sie die toxischen Sauerstoffverbindungen in unschädliche Endprodukte umwandeln können (Brehm et al., 1992, Haas, 1993). Da diese Enzyme an der bakteriellen Verteidigung gegen die Abwehrmechanismen der eukaryotischen

Wirtszelle beteiligt sind, können sie als mögliche Virulenzfaktoren von *Listeria* angesehen werden (Chakraborty & Goebel, 1988).

Katalase-negative Mutanten sind im Mausinfektionsmodell in ihrer Virulenz nicht beeinträchtigt. Diese Mutanten produzierten aber im Gegensatz zu Katalase-positiven Stämmen eine größere Menge an Superoxid-Dismutase, um somit das Katalase-Defizit zu kompensieren (Leblond-Francillard *et al.*, 1989, Swartz *et al.*, 1991). Eine Doppelmutante, die sowohl für KAT als auch SOD defekt war, zeigte allerdings eine deutliche Virulenzminderung (Brehm *et al.*, 1992).

Listeriolysin O (LLO)

Das LLO war die erste Virulenzdeterminante, die in *Listeria* spp. identifiziert und analysiert wurde und führte zur Entdeckung des chromosomalen Virulenzgenclusters.

Listeriolysin O (LLO) ist ein extrazelluläres, Cholesterin-abhängiges, porenbildendes Hämolyysin, welches *L. monocytogenes* ermöglicht, in Zusammenarbeit mit PlcA und PlcB aus dem Phagosom der eukaryotischen Wirtszelle zu entkommen und sich zu vermehren (Bielecki *et al.*, 1990, Gedde *et al.*, 2000).

LLO gehört zur Familie der SH-aktivierbaren Zytolysine, von denen Streptolysin O (SLO) aus *Streptococcus pyogenes* der Prototyp ist (Geoffroy *et al.*, 1987). Das Hämolyysin LLO, kodiert vom *hly*-Gen, besitzt ein Molekulargewicht von 58,6 kD. Das Gen besitzt sowohl einen PrfA-abhängigen, als auch PrfA-unabhängigen Promotor (Leimeister-Wächter *et al.*, 1990, Domann *et al.*, 1993). LLO spielt als essentieller Virulenzfaktor nicht nur eine Schlüsselrolle beim Entkommen von *Listeria* aus dem primären Phagosom infizierter Zellen, sondern auch beim effizienten Entkommen aus der Doppelmembran-Vakuole, die bei der Zell-zu-Zell-Ausbreitung geformt wird (Gedde *et al.*, 2000, Portnoy *et al.*, 1988). Nach der Aufnahme in die eukaryotische Wirtszelle wird innerhalb der ersten 30 Minuten die phagosomale Membran durch das Listeriolysin zerstört. Hierbei benutzt LLO, wie alle SH-aktivierbaren Zytolysine, Cholesterin als primären Rezeptor auf der eukaryotischen Membran (Alouf, 2000). Nach der Rezeptorbindung kommt es durch Zusammenlagerung von bis zu 70 Toxinmonomeren zur Bildung eines Transmembran-Komplexes mit einer hydrophilen Pore (Palmer *et al.*, 1998, Kayal & Charbit, 2006).

Inaktivierung des *hly*-Gens führt zu einem Verlust der hämolytischen Aktivität (Kathariou *et al.*, 1987). Zudem verhielten sich diese nicht-hämolytischen Mutanten im Mausinfektionsmodell avirulent und waren nicht mehr fähig, in kultivierten Zelllinien zu wachsen. Die Überlebensrate dieser Mutanten war deutlich verringert, wohingegen ihre Aufnahme in die eukaryotischen Wirtszellen unverändert blieb (Kuhn *et al.*, 1988).

Das Wirkungsoptimum des LLO liegt bei pH 5,5. Dieses Merkmal spielt eine große Rolle für die Wirkung von LLO, welche sich auf das phagosomale Kompartiment beschränkt. Das Phagosom säuert sich kurz nach der Aufnahme von *L. monocytogenes* an. Der Abfall des pH-Wertes führt zu einer Aktivierung von LLO und somit zur Destabilisierung der Phagosomenmembran. Die Bakterien gelangen ins Zytoplasma und können sich vermehren. Durch den Ausgleich des pH-Wertes auf 7,4 - wie er im Zytoplasma vorliegt - wird LLO wieder deaktiviert. Somit wird verhindert, dass die Plasmamembran zerstört wird, die

Bakterien ins extrazelluläre Milieu gelangen und der Wirtsabwehr ausgesetzt sind (Glomski *et al.*, 2002, Beauregard *et al.*, 1997). Eine PEST-ähnliche Sequenz am N-Terminus von LLO sorgt möglicherweise für einen schnellen Abbau des Toxins im Zytoplasma. PEST-ähnliche Sequenzen markieren eukaryotische Proteine für den Proteasom-abhängigen Abbau. Eine Deletion dieser Sequenz führt zu einer erhöhten Zytotoxizität und zu einer abgeschwächten Virulenz (Schnupf *et al.*, 2006, Lety *et al.*, 2001, Decatur & Portnoy, 2000).

Phosphatidylinositol-spezifische Phospholipase C (PI-PLC)

Listeria monocytogenes sekretiert zwei Phospholipasen C: PI-PLC (PlcA) und PC-PLC (PlcB). Diese Phospholipasen sind, wie das LLO, an dem Entkommen aus dem primären und sekundären Phagosom beteiligt (Goldfine & Wadsworth, 2002). Jede dieser zwei listeriellen Phospholipasen C ist für die Virulenz von Bedeutung, da Einzel- und Doppelmутanten virulenzattenuiert sind (Smith *et al.*, 1995).

PI-PLC, oder auch PlcA genannt, ist ein 33 kD-schweres, sekretiertes Protein, das eine hohe Substratspezifität für Phosphatidylinositol (PI) besitzt. Es wird vom Gen *plcA* kodiert und unterliegt der PrfA-Regulation (Leimeister-Wachter *et al.*, 1991). Das pH-Wirkungsoptimum liegt zwischen 5,5 und 6,5, was mit der enzymatischen Aktivität im Phagosom im Einklang steht (Goldfine & Knob, 1992).

Eine *plcA*-negative Mutante zeigte einen leichten Rückgang der Virulenz im Mausinfektionsmodell und ein weniger effizientes Entkommen aus dem Phagosom, verglichen mit dem Wildtyp (Camilli *et al.*, 1991). Die Zerstörung des Phagosoms wird vermutlich durch das Zusammenwirken von PI-PLC und LLO bewirkt. Die Phospholipase könnte den Zugang zur phagosomalen Membran durch Hydrolyse membranständiger Proteine und damit die Lyse des Phagosoms durch LLO erleichtern (Sheehan *et al.*, 1994).

2.3.4 Vermehrung und Verbreitung im Zytoplasma

Nach dem Verlassen des Phagosoms kommt es im Zytoplasma der Wirtszelle zu einer Vermehrung der Bakterien. Das Wirtszellaktin wird rekrutiert und zu einem Aktinschweif geformt. Mit Hilfe dieses Aktinschweifs können sich die Bakterien intrazellulär fortbewegen und benachbarte Zellen infizieren.

Hexose-Phosphat-Transporter UhpT

Das *uhpT*-Gen kodiert für einen Hexose-Phosphat-Transporter, der signifikante Homologien zum Glukose-6-Phosphatase-Enzym-Komplex bei Säugern aufweist (Chico-Calero *et al.*, 2002b). In Säugern dient der Enzym-Komplex dem Transport von Glukose-6-Phosphat vom Zytosol in das ER, wo es zur Umwandlung in Glukose kommt.

Es konnte gezeigt werden, dass die zwei pathogenen Listerien-Arten *L. monocytogenes* und *L. ivanovii* in der Lage sind, Glukose-6-Phosphat bzw. Glukose-1-Phosphat zu verwerten, während nicht-pathogene Listerien-Arten dazu nicht fähig sind. Da Glukose-1-Phosphat im Zytoplasma der Wirtszelle zur Verfügung steht (Glykogen = Glukosespeicher), lässt dies

darauf schließen, dass der Mechanismus der Glukose-1-Phosphat-Verwertung eine wichtige Rolle bei der intrazellulären Lebensweise von Listerien spielt. Diese Glukose-1/6-Phosphat-Verwertung ist strikt PrfA-abhängig und wird zusammen mit den anderen Virulenzfaktoren PrfA-abhängig reguliert (Ripio *et al.*, 1997a). Ein Verlust der UhpT-Produktion resultiert in einer verminderten Virulenz und in einer verringerten Replikationsrate im eukaryotischen Zytosol. Die verringerte, aber dennoch vorhandene Replikation einer *uhpT*-Mutante zeigt, dass das Zytoplasma noch weitere Kohlenstoffquellen für das bakterielle Wachstum zur Verfügung stellt (Chico-Calero *et al.*, 2002b). Die Expression von UhpT in *Listeria innocua* führt jedoch nicht, wie in *Listeria monocytogenes*, zu einer effizienten Replikation. Es scheint, dass die Aufnahme von Hexose-Phosphat nicht die einzige physiologische Determinante für eine effiziente Replikation der Listerien im Zytoplasma der Wirtszelle ist (Slaghuis *et al.*, 2004, Goetz *et al.*, 2001).

Die Glukose-1-Phosphat-Verwertung steigert das bakterielle Wachstum, ohne die Virulenzgenexpression zu reprimieren, wie z.B. fermentierbare Zucker dies tun (siehe Abschnitt 2.5.4). Da hauptsächlich Glukose-1-Phosphat den intrazellulären Bakterien als Kohlenstoff-, Energie- und Phosphat-Quelle dient, ist eine Anpassung der Bakterien zur Aufnahme dieses Zuckers notwendig, um im Zytoplasma replizieren zu können. Glukose-1-Phosphat ist ein Abbauprodukt des Glykogens und wird kontinuierlich ins Zytoplasma freigegeben (Massillon *et al.*, 1995). Interessanterweise spielen Hepatozyten, die einen der höchsten Prozentsätze (8 % - 10 %) an Glykogen besitzen, eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der Listerien (Sheehan *et al.*, 1994).

Der Hexose-Phosphat-Transporter UhpT ist auch in anderen fakultativ intrazellulären Bakterien zu finden, wie z.B. in *Salmonella enterica*, *Shigella flexneri* und dem obligat intrazellulären Bakterium *Chlamydia trachomatis* (Moulder, 1991).

ActA

Das Oberflächenprotein ActA trägt als einziges listerielles Protein entscheidend zur Fortbewegungsfähigkeit der Listerien im Zytoplasma der Wirtszelle bei und vermittelt dadurch die Ausbreitung der Bakterien von Zelle zu Zelle (Kocks *et al.*, 1992). Durch die ActA-Expression ist die apathogene Art *Listeria innocua* fähig, sich fortzubewegen (Kocks *et al.*, 1995).

Das Gen *actA* kodiert für das 67 kD-schwere Protein ActA, das überwiegend oberflächengebunden vorliegt, aber auch im Kulturüberstand nachgewiesen werden kann.

Das ActA-Protein besitzt drei Domänen, die essentiell für seine Wirkung sind. Im N-terminalen Bereich befindet sich zum einen ein Signalpeptid und zum anderen eine Region, die notwendig für die Nukleation von Aktinfilamenten und die damit verbundene listerielle Fortbewegung ist (Lasa *et al.*, 1997). Im Mittelteil des Proteins liegt eine Prolin-reiche Repeat-Region, die VASP (vasodilator-stimulated protein) binden kann (Geese *et al.*, 2002, Niebuhr *et al.*, 1997). Der hydrophobe C-terminale Bereich dient als Membrananker, der ActA nach der Sekretion an die bakterielle Oberfläche bindet (Kocks *et al.*, 1992).

actA-Deletionsmutanten wachsen in infizierten Zellen in Mikrokolonien, da sie nicht mehr in der Lage sind, Wirts-Aktin zu rekrutieren, keinen Aktinschweif ausbilden können und sich somit nicht mehr im Zytoplasma ausbreiten können. Zusätzlich zeigen diese Mutanten eine

abgeschwächte Virulenz, da eine Zell-zu-Zell-Ausbreitung nicht mehr möglich ist (Domann *et al.*, 1992, Brundage *et al.*, 1993).

Sobald die Listerien aus dem Phagosom entkommen sind, werden sie von einem Saum aus zellulären Aktinfilamenten umgeben, die nach zwei Stunden zu einem kometenartigen Aktinschweif ("comet tail") reorganisiert werden (Tilney & Portnoy, 1989).

Direkt an einem Zellpol des Bakteriums findet eine kontinuierliche Anlagerung von Aktinmonomeren statt, die das Bakterium in Richtung des ActA-freien Zellpols vorwärts drückt. Mit Hilfe des Aktinschweifs können sich die Listerien nun im Zytoplasma fortbewegen. Die intrazelluläre Fortbewegungsgeschwindigkeit ist dabei proportional zur Rate der Aktinpolymerisation bzw. zur Länge des Aktinschweifs und kann Werte bis 1,5 µm/s erreichen (Theriot *et al.*, 1992, Sanger *et al.*, 1992, Mounier *et al.*, 1990).

Der N-terminale Bereich (31-263 Aminosäuren) ist allein für die bakterielle Bewegung verantwortlich (Lasa *et al.*, 1995). Dieser Bereich zeigt strukturelle und funktionelle Ähnlichkeit mit Proteinen aus der WASP/N-WASP Familie und interagiert mit dem aktiven, eukaryotischen Arp2/3 Multienzymkomplex (Skoble *et al.*, 2000, Boujemaa-Paterski *et al.*, 2001). Der Arp2/3 Multienzymkomplex besteht aus sieben Proteinen und ist in der Lage, die *de novo*-Aktin-Nukleation zu stimulieren und ein Netzwerk aus Aktinfilamenten aufzubauen (Welch *et al.*, 1998, Welch *et al.*, 1997). Eine weitere wichtige, aber nicht essentielle eukaryotische Komponente, das VASP, bindet an den Prolin-reichen Bereich im ActA-Protein und beeinflusst auf noch ungeklärte Weise die bakterielle Motilitätsrate. Ein Fehlen von VASP führt zu einer 10-fachen Verringerung in der Motilitätsrate (Geese *et al.*, 2002, Samarin *et al.*, 2003, Laurent *et al.*, 1999).

2.3.5 Zell-zu-Zell-Ausbreitung

Die Aktin-vermittelte Bewegung der Listerien im Zytoplasma ermöglicht auch die Ausbreitung in benachbarte Zellen. Gelangen die Bakterien an die Peripherie der Zellen, werden sie über pseudopodienartige Ausstülpungen von der Nachbarzelle endozytiert und gelangen so - umhüllt von einer Doppelmembran - in eine neue Wirtszelle. Nach Lyse der Doppelmembran liegen die Listerien im Zytoplasma vor und können dort einen neuen Vermehrungs- und Verbreitungszyklus beginnen.

Lecithinase (PC-PLC)

Die Lecithinase ist neben der schon beschriebenen PI-PLC (siehe Abschnitt 2.3.3) eine weitere Phospholipase C von *L. monocytogenes*. Das *plcB*-Gen kodiert ein 33 kD-schweres Proenzym PlcB (inaktive Form). Um Schäden an der bakteriellen Membran zu vermeiden, wird die PI-PLC als inaktives Proenzym (33 kD) sekretiert und durch eine listerielle Metalloprotease in die aktive Form mit 29 kD überführt (Marquis *et al.*, 1997).

Die PC-PLC von *L. monocytogenes* besitzt ein breites Wirkungsspektrum und hydrolysiert nicht nur Phosphatidylcholin (Lecithin), sondern auch Phosphatidylserin (PS), Phosphatidylethanolamin (PE) und in geringem Maße Sphingomyelin. Phosphatidylinositol (PI) wird allerdings nicht oder nur sehr schwach hydrolysiert (Geoffroy *et al.*, 1991). Die

Lecithinase ist Zink-abhängig und über einen weiten pH-Bereich von 5,5 bis 8,0 aktiv (Marquis & Hager, 2000).

Eine in-frame *plcB*-Deletionsmutante zeigt im Mausmodell eine verringerte Virulenz und kann sich nicht mehr in benachbarte Zellen ausbreiten. Es konnte nach einer Infektion eine Anhäufung von Bakterien in Vesikeln mit Doppelmembran beobachtet werden. Beim Entkommen aus dem primären Phagosom waren sie allerdings nicht vom Wildtyp zu unterscheiden. Die Lecithinase scheint somit hauptsächlich für eine effiziente Lyse des sekundären Phagosoms wichtig zu sein (Smith *et al.*, 1995, Vazquez-Boland *et al.*, 1992).

Metalloprotease

Die Zink-abhängige Metalloprotease von *L. monocytogenes* ist ein 57,4 kD-schweres Enzym und Produkt des *mpl*-Gens. Sie besitzt eine N-terminale Signalsequenz und weist große Homologien zu sekretierten Metalloproteasen anderer Bakterien auf. Im Kulturüberstand findet man ein 60 kD-großes *mpl*-Produkt, das wahrscheinlich eine inaktive Proform der Protease darstellt (Domann *et al.*, 1991).

Eine Transposoninsertion im *mpl*-Gen führte zu einer reduzierten Virulenz und ist durch eine geringere Lecithinaseproduktion gekennzeichnet. Im Kulturüberstand dieser Bakterien fand man nur noch die 33 kD-Proform des Lecithinasepolypeptids. Diese Beobachtung legte die Vermutung nahe, dass die Metalloprotease für die Reifung der PC-PLC benötigt wird und diese erst nach proteolytischer Spaltung der inaktiven 33 kD-Form in das aktive 29 kD-Enzym überführt wird (Poyart *et al.*, 1993, Raveneau *et al.*, 1992).

2.3.6 Neue Virulenzfaktoren in *Listeria monocytogenes*

Vergleichende Genomstudien haben die Identifizierung putativer Virulenzgene in *L. monocytogenes* ermöglicht. Jedoch ist eine funktionelle Analyse dieser Gene in Bezug auf die Virulenz und während des Infektionszyklus notwendig (Dussurget *et al.*, 2004). Zu diesen neu entdeckten Virulenzdeterminanten zählen: **Auto**, **Vip** und **BSH**.

Auto ist ein Oberflächenprotein mit einer autolytischen Aktivität. Es ist in der apathogenen Art *L. innocua* nicht vorhanden. Das Auto-Protein besitzt am C-Terminus eine GW-Domäne zur Zellwandverankerung, ähnlich wie das Autolysin Ami und InlB (siehe Abschnitt 2.3.2). Dieses Autolysin wird durch das *aut*-Gen kodiert und PrfA-unabhängig exprimiert. Die Inaktivierung von *aut* führt zu einer verringerten Invasivität von *L. monocytogenes* in einigen Epithel- und Fibroblasten-Zelllinien (Cabanes *et al.*, 2004).

Vip ist ein LPXTG-Oberflächenprotein, das mittels der Sortase A an der Zellwand von *L. monocytogenes* verankert wird. Gp96, ein eukaryotisches Chaperonprotein, was hauptsächlich im endoplasmatischen Retikulum, aber auch auf der Zelloberfläche exprimiert wird, wurde als zellulärer Rezeptor von Vip identifiziert (Cabanes *et al.*, 2005, Li *et al.*, 2002). Vip ist für die Invasion in einige Zelllinien erforderlich, dabei spielt die Vip-Gp96-Interaktion eine wichtige Rolle (Cabanes *et al.*, 2005).

Der Vergleich des *L. monocytogenes*-Genoms mit dem von *L. innocua* offenbarte das Vorhandensein eines putativen Gens, das für **BSH**, eine Gallensalz-Hydrolase (bile salt hydrolase), kodiert. Das listerielle *bsh*-Gen steht unter der Kontrolle des Sigmafaktors B, wird

PrfA-abhängig transkribiert (Sue *et al.*, 2003, Dussurget *et al.*, 2002) und kann nur in pathogenen *Listeria ssp.* nachgewiesen werden. Eine Inaktivierung des *bsh*-Gens in *L. monocytogenes* führt *in vitro* zu einer verringerten Resistenz gegenüber Gallensalzen (Begley *et al.*, 2005). *In vivo* führt diese Deletion zu einer verringerten Kolonisation der Leber und zu einer reduzierten Virulenz im Mausmodell (Dussurget *et al.*, 2002).

2.4 Organisation der Virulenzgene von *Listeria monocytogenes*

Die Virulenzfaktoren, involviert in die unterschiedlichen Schritte des Infektionszyklus (siehe Abschnitt 2.3.1), werden größtenteils von dem 9,6 kb-großen, chromosomalen Virulenzgencluster kodiert (siehe Abb. 2.2) (Portnoy *et al.*, 1992). Die koordinierte Expression dieses Virulenzgenclusters wird durch den positiven, pleiotropen Regulationsfaktor PrfA (*positive regulatory factor A*) kontrolliert, der selber Bestandteil des Clusters ist (Chakraborty *et al.*, 1992). Dieses Virulenzgencluster wird, da es eine kompakte genetische Einheit ist und Merkmale einer Pathogenitätsinsel aufweist, auch als *Listeria*-Pathogenitätsinsel 1 (LIPI-1) bezeichnet (Kreft *et al.*, 2002). Das Virulenzgencluster in Abb. 2.2 besteht aus dem *hly*-Gen, dem *plcA-prfA*-Operon und dem 5,7 kb-großen Lecithinase-Operon mit den Genen *mpl*, *actA*, *plcB* und zwei weiteren offenen Leserastern (ORFX und Z) mit unbekannter Funktion. Die zwei Haushaltsgene *prs* und *ldh* flankieren das Virulenzgencluster.

Darüber hinaus wird die Transkription weiterer listerieller Gene, die sich außerhalb des Virulenzgenclusters befinden, ebenfalls durch PrfA koordiniert (siehe Abb. 2.2). Dazu zählen unter anderem die Internalingene *inlA*, *inlB* und *inlC*, das *bsh* Gen und das Gen für den Hexose-Phosphat-Transporter *uhpT* (Kreft & Vázquez-Boland, 2001, Chico-Calero *et al.*, 2002b).

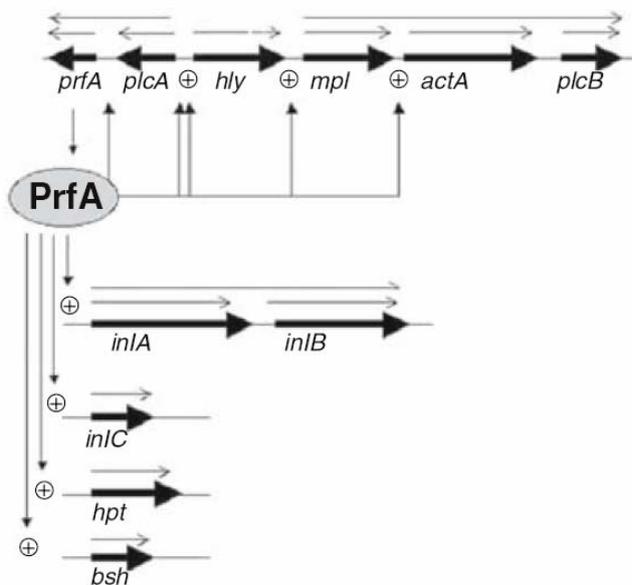


Abb. 2.2: Transkriptionelle Organisation der PrfA-abhängigen Virulenzgene in *L. monocytogenes* (Springer, 2007).

Die Pfeile stellen die in Abschnitt 2.3 beschriebenen Virulenzgene dar. Über den jeweiligen Genen sind die zugehörigen Transkripte in Form von schwarzen Pfeilen gezeigt; + kennzeichnet die transkriptionelle Induktion durch PrfA.

prfA: PrfA (positive regulatory factor A); *plcA*: Phosphatidylinositol-spezifische Phospholipase C (PI-PLC); *hly*: Listeriolysin O (LLO); *mpl*: Metalloprotease; *actA*: Oberflächenprotein ActA; *plcB*: Lecithinase, Phospholipase C (PC-PLC); *inlA*: Internalin A; *inlB*: Internalin B; *inlC*: Internalin C; *hpt*: Hexose-Phosphat-Transporter HpT und *bsh*: Gallensalz-Hydrolase.

Die Transkription von *hly* erfolgt monocistronisch ausgehend von zwei PrfA-abhängigen Promotoren (Chakraborty *et al.*, 1992). Es existiert aber auch ein von PrfA unabhängiger Promotor, der zur Produktion geringer Mengen an *hly*-Transkript führt (Domann *et al.*, 1993). Das *plcA*-Gen wird entweder monocistronisch oder zusammen mit *prfA* bicistronisch transkribiert (Mengaud *et al.*, 1991a) (siehe auch Kapitel 2.5.3). Die Gene des Lecithinase-Operons (*mpl*, *actA*, *plcB*, ORFX und ORFZ) werden entweder gemeinsam als 5,7 kb-große mRNA unter der Kontrolle des *mpl*-Promotors transkribiert oder getrennt als ein Transkript für *mpl* und ein bicistronisches Transkript für *actA* und *plcB*.

Die großen Internaline *inlA* und *inlB* sind in einem Operon organisiert, das außerhalb des Virulenzgenclusters liegt. Ihre Transkription erfolgt in Form von monocistronischer *inlA*- und bicistronischer *inlA/B*-mRNA über mehrere Promotoren, die nur zum Teil PrfA-abhängig sind (Lingnau *et al.*, 1995, Sheehan *et al.*, 1995). *inlA* und *inlB* können auch noch durch den Sigmafaktor B positiv reguliert werden (Kazmierczak *et al.*, 2003).

Das Gen für das kleine Internalin InlC wird als monocistronische mRNA von einem PrfA-abhängigen und einem PrfA-unabhängigen Promotor transkribiert (Engelbrecht *et al.*, 1996, Luo *et al.*, 2004).

2.5 Regulation der Virulenzgenexpression

Für eine erfolgreiche Invasion, das Überleben innerhalb der eukaryotischen Wirtszelle und die Ausbreitung im infizierten Organismus, benötigt *L. monocytogenes* eine Reihe von Virulenzfaktoren. Die koordinierte Regulation dieser Virulenzgene erfolgt durch das Regulatorprotein PrfA. PrfA aktiviert die Expression aller Gene des LIPI-1 Virulenzgenclusters (*prfA*, *plcA*, *hly*, *mpl*, *actA* und *plcB*) (Chakraborty *et al.*, 1992) sowie die Gene *inlA* und *inlB* (Lingnau *et al.*, 1995), *inlC* (Engelbrecht *et al.*, 1996), *bsh* (Dussurget *et al.*, 2002) und *uhpT* (Chico-Calero *et al.*, 2002b).

2.5.1 PrfA-abhängige Promotoren

PrfA-abhängige Gene besitzen in ihrem Promotorbereich eine konservierte, palindromische 14 bp-große Bindestelle für PrfA, die sog. PrfA-Box (5'-TTAACA NN TGTTAA-3'; NN=AA, TT). Die PrfA-Box befindet sich etwa an Position -41,5 und überlappt mit der -35-Region. Eine PrfA-abhängige Aktivierung der Virulenzgene erfordert die Bindung von PrfA (vermutlich als Dimer) mittels seines HTH-Motivs an die PrfA-Box (Sheehan *et al.*, 1996, Freitag *et al.*, 1993). Durch *in vitro*-Transkriptionsstudien konnten weitere wichtige Eigenschaften eines PrfA-abhängigen Promotors definiert werden. Ein besonders wichtiges Merkmal ist der Abstand zwischen der PrfA-Box und der -10-Box. Dieser Abstand beträgt im Idealfall 22 oder 23 bp und spielt eine große Rolle für die Funktionalität des Promotors. Das aus *E. coli* aufgereinigte PrfA aktiviert ohne zusätzliche Faktoren die Initiation der Transkription *in vitro* an PrfA-abhängigen Promotoren (Lalic-Mülthaler *et al.*, 2001, Luo *et al.*, 2004, Luo *et al.*, 2005).

Ebenfalls von großer Bedeutung für die Funktionalität des Promotors ist die Abweichung der PrfA-Box zur Konsensussequenz (siehe Tab. 2.1). Die Sequenzen der PrfA-Boxen

unterscheiden sich in den einzelnen Promotorbereichen. Die PrfA-Boxen der Gene *hly* und *plcA* entsprechen der oben beschriebenen Konsensussequenz. Dagegen zeigen die PrfA-Boxen der anderen Virulenzgene (*actA*, *mpl*, *inlC*, *uhpT*, *inlA* *bsh* und *prfA*) 1 - 3 Basenaustausche.

DNaseI-Footprintexperimente und EMSAs (electro mobility shift assays) haben gezeigt, dass PrfA spezifisch, aber mit unterschiedlicher Affinität, an die PrfA-Box eines PrfA-abhängigen Promotor bindet (Böckmann *et al.*, 1996). Dabei wird die Bindungsaffinität von PrfA durch die Konsensussequenz der PrfA-Box beeinflusst und ist umso größer, je genauer das Palindrom mit der oben angegebenen Konsensussequenz übereinstimmt. So kann durch die unterschiedliche Bindungsaffinität von PrfA eine zeitliche Aktivierung von Virulenzgenen erfolgen. Gene mit Promotoren hoher Affinität (z.B. *hly* und *plcA*) werden schon bei niedriger PrfA-Konzentration aktiviert, Promotoren mit geringer Affinität (z.B. *mpl* und *actA*) benötigen jedoch eine größere Menge an PrfA (Bohne *et al.*, 1994, Sheehan *et al.*, 1995).

Gen	PrfA-Box	Basenaustausche	Spacer	-10-Box
<i>prfA</i>	a TAACA AT TGTT gt	3	21 bp	TATTTT
<i>plcA</i>	TTAACA AA TGTTAA	0	22 bp	TAAGAT
<i>hly</i>	TTAACA TT TGTTAA	0	23 bp	TAGAAT
<i>mpl</i>	TTAACA AA TGT a AA	1	22 bp	TATAAT
<i>actA</i>	TTAACA AA TGTT ag	1	21 bp	GATAAT
<i>plcB</i>	-		-	-
<i>inlA</i>	a TAACA TA a GT T AA	2	22 bp	TATTAT
<i>inlC</i>	TTAAC g CT TGTTAA	1	22 bp	TAACAT
<i>uhpT</i>	a TAACA AG TGTTAA	1	23 bp	TATATT
<i>bsh</i>	TTAA a A AT T t TTAA	2	30 bp	TATGAG

Tab. 2.1: Promotorregion PrfA-regulierter Virulenzgene in *L. monocytogenes*. Abweichungen von der Konsensussequenz der PrfA-Box sind mit kleinen Buchstaben fett dargestellt (nach (Kreft & Vázquez-Boland, 2001))

2.5.2 PrfA – der zentrale Regulator der Virulenzgene in *L. monocytogenes*

PrfA (*positive regulatory factor A*), ein 27 kD-schweres DNA-Bindeprotein, ist für die differentielle Expression der Virulenzgene in *Listeria monocytogenes* verantwortlich. Eine PrfA-negative Mutante zeigt keine Expression der LIPI-1 Gene und ist avirulent (Chakraborty *et al.*, 1992).

Aufgrund funktioneller und struktureller Ähnlichkeit mit dem cAMP-Bindeprotein Crp aus *E. coli* wird PrfA in die Crp/Fnr-Familie globaler Transkriptionsregulatoren eingeordnet (Lampidis *et al.*, 1994, Korner *et al.*, 2003). In *E. coli* und anderen Gram-negativen Bakterien ist Crp der Hauptregulator in der Kohlenstoff-Katabolitrepression (KKR) und fungiert dort als cAMP-Rezeptorprotein (Kolb *et al.*, 1993). Der Verlust von Crp führt in *Salmonella* und *Shigella* ssp. zu einer verminderten Virulenz (Teplitski *et al.*, 2006, Rosu *et al.*, 2007).

In Gram-positiven Bakterien gehört PrfA zu dem am besten charakterisierten Mitglied der Crp/Fnr-Familie. Srv aus *Streptococcus pyogenes*, Ers aus *Enterococcus faecalis* und Flp aus *Lactobacillus casei* sind weitere Mitglieder dieser Familie in Gram-positiven Bakterien. Deletionen von *ers* bzw. *srv* zeigen eine verminderte Virulenz (Reid *et al.*, 2003, Irvine & Guest, 1993, Giard *et al.*, 2006).

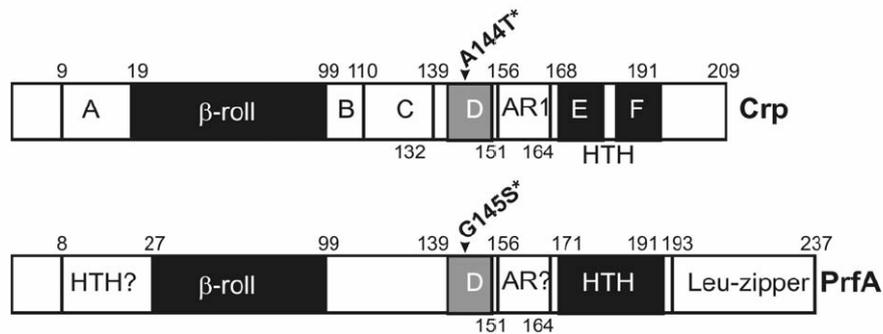


Abb. 2.3: Schematischer Vergleich von Crp aus *E. coli* und PrfA aus *L. monocytogenes* (Vázquez-Boland *et al.*, 2001). Die Zahlen geben die Aminosäure an, mit der eine Domäne beginnt und endet. HTH: Helix-Turn-Helix Motiv; A-D: alpha-Helices; β-roll: beta-Faltblattstrukturen; AR: Aktivierungsregion in Crp; AR?: Bereich im PrfA mit Homologie zur AR in Crp; Leu-zipper: Leucinzipper. Die Gly-Ser-Basensubstitution in PrfA bzw. Ala-Thr-Substitution in Crp, die zu einem konstitutiv aktiven PrfA bzw. Crp führen sind ebenfalls aufgeführt.

In Abb. 2.3 ist der Vergleich von PrfA aus *Listeria monocytogenes* und Crp aus *E. coli* dargestellt. Obwohl die eigentliche Aminosäuresequenz von Crp und PrfA nur eine Homologie von 20 % aufweist, besteht dennoch eine hohe strukturelle Ähnlichkeit zwischen den beiden regulatorischen Proteinen. Im N-terminalen Bereich besitzen beide Proteine zahlreiche β-Faltblattstrukturen, die durch Glycin-Reste unterbrochen sind. In Crp dient dieser Bereich der Bindung des Cofaktors cAMP. Da cAMP in Gram-positiven Bakterien nicht detektiert werden konnte und eine Funktion als intrazellulärer Bote nicht bekannt ist, ist es nicht verwunderlich, dass die Aminosäuresequenz für die cAMP-Bindung in PrfA nicht konserviert ist. Auch die Zugabe von exogenem cAMP führt nicht zu einer gesteigerten Transkriptionsaktivierung in *L. monocytogenes* (Vega *et al.*, 1998). Die Funktion dieser Region ist bisher unbekannt. Im C-Terminus besitzt PrfA ein Helix-Turn-Helix (HTH) DNA-Bindemotiv mit einer 70 %igen Homologie zum HTH-Motiv in Crp.

In einigen Bereichen zeigt PrfA allerdings auch Besonderheiten auf, die bei keinem anderen Mitglied in ähnlicher Weise vorhanden sind. Im Unterschied zu Crp besitzt PrfA im N-Terminus ein zusätzliches Helix-Turn-Helix-Motiv, dessen Funktion noch unklar ist. Des Weiteren weist PrfA in der C-terminalen Region eine Leucin-Zipper-Struktur auf, die normalerweise der Protein-Protein-Interaktion dient und für die Dimerisierung von PrfA verantwortlich sein könnte (Herler *et al.*, 2001). Eine Deletion dieses Bereichs führt zur Inaktivierung von PrfA (Lampidis *et al.*, 1994). Mutationen im Bereich des Leucin-Zippers und des HTH-Motivs führen dazu, dass PrfA nicht mehr in der Lage ist, an die Ziel-DNA zu binden. Mutationen in der Beta-Faltblatt-Struktur ermöglichen zwar noch eine Bindung von

PrfA an die DNA, jedoch ist die Bildung eines stabilen PrfA-RNA-Polymerase-Komplexes und somit die Initiation der Transkription *in vitro* nicht mehr möglich (Herler *et al.*, 2001). In der Literatur sind zahlreiche Punktmutationen beschrieben, die zu konstitutiv aktiven PrfA-Proteinen (PrfA*) führen, welche unempfindlich gegenüber einer Vielzahl von Umweltsignalen sind (Shetron-Rama *et al.*, 2003, Vega *et al.*, 2004, Wong & Freitag, 2004). Eine Gly145Ser-Substitution führt z.B. zu einem solch konstitutiv aktiven PrfA*. Der Stamm mit dem PrfA* zeigt eine konstitutive Überexpression aller PrfA-abhängigen Gene von LIPI-1, unabhängig von den gegebenen Umweltbedingungen (Bohne *et al.*, 1996, Ripio *et al.*, 1997b). Diese Beobachtungen erinnern an die Crp-Mutante Crp* aus *E. coli*, in der Crp ohne den aktivierenden Kofaktor cAMP schon in einer transkriptionell aktiven Konformation vorliegt. Dieser Effekt beruht auf einer Ala-Thr-Substitution, die wie die Gly146Ser-Substitution im PrfA* an gleicher Stelle vorzufinden ist. Die Basensubstitution führt zu einer dramatischen Konformationsänderung im PrfA, die zu einer erhöhten DNA-Bindungsaffinität führt (Eiting *et al.*, 2005b).

2.5.3 Regulation der *prfA*-Synthese

prfA bildet zusammen mit *plcA* das *plcA-prfA*-Operon und wird entweder monocistronisch von seinen eigenen Promotoren oder bicistronisch über den *plcA*-Promotor transkribiert. Während der exponentiellen Wachstumsphase wird hauptsächlich das bicistronische Transkript gebildet, jedoch zum Ende dieser Wachstumsphase nimmt die Menge des bicistronischen Transkripts ab und die Bildung von monocistronischen *plcA*- und *prfA*-Transkripten liegt im Vordergrund. PrfA stimuliert als positiver Regulator die Transkription von *plcA* und fördert somit durch Kotranskription mit *plcA* seine eigene Synthese (Autoregulation) (Mengaud *et al.*, 1991a).

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 redundant. Eine Transkription, ausgehend von diesen Promotoren, führt zu der Bildung von 0,9- und 0,8 kb-großen monocistronischen Transkripten. Eine weitere Transkription erfolgt über den *plcA*-Promotor durch die Bildung der bicistronischen *plcA-prfA*-mRNA (Freitag & Portnoy, 1994, Freitag *et al.*, 1993). *In vivo*- und *in vitro*-Studien zeigen, dass der *prfAP2* Promotor mit Hilfe des Sigma Faktors B transkribiert wird (Nadon *et al.*, 2002, Rauch *et al.*, 2005). Es besteht eine mögliche Verbindung zwischen PrfA und dem Sigmafaktor B (SigB), da weitere PrfA-aktivierte Gene eine mögliche SigB-Bindestelle in ihrem Promotorbereich besitzen (Milohanic *et al.*, 2003).

2.5.4 Einfluss von Umweltfaktoren auf die Virulenzgenexpression

Da die Expression der Virulenzgene beim Wachstum in der Natur (saprophytische Lebensweise), dem natürlichen Habitat von *L. monocytogenes*, nicht essentiell ist, und eine Transkription dieser Gene erst bei Infektion eines geeigneten Wirts nötig ist, besitzt *L. monocytogenes* Mechanismen, um die Genexpression den gegebenen Umweltbedingungen anzupassen. Eine große Anzahl von physikochemischen Parametern wie z.B. Temperatur,

Osmolarität, Eisenkonzentration und Nährstoffangebot beeinflussen die Aktivität von PrfA und damit die Virulenzgenexpression in *Listeria monocytogenes*.

Eine geringe Eisen-Konzentration und eine hohe Osmolarität, also Parameter, welche die Konditionen im Wirtsorganismus reflektieren, haben eine gesteigerte Virulenzgenexpression zur Folge. Im Vollmedium BHI findet bei 37°C nur eine schwache Transkription der Virulenzgene statt. Wird das BHI-Medium mit Aktivkohle oder Amberlite[®] XAD-4 versetzt, kommt es bei normalem Wachstum zu einer erhöhten Expression der Virulenzgene (Kreft & Vázquez-Boland, 2001).

Die Verwertung der verschiedensten Kohlenstoffquellen hat einen bemerkenswerten Einfluß auf die Virulenzgenexpression. Cellobiose und andere fermentierbare unphosphorylierte Zucker wie z.B. Glukose, Mannose oder Fruktose führen in verschiedenem Maße zu einer reduzierten Transkription der Virulenzgene (Park & Kroll, 1993, Milenbachs *et al.*, 1997, Gilbreth *et al.*, 2004). Die PrfA-abhängige Aufnahme von Glukose-1-Phosphat und der Abbau dieser Kohlenstoffquelle führen nicht, wie die fermentierbaren Zucker, zu einer verringerten PrfA-Aktivität (Ripio *et al.*, 1997a). Dieser inhibitorische Mechanismus, ausgehend von fermentierbaren Zucker, führt zu einer Repression der PrfA-Aktivität. Interessanterweise zeigt die Verwertung von Cellobiose keine Verringerung in der PrfA-Expression selber. Das lässt vermuten, dass PrfA posttranskriptional modifiziert wird und zwischen einer aktiven und inaktiven Form wechseln kann. Unterstützt wird diese Hypothese durch die strukturelle und funktionelle Ähnlichkeit von PrfA mit dem Crp, wo cAMP, eine niedermolekulare Komponente, Crp in den aktiven Zustand überführt. Dies lässt mutmaßen, dass die PrfA-Aktivität durch die Bindung eines kleinen Moleküls moduliert werden kann. PrfA besitzt, obwohl nicht an gleicher Stelle, wie Crp eine Tasche, die eine Bindung von einer kleinen, partial hydrophoben, möglicherweise auch aromatischen Komponente ermöglicht (Eiting *et al.*, 2005b, Ermolaeva *et al.*, 2004, Vega *et al.*, 1998). Eine PrfA*-Mutante ist, wie Crp*, konstitutiv aktiv und unempfindlich gegenüber verschiedenen Umweltbedingungen (Kreft & Vázquez-Boland, 2001, Bohne *et al.*, 1996).

Ein weiterer wichtiger Parameter in der Regulation der PrfA-abhängigen Virulenzgenexpression ist die Temperatur. Ein Temperatur-Shift von 30°C (Temperatur in der Natur) auf 37°C (Körpertemperatur eines Warmblüters) resultiert in einer Hochregulation der Virulenzgene in *Listeria monocytogenes* (Leimeister-Wächter *et al.*, 1992). Die verringerte Virulenzgenexpression bei niedrigen Temperaturen resultiert aus einer geringen Menge an PrfA-Protein, obwohl das *prfA* Gen transkribiert wird (Leimeister-Wächter *et al.*, 1992, Renzoni *et al.*, 1997). Bei Temperaturen unter 30°C wird *prfA*, ausgehend von seinem eigenen Promotor, monocistronisch transkribiert. Dagegen erfolgt die Transkription von *prfA* bei 37°C sowohl von seinem eigenen als auch von dem PrfA-abhängigen *plcA*-Promotor. Bei 30°C bildet die untranslatierte mRNA Region (UTR) des *prfA*s eine Sekundärstruktur, die die Ribosomenbindungsstelle für die Translation blockiert. Erst bei einer Temperatur von 37°C wird diese Sekundärstruktur destabilisiert und eine Translation möglich. Die Expression von PrfA, dem positiven Transkriptionsfaktor der Virulenzgene, ist thermoreguliert (Johansson *et al.*, 2002).

2.6 Das bakterielle Phosphoenolpyruvat-Phosphotransferase-System (PEP-PTS)

Bakterien haben zahlreiche Mechanismen für den Transport hydrophiler Verbindungen über die Membran entwickelt. Das Phosphoenolpyruvat-Phosphotransferase-System (PEP-PTS) gilt als ein Transportsystem, das nur auf die bakterielle Welt beschränkt und auch innerhalb dieser nicht ubiquitär verbreitet ist (Paulsen *et al.*, 2000a).

Die Aufnahme über das PEP-PTS ist gleichzeitig mit der Phosphorylierung des Substrates verbunden. Die Energie für diesen Prozeß wird durch das aus der Glykolyse stammende Intermediat PEP (Phosphoenolpyruvat) geliefert. Das PTS setzt sich aus zwei allgemeinen, im Zytosol löslichen Komponenten, Enzym I (EI) und HPr (hitzestabiles Protein) und zahlreichen zuckerspezifischen Komponenten (Enzym II-Komplex) zusammen (siehe Abb. 2.4). Bakterien besitzen verschiedene zuckerspezifische EII-Komplexe. Jeder EII-Komplex besteht aus zwei hydrophilen Domänen (EIIA und EIIB) und aus einer oder zwei hydrophoben, membrangebundenen Domänen (EIIC und EIID). Der vom Phosphoenolpyruvat (PEP) stammende Phosphatrest wird über die Phosphatgruppenüberträger HPr und EI schließlich durch eine Komponente des Enzym II-Komplexes auf das Substrat übertragen. Zu den transportierten Substraten zählen Zucker (Mono- und Disaccharide wie Glukose, Fruktose, Saccharose und Laktose), Zuckeralkohole (z.B. Mannitol) und andere Zuckerderivate (z.B. Glukonat) (Postma *et al.*, 1993, Robillard & Broos, 1999).

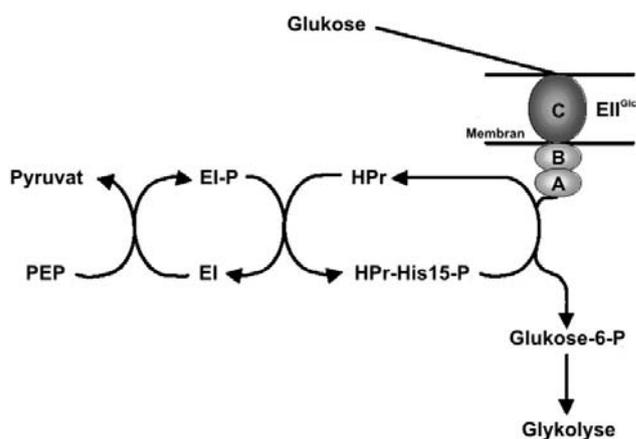


Abb. 2.4: Schematische Darstellung des Glukose-spezifischen Phosphoenolpyruvat-Phosphotransferase-System (PEP-PTS). Die Phosphatgruppe wird ausgehend von PEP (Phosphoenolpyruvat) über EI (Enzym I) und HPr (hitzestabiles Protein) und dem EII^{Glk}-Komplex (Glukose-spezifischer Enzym II-Komplex), bestehend aus den Untereinheiten EIIA, B und C, auf die Glukose übertragen.

Listeria monocytogenes gehört neben *Enterococcus faecalis* zu den Bakterien mit den meisten PTS-Genen; 3,2 % aller Gene in *Listeria* kodieren für PTS Proteine. Vergleichende Genomanalysen der sieben bakteriellen PTS-Klassen zeigten für *Listeria monocytogenes* 30 komplette PEP-PTS: 6 Glk- (Glukose/ β -Glukoside), 6 Fru- (Fruktose/Mannitol), 8 Lak- (Laktose/Cellobiose), 1 Gut- (Sorbitol), 3 Gat- (Galaktol), 4 Man- (Mannose/Glukose)

und 1 Ask-PTS (Ascorbat). In der apathogenen Art *Listeria innocua* konnten dagegen nur 23 komplette PTS nachgewiesen werden (Barabote & Saier, 2005).

Das PTS ist nicht nur ein Substrat-Transportsystem, sondern besitzt auch regulatorische Funktionen. Komponenten des PEP-PTS beeinflussen die Expression kataboler Gene bzw. Operons (Katabolitrepession), den Stickstoff-Metabolismus, die Chemotaxis sowie die Kompetenz (Deutscher *et al.*, 1997, Stülke *et al.*, 1998, Powell *et al.*, 1995).

2.6.1 Komponenten des bakteriellen PEP-PTS

Die allgemeinen PTS-Proteine Enzym I (EI) und HPr

Enzym I (EI) (59-64 kD schwer) wird durch das *ptsI*-Gen kodiert. Sequenzvergleiche von EIs aus Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien zeigen eine hohe Ähnlichkeit (Postma *et al.*, 1993, Hu & Saier, 2002). Alle EIs bestehen aus zwei funktionellen Domänen. Am N-Terminus befindet sich zum einen der konservierte Histidin-Rest (His189 in *E. coli*), an dessen N-3 Position im Imidazolring die Autophosphorylierung durch PEP erfolgt und zum anderen die HPr-Bindungsstelle (Chauvin *et al.*, 1996b, Teplyakov *et al.*, 2006). Der C-terminale Bereich dient als PEP-Bindungsstelle und ist für die Dimerisierung des EI notwendig (Marquez *et al.*, 2006, Chauvin *et al.*, 1996a). Nur als Dimer ist EI in der Lage, die Phosphatgruppe von PEP zu übernehmen. Diese relativ langsame, von zahlreichen Parametern (z.B. Temperatur, pH-Wert, Mg²⁺- und PEP-Konzentration) beeinflusste, EI Monomer/Dimer Transition scheint *in vitro* der limitierende Schritt im Phosphattransfer zu sein. Somit reguliert die EI Assoziation/Dissoziation *in vivo* das gesamte PTS (Patel *et al.*, 2006, Chauvin *et al.*, 1994).

Das ca. 9-10 kD-schwere hitzestabile Protein **HPr** wird durch das *ptsH*-Gen kodiert. Die Primärstruktur des HPr zeigt in der Gruppe der Enterobakterien große Ähnlichkeiten. Das HPr von *E. coli* und *S. typhimurium* ist in seiner Sequenz identisch und im HPr von *Klebsiella pneumoniae* findet man nur einen Aminosäureaustausch (Leu163) (Titgemeyer *et al.*, 1990, Powers & Roseman, 1984, De Reuse *et al.*, 1985). Dagegen bestehen zwischen Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien starke Sequenzunterschiede, eine Ähnlichkeit besteht hauptsächlich im konservierten Bereich des aktiven Histidin-Restes, His15 (Reizer *et al.*, 1988). HPr wird von EI-P an der Position N-1 des Imidazolrings am His15 phosphoryliert (Waygood, 1998). Ein Aminosäureaustausch am His15 zu Ala führt zu einem veränderten HPr-Protein, das nicht mehr durch EI und PEP phosphoryliert werden kann (Reizer *et al.*, 1989). Untersuchungen der 3D-Struktur des HPr lassen eine wichtige Rolle von Arg17 im HPr vermuten. Durch eine mögliche Interaktion von Arg17 mit der Phosphatgruppe am His15 könnte so die Bindung der Phosphatgruppe am HPr stabilisiert werden (Herzberg *et al.*, 1992).

In vielen Gram-positiven Bakterien und einigen wenigen Gram-negativen Bakterien wird HPr durch eine ATP-abhängige Proteinkinase an einem Serin-Rest phosphoryliert (z.B. Ser46 in *Bacillus subtilis*). Diese Phosphorylierung hat eine regulatorische Funktion und ist nicht am Phosphattransfer im PEP-PTS beteiligt. Jedoch verringert die Serin-Phosphorylierung die Phosphatübertragung von EI-P auf das HPr um das 100fache (siehe Abschnitt 2.7).

Der zuckerspezifische Enzym II-Komplex

Die Zuckerspezifität der PTS wird durch den EII-Komplex definiert. Der EII-Komplex besteht zum einen aus einer integralen Membrandomäne und zum anderen aus zytoplasmatischen Domänen. Alle EII-Komplexe besitzen einen ähnlichen Grundaufbau mit bis zu vier getrennten Proteinen EIIA, EIIB, EIIC und EIID. Die Domänen können als separate Polypeptide vorliegen oder ein Multidomänen-Protein bilden (Lengeler *et al.*, 1994, Saier & Reizer, 1992, Siebold *et al.*, 2001).

Die für den Zuckertransport verantwortliche **EIIC**-Einheit (beim Mannose-spezifischen PTS EIIC und EIID) ist in die Zytoplasmamembran eingebettet, besitzt 6 - 8 transmembrane Helices und einen großen hydrophilen Loop, der immer einen Histidin-Rest und ein GXXE-Motiv trägt. Die Einheiten, die an der Übertragung des Phosphatrestes beteiligt sind, **EIIA** und **EIIB**, liegen zytoplasmatisch vor und können untereinander oder mit der Membrandomäne verbunden sein (Robillard & Broos, 1999, Postma *et al.*, 1993). Das EIIA, das durch HPr-His15~P an einem Histidin-Rest phosphoryliert wird, phosphoryliert seinerseits EIIB an einem Histidin- (Mannose-PTS-Familie) oder Cystein-Rest (alle anderen PTS-Familien) (Pas & Robillard, 1988, Meins *et al.*, 1993).

Eines der bestcharakterisiertesten EIIA-Proteine ist das Glukose-spezifische EIIA (EIIA^{Glc}) aus *E. coli* und *S. typhimurium* (jeweils kodiert vom *crr*-Gen), welches in Zusammenarbeit mit dem membranassoziierten EIIBC-Komplex (kodiert von *ptsG*) für den Glukose-Transport verantwortlich ist. Wie das HPr-Protein, ist auch das EIIA extrem hitzestabil (Postma *et al.*, 1993). Alle bisher untersuchten EIAs (10-20 kD) tragen einen konservierten Histidin-Rest, der als Phosphatgruppen-Akzeptor vom HPr-P dient. Das EIIA aus *E. coli* wird an Position N-3 des Imidazolringes von His90 phosphoryliert (Dorschug *et al.*, 1984, Presper *et al.*, 1989).

Gezielte Mutationen im EIIA^{Glc} aus *E. coli* und *B. subtilis* haben einen Einblick in den Phosphatgruppentransfer dieser Proteine gegeben. Ein Austausch des konservierten His90 zu Ala in *E. coli*, bzw. des äquivalenten His83 zu Ala in *B. subtilis*, führte zu einem inaktiven EIIA, das nicht mehr durch HPr-His15~P phosphoryliert werden kann. Eine weitere Aminosäuresubstitution im EIIA-Protein am His68 in *E. coli*, bzw. His68 in *B. subtilis*, zeigte zwar eine Phosphorylierung durch das HPr~P, jedoch war der Phosphatgruppentransfer auf den EIIBC-Komplex verhindert (Presper *et al.*, 1989, Reizer *et al.*, 1992). Möglicherweise spielt dieser Histidin-Rest eine wichtige Rolle im Phosphatgruppentransfer von EIIA auf den EIIBC-Komplex (Worthylake *et al.*, 1991, Liao *et al.*, 1991).

2.6.2 Nicht-PTS-abhängiger Transport von Glycerin

Glycerin kann entweder mittels freier Diffusion oder einer durch das integrale Membranprotein GlpF katalysierten erleichterten Diffusion (Energie-unabhängig) über die Zytoplasmamembran in die Bakterienzelle gelangen (Lin, 1986, Heller *et al.*, 1980). GlpF ist ein Transmembranprotein, das in die MIP (*major intrinsic protein*)-Familie der integralen Membrankanal-Proteine (Aquaporine) einzuordnen ist und in einer Vielzahl von Bakterien, Archaea und Eukaryota vertreten ist (Fu *et al.*, 2002, Baker & Saier, 1990, Sweet *et al.*, 1990, Pao *et al.*, 1991, Reizer *et al.*, 1993). Diese Aquaporine ermöglichen einen selektiven,

passiven Transport von löslichen Molekülen, wie Glycerin, Dihydroxyaceton, Harnstoff und anderen kleinen, neutralen Molekülen über die Membran (Heller *et al.*, 1980, Fu *et al.*, 2000). Da Glycerin auch mittels Diffusion die bakterielle Zellmembran überqueren kann, spielt der „Glycerol-Facilitator“ GlpF erst eine wichtige Rolle bei einer niedrigen Glycerin-Konzentration im Medium (Richey & Lin, 1972). Um einen kontinuierlichen Glycerin-Flux (Fließgleichgewicht) in die Bakterienzelle gewährleisten zu können, muß das Glycerin sofort metabolisiert werden, da der „Glycerol-Facilitator“ GlpF auch die reversible Diffusion von Glycerin über die bakterielle Membran ins Medium katalysiert. Das intrazelluläre Glycerin kann entweder durch die Glycerin-Dehydrogenase in Dihydroxyaceton umgewandelt oder durch die Glycerin-Kinase GlpK in einer ATP-abhängigen Reaktion zu Glycerin-3-Phosphat (Y3P) phosphoryliert werden (Lin, 1976, Lin *et al.*, 1960). Y3P ist kein Substrat für den „Glycerol-Facilitator“, verbleibt in der Bakterienzelle und fungiert dort als Induktor des *glp*-Regulons. Es inaktiviert zum einen den Repressor GlpR des *glp*-Regulons in *E. coli* (Schweizer *et al.*, 1985) und aktiviert zum anderen in *B. subtilis* den Antiterminator GlpP (Rutberg, 1997).

Obwohl der Glycerin-Transport PTS-unabhängig verläuft, führt das Fehlen der allgemeinen PTS-Komponenten EI und HPr zu einem Wachstumsverlust mit Glycerin als einziger Kohlenstoffquelle. Dies konnte sowohl für Gram-positive als auch für Gram-negative Bakterien gezeigt werden (Beijer & Rutberg, 1992, Reizer *et al.*, 1984, Romano *et al.*, 1990, Saier & Roseman, 1976). In *E. coli* und *S. typhimurium* interagiert das unphosphorylierte EIIA^{Glc} mit der Glycerin-Kinase GlpK (Hurley *et al.*, 1993) und inhibiert so deren Kinase-Aktivität (de Boer *et al.*, 1986, Postma *et al.*, 1984). Die Interaktion der beiden Proteine in *E. coli* benötigt die Aminosäuren Arg402 und den Aminosäurebereich Pro472 bis Tyr481 im C-terminalen Bereich der Glycerin-Kinase und den aktiven Bereich mit seinem His90 im EIIA^{Glc}. Die Deletion des *crr*-Gens, kodierend für das EIIA^{Glc}, führte zu einem Verlust des Wachstums mit Glycerin (Dorschug *et al.*, 1984, Hurley *et al.*, 1993).

Ein vollkommen anderer Mechanismus der Kontrolle des Glycerin-Metabolismus erfolgt in Gram-positiven Bakterien. Im Gegensatz zu den Enterobakterien *E. coli* und *S. typhimurium*. besitzen Gram-positive Bakterien meist kein frei vorliegendes Glukose-spezifisches EIIA, da es mit dem Glukose-spezifischen EIIBC-Komplex fusioniert ist (Hudig & Hengstenberg, 1980, Christiansen & Hengstenberg, 1996). In *Mycoplasma capricolum*, einer der wenigen Gram-positiven Bakterien, der frei vorliegendes Glukose-spezifisches PTS-Protein EIIA bildet, wird ebenfalls die Glycerin-Kinase-Aktivität nicht durch EIIA inhibiert (Zhu *et al.*, 1997).

Eine Deletion des 3'-Bereiches im *ptsG*-Gen in *B. subtilis*, kodierend für die EIIA^{Glc}-Domäne des EIIABC-Komplexes, hat keinen Einfluß auf das Wachstum in Glycerin-haltigem Medium (Gonzy-Treboul *et al.*, 1991). Demzufolge scheint die Glycerin-Aufnahme, anders als in Gram-negativen Bakterien, in Gram-positiven Bakterien durch einen EIIA^{Glc}-unabhängigen Mechanismus reguliert zu werden. Dies wird durch die Beobachtung unterstützt, dass GlpK aus *E. faecalis* und *Streptococcus faecalis* durch PEP, EI und HPr phosphoryliert werden kann und deren Kinase-Aktivität um das 10fache stimuliert (Deutscher *et al.*, 1993, Deutscher & Sauerwald, 1986). Eine ähnliche PTS-abhängige Phosphorylierung und Stimulation der GlpK konnte auch in *Enterococcus caseliflavus* und *B. subtilis* gezeigt werden. Die

PEP-abhängige Phosphorylierung der GlpK erfolgt an Position N-3 des Imidazolringes am His232 in *E. caseliflavus* und am His230 in *B. subtilis*. Ein Austausch des His232 in *E. caseliflavus* bzw. His230 in *B. subtilis* zu Arg führt zu einer stimulierten GlpK-Aktivität, ähnlich der, die durch die PEP-abhängige Phosphorylierung erzielt wird. Dagegen führt eine Aminosäuresubstitution der gleichen Histidin-Reste zu Alanin oder Glutamin zu einer verringerten katalytischen GlpK-Aktivität, die auch durch PEP, EI und HPr nicht stimuliert werden kann (Charrier *et al.*, 1997a, Wehtje *et al.*, 1995).

Glyzerin-Metabolismus

E. coli ist in der Lage, sowohl Glyzerin als auch Glyzerin-3-Phosphat (Y3P) aufnehmen zu können. Die Aufnahme von Glyzerin erfolgt mittels erleichterter Diffusion, katalysiert durch das Transmembranprotein GlpF, gefolgt von der Phosphorylierung zu Y3P durch die ATP-abhängige Glyzerin-Kinase GlpK (Pettigrew *et al.*, 1988, Sweet *et al.*, 1990). Mutanten, die keine Glyzerin-Kinase exprimieren und somit nicht in Glyzerin-haltigem Medium wachsen können, besitzen jedoch die Fähigkeit das phosphorylierte Zwischenprodukt Y3P aufnehmen zu können. In *E. coli* wird Y3P über mehrere Transportsysteme akkumuliert: mittels des *ugp*-Transportsystems (Argast & Boos, 1980), des unspezifischen Hexose-Phosphat-Transporters UhpT (*uhpT*-Gen) (Guth *et al.*, 1980) und über das für Y3P-spezifische Transportsystem, kodiert von *glpT* (Larson *et al.*, 1982). Die Y3P-Permease, ein Oligomer, ist ein integrales Membranprotein, dessen aktiver Y3P-Transport durch eine protonenmotorische Kraft angetrieben wird (Boos *et al.*, 1977). Das nun in der Zelle vorhanden Y3P stellt in *E. coli* das Substrat für die aerobe (externer Elektronenakzeptor O₂) (Schweizer & Larson, 1987) und anaerobe (externer Elektronenakzeptor Nitrat oder Fumarat) (Kistler & Lin, 1972) Y3P-Dehydrogenase dar, die Y3P in Dihydroxyaceton-Phosphat umwandelt, ein Stoffwechselprodukt der Glykolyse.

Klebsiella pneumoniae besitzt zwei verschiedene Glyzerin-Abbauwege, die durch das Wachstum auf Glyzerin induziert werden. In der Anwesenheit von exogenen Elektronenakzeptoren (O₂, Nitrat oder Fumarat) wird Glyzerin hauptsächlich durch die ATP-abhängige Glyzerin-Kinase zu Y3P phosphoryliert und im Anschluß daran durch eine Y3P-Dehydrogenase zu Dha-P, einem Stoffwechselprodukt der Glykolyse, umgewandelt. In *K. pneumoniae*, wie auch in *E. coli* existieren zwei verschiedene FAD-assoziierte Y3P-Dehydrogenasen, die sich in ihrer Substratspezifität für den exogenen Elektronenakzeptor unterscheiden. Die Umwandlung von Y3P zu Dha-P erfolgt in der Anwesenheit von molekularem Sauerstoff durch die aerobe, bei der Verfügbarkeit von Fumarat oder Nitrat durch die anaerobe Y3P-Dehydrogenase. Sind keine exogenen Elektronenakzeptoren vorhanden wird Glyzerin durch die NAD⁺-abhängige Glyzerin-Dehydrogenase in Dha umgewandelt und durch die Dha-Kinase phosphoryliert (Lin, 1976). Die Regeneration des Reduktionsäquivalents erfolgt durch einen parallel geschalteten Reaktionsweg, der zur Bildung von 1,3-Propandiol führt (Forage & Lin, 1982). Dha wird im Anschluß daran durch die Dha-Kinase (siehe Abschnitt 2.6.3) zu Dha-P phosphoryliert (Ruch *et al.*, 1974). Durch das Fehlen dieses Enzymsystems ist *E. coli* nicht dazu fähig ohne externe Elektronenakzeptoren, wie Fumarat oder Nitrat, anaerob Glyzerin zu verwerten (St Martin *et al.*, 1977).

B. subtilis kann wie *E. coli* sowohl Glycerin als auch Y3P als Kohlenstoff- und Energiequelle verwenden (Mindich, 1968, Lindgren & Rutberg, 1974). Jedoch ist die Glycerin-Verwertung in *B. subtilis* strikt aerob (Lin, 1976). Das *glp*-Regulon in *B. subtilis*, das in den Katabolismus von Glycerin und Y3P involviert ist, besteht aus sechs Genen, die auf vier Operons verteilt sind: *glpP* (Regulatorprotein), *glpFK* („Glycerol-Facilitator“, Glycerin-Kinase), *glpD* (Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase) und *glpTQ* (Glycerin-3-Phosphat-Transporter, Glycerinphosphoryldiester-Phosphodiesterase) (Nilsson *et al.*, 1994, Beijer *et al.*, 1993). GlpP bindet an inverted repeats im 5'-Bereich der mRNA von *glpD* und womöglich auch an die von *glpFK* und *glpTQ* und reguliert so deren Expression (Glatz *et al.*, 1998, Holmberg & Rutberg, 1991). In einigen Zellextrakten von *B. subtilis*-Stämmen konnte eine Glycerin-Dehydrogenase-Aktivität detektiert jedoch keine Induktion durch Glycerin gezeigt werden (Wiame *et al.*, 1954). Dagegen wird die Menge an Glycerin-Kinase und Y3P-Dehydrogenase durch die An- und Abwesenheit von Glycerin beeinflusst. Mutanten ohne Y3P-Dehydrogenase können weder Glycerin noch Y3P als Kohlenstoffquelle nutzen. Das Fehlen der Glycerin-Kinase ermöglicht ein Wachstum mit Y3P, nicht jedoch mit Glycerin. Die Daten sprechen dafür, dass in *B. subtilis* die Glycerindissimilation hauptsächlich mittels Glycerin-Kinase und Y3P-Dehydrogenase erfolgt (Lindgren & Rutberg, 1974, Mindich, 1968).

2.6.3 Das Dihydroxyaceton (Dha)-PTS – die Dha-Kinase

E. coli ist in der Lage, mit Dihydroxyaceton (Dha) als einziger Kohlenstoffquelle zu wachsen (Jin & Lin, 1984, Paulsen *et al.*, 2000b). Dha kann durch eine ATP-abhängige oder durch eine PEP-abhängige Phosphorylierung metabolisiert werden. Mutationen im *ptsI*-Gen (kodiert für Enzym I) oder im *dha*-Operon verhindern eine Phosphorylierung des Dha in *E. coli* und führen zu einem Wachstumsverlust mit dieser Kohlenstoffquelle (Jin & Lin, 1984). Das *dha*-Operon in *E. coli* besteht aus drei Genen: *dhaK* (*ycgT*), *dhaL* (*ycgS*) und *dhaM* (*ycgC*) (Gutknecht *et al.*, 2001, Paulsen *et al.*, 2000b, Erni *et al.*, 2006). Die Gene *dhaK* und *dhaL* kodieren für die Dihydroxyaceton-Kinase Untereinheiten DhaK und DhaL. Getrennt vorliegende Kinase-Untereinheiten sind typisch für eine wie in *E. coli* stattfindende PEP-abhängige Dha-Phosphorylierung (Garcia-Alles *et al.*, 2004). In Bakterien mit einer ATP-abhängigen Dha-Phosphorylierung, wie z.B. in *Citrobacter freundii*, bilden DhaK und DhaL ein Fusionsprotein (Siebold *et al.*, 2003a, Daniel *et al.*, 1995). Das dritte Gen *dhaM* (*ycgC*) kodiert für ein PTS-Fusionsprotein DhaM. DhaM besteht aus einer N-terminalen EIIA^{Man}-ähnlichen Domäne, darauf folgt eine HPr-ähnliche Domäne und am C-Terminus befindet sich der N-terminale Bereich des Eis. Jede dieser drei Domänen besitzt eine für PTS-charakteristische Phosphorylierungsstelle (Gutknecht *et al.*, 2001).

Die PEP-abhängige Phosphorylierung in *E. coli* erfordert sieben Phosphattransferschritte (siehe Abb. 2.5). Die Phosphatgruppe wird von PEP ausgehend, über EI und HPr, auf die EI-Domäne des DhaM übertragen und von dort aus auf die HPr- und EIIA-Domäne transportiert. *In vitro* konnte zudem festgestellt werden, dass DhaK eine hohe Dha-Substratspezifität besitzt (Siebold *et al.*, 2003b) und dass DhaL den Cofaktor ADP schwach bindet (Oberholzer *et al.*, 2006). Die Phosphatgruppe wird von der

EIIA^{Man}-ähnlichen Domäne des DhaM auf das ADP, den Cofaktor von DhaL, und dann auf das an DhaK gebundene Dha übertragen.

Im Gegensatz zu den zuckerspezifischen PTS ist das Dha-PTS nicht am Membrantransport von Dha beteiligt. Der Dha-Transport erfolgt wahrscheinlich über die GlpF-katalysierte erleichterte Diffusion oder durch direkte Diffusion über die Membran (Sun *et al.*, 2003).

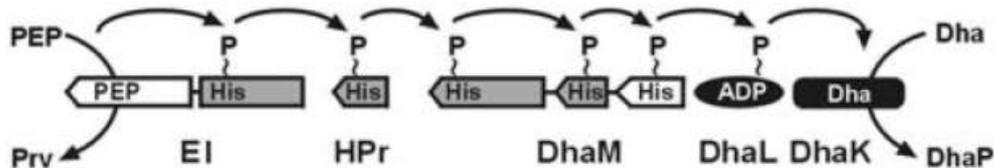


Abb. 2.5: Phosphatgruppenübertragungskette von PEP auf Dha in *E. coli* (Bachler *et al.*, 2005). Der Phosphat-Transfer von PEP auf Dha wird durch fünf Proteine vermittelt (EI, HPr, DhaM, DhaL und DhaK). Die Dha-Kinase, bestehend aus den Untereinheiten DhaL::ADP und DhaK, ist schwarz markiert. DhaM besteht aus drei PTS-Domänen: ein verkürztes EI, HPr und dem EIIA^{Man}. Die Phosphatgruppe wird ausgehend von der EIIA^{Man}-Domäne im DhaM auf das schwach an DhaL gebundene ADP übertragen und dann auf das an der DhaK-Untereinheit gebundene Dha transportiert.

Eine Vielzahl von Bakterien besitzen nichttransportierende Dha-spezifische EII-Komplexe (z.B. *Bacillus halodurans*, *Streptococcus pyogenes* und *Enterococcus faecalis*). Jedoch nur in *E. coli* wurde dieses System näher charakterisiert. *Listeria monocytogenes* sowie *Listeria innocua* haben zwei komplette Dha-PTS. Das listerielle DhaM besitzt jedoch nur eine EIIA-ähnliche Domäne und keine HPr- oder EI-Domäne (Barabote & Saier, 2005).

Es konnte gezeigt werden, dass Dha und andere kurzkettige Triosen die Neigung haben, mit Proteinen zu reagieren (Maillard-Reaktion) (Tessier *et al.*, 2003). Dha induziert DNA-Schäden, Apoptose und ist an der Unterbrechung des Zellzyklus beteiligt (Petersen *et al.*, 2004). In Hefen dient die Dha-Kinase der Entgiftung und verhindert so die Akkumulation von Dha in toxischen Konzentrationen (Molin *et al.*, 2003).

2.7 Kohlenstoff-Katabolitrepression (KKR)

Bakterien haben im Laufe der Evolution eine Vielzahl an metabolischen Systemen entwickelt. Sie können eine Vielzahl von Kohlenstoffquellen verwerten und passen sich den wechselnden Umweltbedingungen an. Dies erfordert ein gutes Signaltransduktions- und Regulationsnetzwerk. Sie müssen vorhandene Kohlenstoffquellen erkennen und schnell und effektiv darauf reagieren, indem sie benötigte metabolisierende Systeme induzieren und andere reprimieren.

Die Kohlenstoff-Katabolitrepression (KKR) ist ein regulatorischer Mechanismus, der eine präferentielle Verwertung von Kohlenstoffquellen gewährleistet. Die Bakterien sind somit in der Lage, in einem Nährstoffgemisch jene Kohlenstoffquelle zuerst zu verwerten, die das beste Wachstum ermöglicht. Gene bzw. Operons zur Verwertung spezifischer Kohlenstoffquellen werden in der Regel nur dann exprimiert, wenn das entsprechende Substrat im Medium vorhanden ist und besser verwertbare Nährstoffe abwesend sind (Stülke & Hillen, 1999).

E. coli, ein Vertreter der Gram-negativen, und *B. subtilis*, ein Vertreter der Gram-positiven Bakterien, sind die typischen Modellorganismen für die KKR und am besten charakterisiert. Komponenten des Phosphoenolpyruvat-Phosphotransferase-System (PEP-PTS) (siehe Abschnitt 2.6.1) spielen, sowohl in Gram-negativen als auch in Gram-positiven Bakterien, eine wichtige regulatorische Funktion in der KKR (Stülke *et al.*, 1998). Allerdings unterscheiden sich die jeweiligen Mechanismen in Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien (Deutscher *et al.*, 1997, Postma *et al.*, 1993, Nelson *et al.*, 1982). Sie verwenden zum einen unterschiedliche Transkriptionsregulatoren, Crp in Gram-negativen, CcpA in Gram-positiven Bakterien und zum anderen verschiedene Signalkomponenten, welche die Nährstoffsituation der Zelle widerspiegeln. Bei Gram-negativen Bakterien führt eine fehlende Transkriptionsaktivierung zur Katabolitrepression (positive Regulation). Dagegen wird die Katabolitrepression bei Gram-positiven Bakterien durch eine Repression der Transkription (negative Regulation) ausgelöst.

2.7.1 Katabolitrepression in Gram-negativen Bakterien

In Gram-negativen Bakterien spielt das Glukose-spezifische EIIA (EIIA^{Glc}), kodiert vom *crr*-Gen, nicht nur eine wichtige Rolle im Glukose-spezifischen PTS-Transport, sondern ebenfalls eine zentrale Rolle in der Kohlenstoff-Katabolitrepression (KKR). Die regulatorische Funktion des PTS-Proteins EIIA^{Glc} wird durch seinen Phosphorylierungszustand bestimmt. Die PEP-abhängige Phosphorylierung durch das HPr~P und die Dephosphorylierung mittels des Enzym II-Komplexes in Anwesenheit eines PTS-gängigen Substrats beeinflusst den EIIA^{Glc}-Phosphorylierungszustand (siehe Abb. 2.6).

Im unphosphorylierten Zustand bindet und inhibiert EIIA^{Glc} zahlreiche nicht-PTS-Proteine, wie die Glyzerin-Kinase oder Permeasen (spezifisch für Laktose, Maltose, Melibiose oder Raffinose). Dieser Mechanismus wird als Induktorausschluß (inducer exclusion) bezeichnet und ist für das diauxische Wachstum auf Laktose und Glukose in *E. coli* verantwortlich. Bei gleichzeitiger Anwesenheit zweier Kohlenstoffquellen wird zunächst diejenige genutzt (Glukose in *E. coli*), die leichter verwertbar ist bzw. die ein besseres und schnelleres Wachstum ermöglicht (Inada *et al.*, 1996). Die Bindung von aufgereinigtem EIIA^{Glc} an Zielproteine konnte in vielen Fällen gezeigt werden: EIIA^{Glc} bindet an den Laktose-Transporter (LacY) (Nelson *et al.*, 1983), an die ATP-hydrolysierende Komponente des Maltose-ABC-Transportsystems (MalK) (Dean *et al.*, 1990) und an die Glyzerin-Kinase, deren Aktivität, Glyzerin zu phosphorylieren, inhibiert wird (Novotny *et al.*, 1985, de Boer *et al.*, 1986) (siehe Abschnitt 2.6.2).

Die phosphorylierte Form $EIIA^{Glc}\sim P$ hat einen stimulierenden Effekt auf die Adenylatzyklase (kodiert vom *cyaA*-Gen). *E. coli crr* ($EIIA^{Glc}$)-Deletionsmutanten zeichnen sich durch eine geringe Adenylatzyklase-Aktivität aus, die nur zu 5 - 20% der des wildtypischen Stammes entspricht (Feucht & Saier, 1980). Das durch die Adenylatzyklase synthetisierte cAMP bindet an das regulatorische Protein Crp (*cAMP receptor protein*) und vermittelt die Transkriptionsaktivierung zahlreicher kataboler Gene und Operons. Die verschiedenen Gene und Operons benötigen für eine vollständige Expression unterschiedliche Mengen an Crp-cAMP-Komplex, da sich die DNA-Bindungsstellen in ihrer Affinität für den Komplex unterscheiden (Kolb *et al.*, 1983, Lis & Schleif, 1973, Busby & Ebright, 1999). Eine Inaktivierung der Adenylatzyklase (*cya*-Gen) bzw. von Crp (*crp*-Gen) verhindert in *E. coli* und in *S. enterica* das Wachstum auf einer Vielzahl an Kohlenstoffquellen (Botsford & Harman, 1992).

Die Konzentration des cAMP/Crp-Komplexes wird durch das PTS reguliert. Glukose und andere PTS-gängige Kohlenhydrate inhibieren die cAMP-Synthese. Der Transport und die Phosphorylierung von Glukose und anderer Zucker verringert den Phosphorylierungszustand der PTS-Proteine, wie $EIIA^{Glc}$, und führt so zu einer schwächeren Adenylatzyklase-Aktivität. Dagegen resultiert das Wachstum auf nicht-PTS-Kohlenstoffverbindungen (z.B. Laktat oder Succinat) in komplett phosphorylierten PTS-Proteinen und somit zur Aktivierung der cAMP-Synthese. Nicht nur die cAMP-Konzentration auch die Crp-Menge wird beim Wachstum in Glukose-haltigem Medium verringert. Durch die Senkung des cAMP- und Crp-Spiegels wird durch die Glukose-Verwertung KKR in der Zelle hervorgerufen (Ishizuka *et al.*, 1993). Jedoch zeigen in *E. coli* auch nicht-PTS-gängige Kohlenhydrate, wie Glukose-6-Phosphat, Laktose oder Glukonat eine KKR (Hogema *et al.*, 1997, Epstein *et al.*, 1975). Zahlreiche Studien geben Hinweise dafür, dass in *E. coli* cAMP/Crp-unabhängige Mechanismen in die KKR involviert sind (Ullmann, 1983).

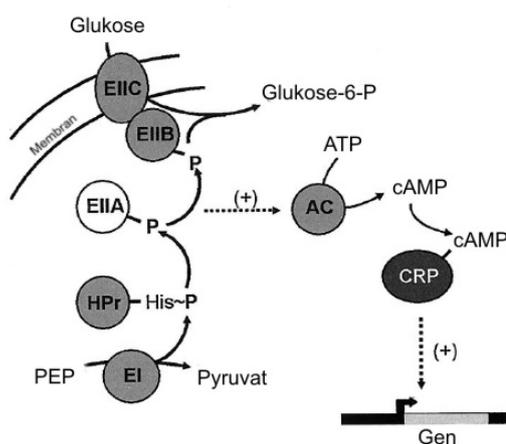


Abb. 2.6: Schematische Darstellung der Katabolitrepression in Gram-negativen Bakterien (*E. coli*) (modifiziert nach Warner & Lolkema, 2003a). Der Phosphorylierungszustand des EIIA bestimmt die Adenylatzyklase-Aktivität (AC) und somit die cAMP-Konzentration in der Zelle. Der Komplex aus cAMP und dem Regulatorprotein Crp stimuliert die Transkription der Zielgene (positive Regulation). Bei einem Überschuss an Glukose liegt EIIA in unphosphorylierter Form vor, inhibiert so die cAMP-Synthese und induziert damit die Katabolitrepression.

Die Modulation der Adenylatzyklase-Aktivität und der Mechanismus des Induktorausschlusses haben wichtige physiologische Funktionen und ermöglichen es der Zelle, zwischen den verschiedenen Kohlenstoffquellen zu unterscheiden. Der Zusammenhang zwischen der Kohlenstoffaufnahme, dem Phosphorylierungszustand von $EIIA^{Glc}$, der Aktivität der Adenylatzyklase und der intrazellulären Konzentration von Metaboliten wie PEP ermöglicht eine komplexe Regulation der Substrataufnahme und Genexpression.

2.7.2 Katabolitrepession in Gram-positiven Bakterien

Die meisten Gram-positiven Bakterien mit niedrigem GC-Gehalt besitzen keine Adenylatzyklase. Demzufolge kommt eine $cAMP$ -abhängige $EIIA^{Glc}$ -Kontrolle in der Kohlenstoff-Katabolitrepession (KKR) bei Gram-positiven nicht in Frage. In Gram-positiven Bakterien reflektiert der Phosphorylierungszustand des PTS-Proteins HPr die Nährstoffsituation in der Zelle und dient, wie das $EIIA^{Glc}$ in Gram-negativen Zellen, als Regulatorprotein der KKR (siehe Abb. 2.7).

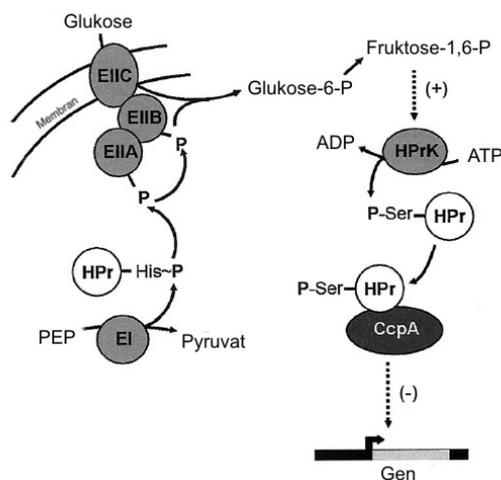


Abb. 2.7: Schematische Darstellung der Katabolitrepession in Gram-positiven Bakterien (*B. subtilis*) (modifiziert nach (Warner & Lolkema, 2003a)). Die Verwertung von PTS-Substraten (hier Glukose) führt zur Bildung von glykolytischen Intermediaten, wie z.B. Fruktose-1,6~P. Fruktose-1,6~P stimuliert die HPr-Kinase (HPrK), die HPr am Ser46-Rest in einer ATP-abhängigen Reaktion phosphoryliert. Die Bindung von HPr-Ser~P an CcpA führt zu einer Komplexbildung, die die Transkription katabolitregulierter Zielgene generell inhibiert (negative Regulation).

Das HPr-Protein wird nicht nur PEP-abhängig von Enzym I (EI) am His15 phosphoryliert, sondern auch in einer ATP-abhängigen Reaktion am Ser46. Diese Phosphorylierung wird durch das bifunktionale Enzym HPr-Kinase/Phosphorylase (HPrK/P) katalysiert, ein ATP- oder GTP-abhängiges Enzym, das in Enterobakterien bisher nicht nachgewiesen werden konnte (Reizer *et al.*, 1998, Deutscher & Saier, 1983). Demzufolge existieren vier verschiedene HPr-Phosphorylierungszustände: HPr, His15-phosphoryliertes HPr, Ser46-phosphoryliertes HPr und doppelt-phosphoryliertes HPr (His15~P und Ser46~P) (Vadeboncoeur *et al.*, 1991, Casabon *et al.*, 2006). Das bifunktionale Enzym HPrK/P katalysiert jedoch nicht nur die Ser46-Phosphorylierung, sondern auch die Dephosphorylierung von HPr-Ser46~P (Kravanja *et al.*, 1999). Die metabolisierten Zucker bestimmen die antagonistische Kinase- bzw. Phosphorylase-Aktivität im HPr-K/P durch die Beeinflussung der Konzentration von ATP, P_i , PP_i und Fruktose-1,6-Bisphosphat (FBP) in der

Zelle. Das glykolytische Zwischenprodukt FBP, sowie ATP und PP_i stimulieren die Kinase-Aktivität (Deutscher & Saier, 1983, Mijakovic *et al.*, 2002), wohingegen P_i die Phosphorylase-Aktivität steigert (Deutscher *et al.*, 1985). Des Weiteren haben metabolisierende Zucker Einfluss auf das Enzym I (EI), dessen Aktivität sich an den zur Zuckeraufnahme erforderlichen PTS-Phosphattransfer und an das PEP/Pyruvat-Verhältnis anpasst (Hogema *et al.*, 1998). Die beiden Enzyme EI und HPrK/P bestimmen die Konzentration der verschiedenen HPr-Phosphorylierungsformen, die den Kohlenstoff-Metabolismus über Protein-Protein-Interaktion (HPr, HPr-Ser46~P) oder mittels Phosphorylierung von nicht-PTS-Proteinen (HPr-His15~P) kontrollieren. HPr-Ser46~P dient als Korepressor von CcpA (catabolite control protein A), einem Transkriptionsregulatorprotein der LacI/GalR-Familie (Chauvaux, 1996, Jones *et al.*, 1997). Die Interaktion von HPr-Ser46~P mit CcpA ist sehr spezifisch, da HPr und doppelt-phosphoryliertes HPr (His15~P und Ser46~P) eine geringe Affinität zum Regulatorprotein CcpA besitzen (Deutscher *et al.*, 1995). Die CcpA/HPr-Ser46~P-Komplexbildung ermöglicht die Bindung an eine DNA-Konsensussequenz (*cre*-Box) im Promotorbereich zahlreicher katabolitregulierter Gene bzw. Operons und reguliert so deren Transkription (Moreno *et al.*, 2001, Henkin, 1996). In einigen Fällen ist das CcpA auch ohne Korepressor in der Lage, an die Ziel-DNA zu binden (Kim *et al.*, 1995). Eine Aminosäuresubstitution im HPr am Ser46 zu Ala (*ptsH1*-Mutante) oder die Inaktivierung des Enzyms HPrK/P (kodiert vom *hprK*-Gen) führt zu einem Verlust der KKR, da kein HPr-Ser46~P mehr gebildet werden kann (Deutscher *et al.*, 1994). Bei der Metabolisierung von PTS-Substraten steigt der Level an glykolytischen Intermediaten, wie z.B. FBP, die die HPr-Kinase/Phosphorylase zur Phosphorylierung von HPr am Ser46 stimulieren. Da HPr-Ser46~P kein Substrat für das EI ist und somit nicht mehr am PTS-Transport beteiligt ist, verringert sich die Zuckeraufnahme (Reizer *et al.*, 1992). Der Hauptgrund für diese verlangsamte Phosphorylierung des HPr-Ser46 durch das EI sind wahrscheinlich elektrostatische Abstoßungskräfte zwischen der Phosphatgruppe am Ser46 und dem Glu84 im EI (Garrett *et al.*, 1999). Sobald der Level an glykolytischen Intermediaten fällt und der Level an P_i steigt, katalysiert das bifunktionale Enzym HPr-K/P die reverse Reaktion, die Dephosphorylierung von HPr-Ser46~P zu HPr. Unphosphoryliertes HPr stellt wieder ein Substrat für das EI dar und der PTS-abhängige Zuckertransport wird gesteigert. HPr-Ser46~P und doppelt-phosphoryliertes HPr (HPr-Ser46/His15~P) haben im Vergleich zum HPr-His15~P eine geringere Affinität zu den EIAs (Reizer *et al.*, 1992).

HPr-Ser46~P ist nicht nur ein Korepressor bzw. Koaktivator von CcpA, sondern besitzt auch eine Funktion bei dem Mechanismus des Induktorausschlusses. *In vitro*-Experimente lassen vermuten, dass HPr-Ser46~P mit einigen nicht-PTS-Permeasen interagiert und somit ihre Transportaktivität inhibiert (Ye & Saier, 1995).

In Gram-positiven Bakterien ist HPr-Ser46~P die Hauptregulatorkomponente in der KKR und beim Induktorausschluss. Jedoch besitzt das HPr-His15~P neben seiner Beteiligung am PEP-abhängigen PTS-Zuckertransport ebenfalls regulatorische Funktionen im Kohlenstoff-Metabolismus. Die Phosphorylierung der PRD-Domäne in Transkriptionsfaktoren und Antiterminatoren durch HPr-His15~P reguliert deren Aktivität, die so die Transkription einer großen Anzahl von Genen (Metabolismus von Kohlenstoffverbindungen „zweiter Wahl“)

modulieren (Stülke *et al.*, 1998, Greenberg *et al.*, 2002). HPr-His15~P kontrolliert durch Phosphorylierung die Glycerin-Kinase in einigen *Enterococcus*- und *Bacillus*-Arten (siehe Abschnitt 2.6.2) und den nicht-PTS-Laktose-Transporter LacS in *Streptococcus thermophilus* (Poolman *et al.*, 1995, Deutscher *et al.*, 1993).

In *Listeria monocytogenes* konnten die Gene *ptsH*, *ptsI* und *ccpA*, kodierend für die Komponenten HPr und Enzym I des PTS und das CcpA-Regulatorprotein, identifiziert werden (Christensen *et al.*, 1998, Behari & Youngman, 1998b). Es konnte auch gezeigt werden, dass eine ATP-abhängige Phosphorylierung des HPr am Ser46 durch die HPr-Kinase aus *L. monocytogenes* erfolgt und das HPr-Ser46~P den Zuckertransport über das PTS reduziert (Christensen *et al.*, 1999).

2.7.3 Komponenten der Kohlenstoff-Katabolitrepression (KKR): HPr, HPrK/P, CcpA und *cre*-Box

Das Regulatorprotein CcpA (*catabolite control protein A*)

In Gram-positiven Bakterien mit niedrigem GC-Gehalt ist CcpA der Hauptvermittler der KKR. Aufgrund seiner Sequenzhomologie gehört CcpA zur LacI/GalR-Familie von Transkriptionsregulatoren, besitzt ein N-terminales Helix-Turn-Helix-Motiv zur DNA-Bindung und ist in Gram-positiven Bakterien weit verbreitet (Nguyen & Saier, 1995). Auch in *L. monocytogenes* konnte CcpA nachgewiesen werden (Behari & Youngman, 1998b). Das 38 kD-schwere CcpA bindet an die sogenannte *cre*-Box (*cre* = *catabolite responsive element*) und kontrolliert so die Transkription zahlreicher katabolitregulierter Gene. Transkriptomstudien und Proteomanalysen mit *ccpA*-Deletionsmutanten aus *B. subtilis* ermöglichen die Identifizierung CcpA-regulierter Transkriptomeinheiten (Moreno *et al.*, 2001, Tobisch *et al.*, 1999). *E. faecalis* und *B. subtilis* *ccpA*-Deletionsmutanten zeigen im Vergleich zum Wildtyp eine größere Menge an HPr-Ser46~P, was zu einer verringerten PTS-abhängigen Glukose-Aufnahme führt (Leboeuf *et al.*, 2000, Ludwig *et al.*, 2002b). Die Deletion des *ccpA*-Gens führt zu einem vollständigen Verlust bzw. einer stark eingeschränkten KKR (Stülke & Hillen, 2000).

Es wurden in *B. subtilis* weitere trans-aktive Faktoren, CcpB und CcpC gefunden, die in der KKR involviert sind. CcpB (*catabolite control protein B*) besitzt ein dem CcpA ähnliches Helix-Turn-Helix-Motiv und zeichnet sich durch eine 45 %ige Homologie zum CcpA aus. Die Deletion des *ccpB*-Gens führt zu einer partiellen Aufhebung der KKR des Glukonat (*gnt*)- und Xylose (*xyl*)-Operons (Chauvaux *et al.*, 1998). Der trans-aktive Faktor CcpC vermittelt die KKR der *citB* und *citZ*-Gene (kodierend für die Aconitase und Citrat-Synthetase) in *B. subtilis* (Jourlin-Castelli *et al.*, 2000) und in *L. monocytogenes* die der Gene *citB* und *lmo0847* (möglicherweise kodierend für einen Glutamin-Transporter) (Kim *et al.*, 2006).

Die *cre*-Box (catabolite responsive element)

Bei der *cre*-Box handelt es sich um eine 14 bp palindromische Sequenz, an die der CcpA/HPr-Ser46~P-Komplex binden kann (Jones *et al.*, 1997). Mutationsanalysen im Promotorbereich zahlreicher, unter KKR stehender Gene in *B. subtilis* ergaben folgende Konsensussequenzen, die leicht voneinander abweichen:

TGWNANCGNTNWCA	(Weickert & Chambliss, 1990)
WGNAASCGNWWNCA	(Hueck <i>et al.</i> , 1994)
W = A oder T; N = jede Base; S = C oder G	

Die Durchsuchung der Genbank sequenzierter Gram-positiver Bakterien nach der Konsensussequenz der *cre*-Box, zeigt die weite Verbreitung dieser Sequenz im Kontrollbereich kataboler Enzyme (Hueck *et al.*, 1994).

Die Lage der *cre*-Box in Bezug auf den Transkriptionsstart katabolitregulierter Gene ist sehr variabel. Die *cre*-Box kann mit dem Promotor oder dem Transkriptionsstart überlappen, zwischen dem Transkriptionsstart und dem Startcodon lokalisiert sein oder auch stromabwärts im translatierten Bereich des Gens zu finden sein (Deutscher *et al.*, 2006). Durch Transkriptionsanalysen von *B. subtilis* konnte gezeigt werden, dass nicht alle durch CcpA-regulierten Gene *cre*-Boxen aufweisen (Moreno *et al.*, 2001).

Das hitzestabile Protein HPr

Das 9 kD-kleine HPr spielt bei der KKR in Gram-positiven und im PEP-abhängigen PTS-Zuckertransport in Gram-positiven als auch in Gram-negativen Bakterien eine entscheidende Rolle.

In vielen Gram-positiven Bakterien wird HPr nicht nur durch PEP und Enzym I am His15, sondern auch durch eine ATP-abhängige HPrK/P am Ser46 phosphoryliert. Als HPr-His15~P dient es als Phosphatgruppenüberträger beim PTS. Das HPr-Ser46~P besitzt durch die Bindung an das Regulatorprotein CcpA eine regulatorische Funktion. Der CcpA/HPr-Ser46~P-Komplex bindet an die *cre*-Boxen zahlreicher katabolitregulierter Transkriptionseinheiten. Eine *ptsH1*-Mutante in *B. subtilis*, wo der Ser46-Rest durch ein Ala oder Asp ausgetauscht wurde, verhindert eine FBP-stimulierte, ATP-abhängige Phosphorylierung von HPr. Dagegen führt eine Aminosäuresubstitution von Ser46 zu Thr46 zu einer verringerten Phosphorylierung durch die HPr-Kinase (Eisermann *et al.*, 1988, Reizer *et al.*, 1989).

B. subtilis besitzt ein HPr-Homolog, das Crh. Crh ist kein Substrat für die PEP/EI-abhängige Phosphorylierung im PTS und somit nicht am PTS-katalysierten Transport des Zuckers beteiligt, da statt des erforderlichen konservierten Histidin-Restes ein Glutamin vorliegt (Galinier *et al.*, 1997). Jedoch besitzt Crh den für die KKR erforderlichen Serin-Rest an Position 46 und wird von der HPr-Kinase in einer ATP-abhängigen Reaktion phosphoryliert. Crh-Ser46~P bildet wie HPr-Ser46~P einen Komplex mit CcpA, der die Transkription einer

Vielzahl von Genen und Operons reguliert (Galinier *et al.*, 1999). Die *ptsH1*-Mutante zeigt nur einen partiellen Verlust der KKR. Erst die zusätzliche Deletion des *crh*-Gens führt zu einer vollständigen Aufhebung der KKR (Galinier *et al.*, 1997). Die genaue Funktion von Crh bleibt jedoch unbekannt. Es wird vermutet, dass Crh in regulatorische Prozesse involviert ist, die nicht im Zusammenhang mit dem Kohlenstoff-Metabolismus stehen (Warner & Lolkema, 2003b).

Gram-negative Enterobakterien bilden keine HPr-Kinase, obwohl ihr HPr zu 45 % mit dem Gram-Positiven HPr übereinstimmt und ebenfalls eine Ser46 Phosphorylierungsstelle aufweist. Die Bereiche um den Aminosäurerest Ser46 unterscheiden sich jedoch stark. Dieser Unterschied ist möglicherweise dafür verantwortlich, dass eine HPr-Kinase aus Gram-positiven Bakterien nicht in der Lage ist, das HPr aus *E. coli* am Ser46 zu phosphorylieren (Reizer *et al.*, 1989).

Die HPr-Kinase/Phosphorylase (HPrK/P)

Das bifunktionale Enzym, die HPr-Kinase/Phosphorylase (kodiert vom *hprK*-Gen), kontrolliert den Phosphorylierungszustand des HPr-Proteins. Dieses Enzym katalysiert beides, die ATP (GTP)-abhängige Phosphorylierung des HPrs am Ser-45 und dessen Dephosphorylierung (Deutscher & Saier, 1983, Reizer *et al.*, 1998, Kravanja *et al.*, 1999). In *B. subtilis* phosphoryliert die gleiche HPrK/P das HPr-Homolog Crh am gleichen Serin-Rest (Galinier *et al.*, 1997).

Die in der HPrK/P vereinten antagonistischen Aktivitäten, Kinase und Phosphorylase werden in der Zelle als Antwort auf den Konzentrationswechsel von glykolytischen Intermediaten (Deutscher & Saier, 1983), ATP (Kravanja *et al.*, 1999), P_i (Deutscher *et al.*, 1985) und PP_i (Mijakovic *et al.*, 2002) reguliert. Die Verwertung von schnell metabolisierenden Kohlenstoffquellen, wie z.B. Glukose oder Fruktose, führt in der Zelle zu Bedingungen (erhöhte Konzentration an glykolytischen Intermediaten, ATP und PP_i), die die HPr-Kinase-Aktivität stimulieren und somit die Bildung von HPr-Ser46~P unterstützen. Die HPr-Phosphorylase-Aktivität, d.h. die Dephosphorylierungs-Reaktion von HPr-Ser46~P, wird durch P_i angeregt (Thevenot *et al.*, 1995).

Die HPrK/P zeichnet sich durch eine Nukleotid-Bindestelle, dem Walker-Motiv A (P-Loop), zwischen AS 150 und 170 aus. Diese Nukleotid-Bindestelle ist zugleich aktives Zentrum für die Phosphorylierung von HPr, als auch für die Dephosphorylierung von HPr-Ser46~P verantwortlich. In gewöhnlichen Phosphatase-Reaktionen führt ein Wassermolekül den nukleophile Angriff auf die Phosphoester-Bindung im phosphorylierten Protein aus. Bei der Dephosphorylierungsreaktion in der HPrK/P erfolgt der nukleophile Angriff auf die Phosphoryl-Gruppe im HPr-Ser46~P durch das P_i , was zur Bildung von Pyrophosphat PP_i führt (Mijakovic *et al.*, 2002). ATP und P_i konkurrieren um die Bindung an das Walker-Motiv A, wodurch die Regulation des bifunktionalen HPrK/P-Enzyms erfolgen kann (Poncet *et al.*, 2004).

Die HPr-K/P Mutante *hprKV267F* aus *L. casei*, die eine stark verringerte Phosphorylase-Aktivität besitzt, führt zu einer verstärkten HPr-Ser46~P-Produktion. Diese Mutante ist nicht mehr in der Lage, Kohlenhydrate über das PEP-abhängige PTS zu transportieren (Monedero *et al.*, 2001).

Die HprK/P zeigt keine Ähnlichkeiten mit eukaryotischen Protein-Kinasen oder Protein-Phosphatasen, jedoch ist eine Homologie mit der PEP-Carboxykinase und Nukleosiddiphosphat-Kinase zu erkennen (Galinié *et al.*, 2002, Russell *et al.*, 2002). Das *hprK*-Gen wurde aus zahlreichen Organismen kloniert, sequenziert, sowie das korrespondierende Protein HPrK/P aufgereinigt und charakterisiert (Galinié *et al.*, 1998, Kravanja *et al.*, 1999, Huynh *et al.*, 2000, Brochu & Vadeboncoeur, 1999, Choi *et al.*, 2006). In *Listeria monocytogenes* konnte gezeigt werden, dass durch Zugabe von Membranextrakten aus *Listeria monocytogenes* eine Phosphorylierung des HPr am Ser46 erfolgen kann (Christensen *et al.*, 1999). Spätere Experimente mit aufgereinigtem HPrK/P-Enzym aus *L. monocytogenes* (kodiert von lmo2483) bestätigten die in einem Enzym vereinte Kinase- und Phosphorylase-Aktivität, ähnlich dem Enzym aus *B. subtilis* (Herro *et al.*, 2005).

2.8 Zielsetzung

In zahlreichen Publikationen konnte gezeigt werden, dass in *Listeria monocytogenes* die Verwertung von PTS-abhängigen Zuckern, wie Glukose, Mannose, Fruktose und Cellobiose einen hemmenden Effekt auf die Expression der PrfA-abhängigen Virulenzfaktoren LLO, PlcA und B, InlA, B und C, ActA, UhpT und PrfA selbst hat (Gilbreth *et al.*, 2004, Park & Kroll, 1993, Milenbachs *et al.*, 1997). Dagegen zeigte die PTS-unabhängige Verwertung von Glukose-1-Phosphat, die mittels des Hexose-Phosphat-Transporters UhpT erfolgt, eine gesteigerte PrfA-Aktivität (Ripio *et al.*, 1997a).

Es scheint, dass Komponenten der globalen Kohlenstoff-Katabolitrepression (KKR) oder des PTS (Phosphoenolpyruvat-Phosphotransferase-System)-abhängigen Zuckertransports an der Modulation der PrfA-Aktivität beteiligt sind. Aus diesem Grund sollte im Rahmen dieser Arbeit die KKR-Kontrolle und der PTS-anhängige Zuckertransport in *L. monocytogenes* genauer untersucht werden. Zusätzlich sollte die Auswirkung verschiedener Kohlenstoffquellen auf die KKR-Kontrolle und PrfA-Aktivität näher analysiert werden.

Da eine $\Delta uhpT$ -Mutante (Deletion des Hexose-Phosphat-Transporters UhpT) immer noch zu einer, wenn auch verringerten, Replikation in Zytoplasma der Wirtszelle in der Lage ist (Chico-Calero *et al.*, 2002), muß die Wirtszelle dem listeriellen intrazellulären Metabolismus neben Glukose-1-Phosphat noch weitere Kohlenstoffquellen zur Verfügung stellen. Glyzerin scheint eine geeignete Kohlenstoffquelle zu sein (Joseph & Goebel, 2007). Demzufolge sollte der Glyzerin- bzw. Dihydroxyaceton-Metabolismus in *L. monocytogenes* eingehend analysiert werden. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit ist die Identifikation weiterer Kohlenstoffquellen, die *in vitro* und *in vivo* ein Wachstum von *L. monocytogenes* ermöglichen.

3 Material

3.1 Geräte

Autoklaven	Webeco
Brutschränke	Heraeus, Memmert
Blot-Kammer	Biotec-Fischer
Elektrophoresekammern	Institutswerkstatt
Elektroporationsgerät	Bio-Rad Micro Pulser
Entwickler	KODAK X-OMAT M35
FastPrep FP 120	Thermo Savant
Feinwaage	Sartorius
Fuchs-Rosenthal-Zählkammer	Loptik Labor
Gewebekulturschrank	Heraeus
Grobwaage	Sartorius
Heizblock	Liebisch
Klettphotometer	Summerson
Kühlzentrifuge	Heraeus Sepatech Minifuge RF
Magnetrührer	Gerhardt
Microarray-Scanner	Perkin Elmer
Mikroskope	Zeiss
Mikrowellengerät	Siemens
Minizentrifuge	Hettich Mikroliter
Netzgerät	Pharmacia
PCR-Gerät	Techne Progene
pH-Meter	WTW pH 523 Metrohm-Herisau
Photometer	Ultrospec 2100 pro
Real-Time-PCR-Gerät	MJ Research
Schüttelinkubatoren	HT Infors AG
Speedvac-Konzentrator	Eppendorf Concentrator 5301
Sterilbänke	Heraeus
Ultraschallgerät	Heinemann
UV-Fotoanlage	Mitsubishi
Vortex	Scientific Industries etc.
Wasserbad	GFL

3.2 Verbrauchsmaterial

Chemikalien

Die benötigten Chemikalien wurden von den Firmen Boehringer, Difco, Gibco-BRL, Merck, Oxoid, Roth, Serva und Sigma bezogen.

Enzyme

Die verwendeten Enzyme stammten von den Firmen Appligene, Biozym, Boehringer, GE Healthcare, Gibco-BRL, Invitrogen, New England Biolabs, MBI-Fermentas, Pharmacia, Promega, Roche 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 und Kohlenstoffquellen steril zugesetzt.

<u>LB-Medium:</u>	Bacto-Pepton	10,0 g
	Hefeextrakt	5,0 g
	NaCl	10,0 g
		ad 1 l H ₂ O _{dest.}

LB-Agar: auf 1 l LB-Medium werden 15,0 g Agar zugesetzt

<u>BHI:</u> (brain heart infusion broth medium)	BHI	37 g
		ad 1 l H ₂ O _{dest.}

BHI-Agar: auf 1 l BHI-Medium werden 15,0 g Agar zugesetzt

Das Minimalmedium wird wie folgt hergestellt und steril filtriert. Antibiotika und Kohlenstoffquellen können nach belieben hinzugefügt werden.

<u>Minimalmedium:</u>	Lösung A	500 ml
	Lösung B	100 ml
	Eisencitrat	20 ml
	Histidin	10 ml
	Riboflavin	10 ml
	Thiamin	10 ml
	Biotin	10 ml
	Liponsäure	10 ml
	Kohlenstoffquelle	50 ml
	ad 1 l H ₂ O _{dest.}	

<u>Lösung A:</u> (frisch)	KH ₂ PO ₄ Na ₂ HPO ₄ L-Leucin L-Isoleucin L-Valin L-Methionin L-Arginin L-Glutamin L-Cystein	6,56 g 16,4 g 0,1 g 0,1 g 0,1 g 0,1 g 0,1 g 0,6 g 0,1 g	
		<hr/> ad 500 ml H ₂ O _{dest.}	
<u>Lösung B:</u> (Stock)	MgSO ₄ x 7H ₂ O	0,41 g	
		<hr/> ad 100 ml H ₂ O _{dest.}	
<u>Eisencitrat:</u> (Stock)	Eisen-III-citrat	0,5 g	(beim Lösen erwärmen)
		<hr/> ad 100 ml H ₂ O _{dest.}	
<u>Histidin:</u> (Stock)	1 g		ad 100 ml H ₂ O _{dest.}
<u>Riboflavin:</u> (Stock)	Ameisensäure Riboflavin	5,52 ml 6 mg	
		<hr/> ad 120 ml H ₂ O _{dest.}	
<u>Thiamin:</u> (Stock)	12 mg		ad 120 ml H ₂ O _{dest.}
<u>Biotin:</u> (Stock)	6 mg		ad 120 ml H ₂ O _{dest.}

3.4 Antibiotika

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

Antibiotikum	Stammlösung	Endkonz.	Selektion
Erythromycin	100 mg/ml in 100 % EtOH	400 µg/ml	<i>E. coli</i>
		5 µg/ml	<i>Listeria</i> spp.
Kanamycin	50 mg/ml in H ₂ O _{steril}	25 µg/ml	<i>Listeria</i> spp.
Penicillin G	5 mg/ml in H ₂ O _{steril}	10 µg/ml	kompetente <i>Listeria</i> spp.

3.5 Plasmide

Vektor	Eigenschaften	Herkunft
pLSV101:	<ul style="list-style-type: none"> • Shuttle -Vektor (5492 bp) • ein Derivat des pLSV1 (Wuenschel <i>et al.</i> 1990); nichtcodierende Sequenzen wurden aus dem Vektor pLSV1 herausgeschnitten • trägt einen temperatur-sensitiven Gram-positiven Replikationsursprung (bei 30°C aktiv, bei 42°C inaktiv) und einen Origin vom Typ ColE1 für die Replikation in <i>E.coli</i> • besitzt eine Erythromycinresistenz (Em^R) 	K. Knuth
pLSV101-1017:	<ul style="list-style-type: none"> • Mutageneseplasmid (6505 bp) • ein pLSV101-Derivat, in dessen Multiple-Cloning-Site zwischen der <i>EcoRI</i>- und <i>BamHI</i>-Restriktionschnittstelle homologe Bereich des lmo1017-Gens (<i>eIIA</i>^{Glc}) kloniert wurde 	diese Arbeit
pLSV101-0344:	<ul style="list-style-type: none"> • Mutageneseplasmid (6500 bp) • ein pLSV101-Derivat, in dessen Multiple-Cloning-Site zwischen der <i>EcoRI</i>- und <i>BamHI</i>-Restriktionschnittstelle homologe Bereich des lmo0344-Gens (similar) kloniert wurde 	diese Arbeit
pLSV101-0347_48:	<ul style="list-style-type: none"> • Mutageneseplasmid (6196 bp) • ein pLSV101-Derivat, in dessen Multiple-Cloning-Site zwischen der <i>EcoRI</i>- und <i>BamHI</i> -Restriktionschnittstelle homologe Bereich des lmo0347-und lmo0348-Gens kloniert wurden 	diese Arbeit
pLSV101-2695_96:	<ul style="list-style-type: none"> • Mutageneseplasmid (6464 bp) • ein pLSV101-Derivat, in dessen Multiple-Cloning-Site zwischen der <i>EcoRI</i>- und <i>BamHI</i> -Restriktionschnittstelle homologe Bereich des lmo2695-und lmo2696-Gens kloniert wurden 	diese Arbeit
pLSV101-uhpT:	<ul style="list-style-type: none"> • Mutageneseplasmid (6569 bp) • ein pLSV101-Derivat, in dessen Multiple-Cloning-Site zwischen der <i>EcoRI</i>- und <i>BamHI</i>-Restriktionschnittstelle homologe Bereich des <i>uhpT</i>-Gens kloniert wurde 	diese Arbeit

3.6 Bakterienstämme

Bakterienstamm	Merkmale	Herkunft
<i>E.coli</i> Dh5a	siehe Stratagene Katalog	Stratagene
<i>L. monocytogenes</i> Sv1/2a EGD-e	schwach hämolytisch, pathogen; für das "Listeria Genome Sequencing Project" verwendeter Ausgangsstamm; dient als Ausgangsstamm für alle in dieser Arbeit und Diplomarbeit hergestellten Mutanten	Hahn
<i>L. monocytogenes</i> EGD-e :: <i>ccpA</i>	pSM1 Vektorinsertion in dem <i>ccpA</i> -Gen; Em ^R	Diplomarbeit
<i>L. monocytogenes</i> EGD-e :: <i>hprK</i>	pSM1 Vektorinsertion in dem <i>hprK</i> -Gen; Em ^R	Diplomarbeit
<i>L. monocytogenes</i> EGD-e :: <i>ptsH</i>	pSM1 Vektorinsertion in dem <i>ptsH</i> -Gen; Em ^R	Diplomarbeit
<i>L. monocytogenes</i> EGD-e <i>RccpA</i>	wildtypisches <i>ccpA</i> -Gen	diese Arbeit
<i>L. monocytogenes</i> EGD-e <i>RhprK</i>	wildtypisches <i>hprK</i> -Gen	diese Arbeit
<i>L. monocytogenes</i> EGD-e <i>RptsH</i>	wildtypisches <i>ptsH</i> -Gen	diese Arbeit
<i>L. monocytogenes</i> Sv1/2a EGD Δ pKP-1	<i>plcA</i> ⁻ , <i>hly</i> ⁻ , <i>mpl</i> ⁻ , <i>actA</i> ⁻ und <i>plcB</i> ⁻ ; Km ^R	Engelbrecht <i>et al.</i> 1993
<i>L. monocytogenes</i> P14-A-Stamm	konstitutiv aktives PrfA verursacht durch Gly145Ser AS-Austausch	Ripio <i>et al.</i> , 1997b
<i>L. monocytogenes</i> EGD-e A42	<i>prfA</i> ⁻	Inst.-Stamms.
<i>L. monocytogenes</i> EGD-e Δ <i>uhpT</i>	<i>uhpT</i>	diese Arbeit
<i>L. monocytogenes</i> EGD-e Δ <i>eIIA</i> ^{Glc}	<i>eIIA</i> ^{Glc} - (lmo1017)	diese Arbeit
<i>L. monocytogenes</i> EGD-e Δ 0344	lmo0344 ⁻	diese Arbeit
<i>L. monocytogenes</i> EGD-e Δ 0347-48	lmo0347 ⁻ und lmo0348 ⁻	diese Arbeit
<i>L. monocytogenes</i> EGD-e Δ 2695-96	lmo2695 ⁻ und lmo2696 ⁻	diese Arbeit
<i>L. monocytogenes</i> EGD-e Δ <i>dhaK</i>	lmo347-48 ⁻ und lmo2695-96 ⁻	diese Arbeit
<i>L. monocytogenes</i> EGD-e Δ <i>dhaK</i> /0344	lmo0344 ⁻ , lmo347-48 ⁻ und lmo2695-96 ⁻	diese Arbeit
<i>L. monocytogenes</i> EGD-e Δ <i>glpD</i> / <i>dhaK</i>	<i>glpD</i> ⁻ , lmo347-48 ⁻ und lmo2695-96 ⁻	diese Arbeit
<i>L. monocytogenes</i> EGD-e Δ <i>glpD</i> / <i>dhaK</i> / <i>uhpT</i>	<i>glpD</i> ⁻ , lmo347-48 ⁻ lmo2695-96 ⁻ und <i>uhpT</i>	diese Arbeit

3.7 Oligonukleotide

Die folgenden Oligonukleotide wurden zur Klonierung von Bereichen aus den Genen lmo1017, lmo0344, lmo0347-48, lmo2695-96 und *uhpT* in den Vektor pLSV101 verwendet. Abweichungen von der Originalsequenz sind durch Fettdruck hervorgehoben und die eingeführten Schnittstellen für Restriktionsenzyme sind unterstrichen.

Oligonukleotid	Sequenz 5'→3' Richtung	Gen/Bezugssequenz
eIIA-2	CTA AAA AAT <u>GAA TTC</u> AAA ACA ATC CAG	lmo1017 (<i>eIIA^{Glc}</i>)
eIIA-3	CGA TTT TTT <u>CCC GGG</u> TTT TTT AAA CAT	lmo1017 (<i>eIIA^{Glc}</i>)
eIIA-4	GAA GTC ATT <u>CCC GGG</u> AAT TTA AAA TAA	lmo1017 (<i>eIIA^{Glc}</i>)
eIIA-5	GTA ACT <u>GGA TCC</u> GAT ATC TTT GGT T	lmo1017 (<i>eIIA^{Glc}</i>)
uhpT-2	TAA TTT <u>TGG ATC</u> CAG CAA CGT C	<i>uhpT</i>
uhpT-3	TTT CAA <u>CCC GGG</u> TAA TGA CAT T	<i>uhpT</i>
uhpT-4	ACG ACA <u>ACC CGG</u> <u>GGT</u> TTT AC	<i>uhpT</i>
uhpT-5	CAA TTA TGG <u>GAA TTC</u> AAG ATA TCC	<i>uhpT</i>
lmo0344-2	TTG TGA <u>CGA ATT</u> <u>CGG</u> TTA CGA ACT	lmo0344
lmo0344-3	CTT TAT <u>CCC CGG</u> <u>GTT</u> TAA AAG TCA	lmo0344
lmo0344-4	CGG <u>TCC CGG</u> GAT TAA ATA AAG TAT	lmo0344
lmo0344-5	TAC CAA <u>TAG GAT</u> <u>CCA</u> GTC TTC CTA	lmo0344
lmo0347-11	TAA GAA AGG <u>TCC CGG</u> <u>GCT</u> AAG ACT T	lmo0347
lmo0347-12	CGC GCT <u>GAA TTC</u> AAT GAT TGA TTC TA	lmo0347
lmo0348-12	CTA TCA ATC <u>TGG ATC</u> <u>CGT</u> TTG GGT A	lmo0348
lmo0348-14	GAA AAG TGG <u>CCC GGG</u> ACC AGA A	lmo0348
lmo2696-1	TTC AAC <u>CCG GGG</u> TGA GCT AA	lmo2696
lmo2696-2	TCA TCG TTT <u>CGG ATC</u> <u>CTA</u> ACT TTT	lmo2696
lmo2695-2	CCC ACG <u>AAT TCA</u> AGT TGC CAT A	lmo2695
lmo2695-3	TGA TCA <u>GTC CCG</u> <u>GGA</u> AGA ATC T	lmo2695

Die folgenden Oligonukleotide wurden zur Überprüfung der verschiedenen Mutanten verwendet.

Oligonukleotid	Sequenz 5'→3' Richtung	Gen/Bezugssequenz
ccpA-1	TTT ACA ATG GTA GGT AGA GCC	<i>ccpA</i>
ccpA-2	TTG TTC TGA AAT ACG TTC GCC	<i>ccpA</i>
hprK-1	CTA AAT AAT ATT TTG TAG CGA ACA G	<i>hprK</i>
hprK-2	AAG TCT GCT TTC TAA GTA ATT CG	<i>hprK</i>
uhpT-7	CAG ATG GCC TCG ATA CAA TC	<i>uhpT</i>
uhpT-10	GCG TTT ACT GAT TGC GGC AT	<i>uhpT</i>
ptsH-1	TCA ATA ATG TCT CCA ACA TGT	<i>ptsH</i>
ptsH-2	AGC AGA TAA GCT TTC GCA ATG	<i>ptsH</i>
eIIA-1	CCG CGT ACC AGG TGT TAG AT	lmo1017 (<i>eIIA^{Glc}</i>)
eIIA-6	GAA TCC AGC GTT TTA GGC GT	lmo1017 (<i>eIIA^{Glc}</i>)
lmo0344-1	CGG TGA TGA AAC GCT CGT AA	lmo0344

Oligonukleotid	Sequenz 5' ->3' Richtung	Gen/Bezugssequenz
lmo0344-6	GGA AAA GGC TTC CTG GGA TA	lmo0344
lmo0347-13	CCC ACA CAT ACT ACA GGA GT	lmo0347
lmo0348-15	CAA CGA TTG CAG GTG GCT TT	lmo0348
lmo2695-1	GCC AGT TCG ATA CCA TGC AA	lmo2695
lmo2696-3	GAT AGT TGC AGC GGA GAC AA	lmo2696
pLSV-BamHI	AAT TTG CTT GGC TGC AGG TC	pLSV101
pLSV-EcoRI	GTT TTC CCA GTC ACG ACG TT	pLSV101

Die folgenden Oligonukleotide wurden zur Amplifikation von cDNA in der Real-time RT-PCR verwendet.

Haushaltsgen *rpoB*:

Oligonukleotid	Sequenz 5' ->3' Richtung	Gen/Bezugssequenz
rpoB RT (F)	CAC CCT GAA GCT CCA TTT GT	<i>rpoB</i>
rpoB RT (R)	ACA CGA CGA ACC CAG ATT TC	<i>rpoB</i>

Virulenzgene:

Oligonukleotid	Sequenz 5' ->3' Richtung	Gen/Bezugssequenz
actA-C2	CCC TGC ACT TTT ATC AAC AAT C	<i>actA</i>
actA-N	AGC AGA TGA GTC TTC ACC ACA	<i>actA</i>
hly-C2	TTA TTG TCT TGA TTA GTC ATA C	<i>hly</i>
hly-N	ATG CAA TTT CGA GCC TAA CCT	<i>hly</i>
uhpT RT (F)	AAG CGC TAG GAT GGA GCA CAA	<i>uhpT</i>
uhpT RT (R)	CAA CTG CAA TAA TCG AGC AAA G	<i>uhpT</i>
inlA AO	TTT TTC CTA AGA CCG TCT TC	<i>inlA</i>
inlA-N	ATA TTA GTA TTT GGC AGC GG	<i>inlA</i>
inlB RT (F)	TTT CTA TCA GCC AGT CAC TAT TGG A	<i>inlB</i>
inlB RT (R)	CGC GTC CCT GCT TCT ACT TTT GT	<i>inlB</i>
inlC RT (F)	CAA ATA CAG GTG GAC TAA CTA GA	<i>inlC</i>
inlC RT (R)	GAT ATC CAT CTT CCA TCT GGG T	<i>inlC</i>
mpl RT (F)	TTG CTC CAG AGG CCA CTA CAT GT	<i>mpl</i>
mpl RT (R)	GAT ACC ACT TTC CCA AAC GAA GTG	<i>mpl</i>
plcA RT (F)	AAT GCA TCA CTT TCA GGT GTA TTA GA	<i>plcA</i>
plcA RT (R)	GTT GAT TAG TGG TTG GAT CCG ATA A	<i>plcA</i>
plcB RT (F)	TCA AGG AAT ATA TGA TGC GGA TCA T	<i>plcB</i>
plcB RT (R)	CTT TGC TCC TGT TAT TTT CGC ATT A	<i>plcB</i>
prfA RT (F)	CAG GCT ACC GCA TAC GTT ATC AAA	<i>prfA</i>
prfA RT (R)	AGC CAA GCT TCC CGT TAA TCG AAA	<i>prfA</i>

Kohlenstoff-Katabolitrepresion und polarer Effekt:

Oligonukleotid	Sequenz 5' ->3' Richtung	Gen/Bezugssequenz
ccpA(2) RT (F)	AGC AGG AGC CGT TGA TAT GGA	<i>ccpA</i>
ccpA RT (R)	CGG CTC GTT TAG AGA ACC ACT TA	<i>ccpA</i>
hprP RT (F)	GGA GTT TAT GAA GCG ATT CGT GCT T	<i>hprK</i>
hprP RT (R)	GAT CTA ATC CAA TCA CCA CTT GGA A	<i>hprK</i>
hprK RT (F)	TTA GAA AGC AGA CTT GCG CCA GTT	<i>hprK</i>
hprK RT (R)	CTA CAA GTC TAT GCC CGC GTT TTA	<i>hprK</i>
lgt RT (F)	CGA GAA GAC TGC CAT TGC CTA TAA	<i>lgt</i>
lgt RT (R)	CCC AAC ACG ATA CTC CGA AAG TAA	<i>lgt</i>
lmo1003 RT (F)	CAC GTG GAG CTT GCA GCA AAC AT	lmo1003
lmo1003 RT (R)	CTG CTC TTC TTC CGT TGG GAA ATT	lmo1003
ptsH RT (F)	TCT ATT GGT GCA GGC TGC AAG TAA	<i>ptsH</i>
ptsH RT (R)	CAT CGC TAC CTT CAG TGT AGA TAG	<i>ptsH</i>
tyrS RT (F)	TGC CGT TTG CAA ATT GGT GGT AGT	<i>tyrS</i>
tyrS RT (R)	GAT TTC CCA AAT TTC GTT CCA TCA G	<i>tyrS</i>

Glyzerin-Metabolismus:

Oligonukleotid	Sequenz 5' ->3' Richtung	Gen/Bezugssequenz
glpD RT (F)	ACG ACG TAA AAT TCT AAG CGC AA	<i>glpD</i>
glpD RT (R)	TGT TAC GGT TAC GCC AAC TAC TT	<i>glpD</i>
glpF RT (F)	CCA CAG GAC CAG CGA TTA GAA AT	<i>glpF</i>
glpF RT (R)	GGT AGT AAA AAG TAA GCA AGC CTT	<i>glpF</i>
lmo0344 RT (F)	ACT GGC GGC CGG AAA AAT CGT TA	lmo0344
lmo0344 RT (R)	AGG CGC CCA TTC CAT TGC TAA T	lmo0344
lmo0347 RT (F)	CTT GGA AAA GTT GGT GGC GCA T	lmo0347
lmo0347 RT (R)	GCA GCG GCC CCA TTT ATA ATC A	lmo0347
lmo0348 RT (F)	ATG TAC GGG AAC TAT GCT GGC GAT	lmo0348
lmo0348 RT (R)	TCA GCA GCT TGT TTT ACC GCA TCT A	lmo0348
lmo1034 RT (F)	CAC TTT ATG GAC AAG GCT GTG ATA	lmo1034
lmo1034 RT (R)	AAA CTG GTT CAC GCC TGC AAC AT	lmo1034
lmo1538 RT (F)	CGG ACA CAG TGC CTT ATC ACT T	lmo1538
lmo1538 RT (R)	TCC CCA GTG TTC ATT AGC AAG AA	lmo1538
lmo1539 RT (F)	TGC ACC TAG TGA TAG TAA TCC AAA	lmo1539
lmo1539 RT (R)	GTG GAA TTA CGT ATT GCC ATA TAT T	lmo1539
lmo1737 RT (F)	GTA AAG CGG CAG CAG CAG TTT TA	lmo1737
lmo1737 RT (R)	AGT AAC TCT TTT GGT GAG TCT AAA A	lmo1737
lmo2695 RT (F)	CGG GAC AGT TCT CGT GCA TAA AA	lmo2695
lmo2695 RT (R)	CTT CGG GAA CTG TAC AAG GAG AA	lmo2695
lmo2696 RT (F)	AAA CCG CTG GGA TGA CAA TGG T	lmo2696
lmo2696 RT (R)	ACT TTT GTA AGG CCG ACC GCA T	lmo2696

3.8 Eukaryotische Zelltypen

J774

Zelltyp: Monozyten-Makrophagen aus der Maus

Herkunft: wurden ursprünglich 1968 aus einem Tumor der BALB/c Maus (Haplotyp H-2d) isoliert.

Kulturmedium: 1640 RPMI + L-Glutamin/ 10 % (v/v) FKS ohne Zusätze.

3.9 Kits

DNA-free™ Kit (Ambion)

Nucleobond® AX Purification of Plasmids (Macherey-Nagel)

UltraPrep Plasmid Mini (Molzym GmbH & Co.KG)

QIAquick™ PCR Purification Kit (QIAGEN)

RNeasy Mini Kit (QIAGEN)

ABolute™ QPCR SYBR® Green Mix (Thermo Scientific)

ECL™ Western blotting detection reagents (GE Healthcare)

3.10 Molekulargewichtsstandard

3.10.1 Molekulargewichtsmarker für DNA

Gene Ruler™ TM 1 kb-DNA-Ladder

1 µg/Spur aufgetragen

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

3.10.2 Molekulargewichtsmarker für Proteine

Prestained Precision Plus Protein™ Standards (BioRad)

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

SDS-PAGE Standard Broad Range (BioRad)

Bande		[kD]	Bande		[kD]
1	Myosin	200	6	Carbonic anhydrase	31
2	β -Galaktosidase	116	7	Soybean trypsin inhibitor	21
3	Phosphorylase	97	8	Lysozym	14
4	BSA	66	9	Aprotinin	6
5	Ovalbumin	45			

(BSA= Bovine serum albumin)

4 Methoden

4.1 Molekulargenetische Methoden

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

4.1.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Plasmidisolierung: Midiprep

Mit dem Kit Nucleobond[®] AX Purification of Plasmids (Macherey-Nagel) kann die Plasmid-DNA aus 50 ml Bakterien-ÜN-Kultur isoliert werden. Die Durchführung erfolgte gemäß dem Protokoll des Herstellers.

Plasmidisolierung: Miniprep

Mit dem UltraPrep Kit (Molzym GmbH & Co.KG) kann aus 1 - 6 ml Bakterien-ÜN-Kultur Plasmid-DNA isoliert werden. Die Durchführung erfolgte gemäß dem Protokoll des Herstellers.

4.1.2 Reinigung von DNA/PCR-Produkten und Verdaus

Die PCR-Produkte wurden unter Verwendung des QIAquick PCR Purification Kits (Qiagen) gereinigt. Ebenso kann der QIAquick PCR Purification Kit zur Reinigung eines Restriktionsansatzes angewendet werden. Die Durchführung erfolgte genau nach dem Protokoll des Herstellers.

4.1.3 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentrationsbestimmung von RNA und DNA basiert auf dem Absorptionsmaximum der Nucleinsäuren bei 260 nm. Für die Absorption sind die aromatischen Ringe der Basen verantwortlich. Die Absorption bei 260 nm wird photometrisch in Quarzküvetten gemessen, da diese das UV-Licht nicht absorbieren. Um die Reinheit (= Proteinfreiheit) der DNA- bzw. RNA-Probe zu ermitteln, wird zusätzlich die optische Dichte bei 280 nm gemessen. Der Quotient (Ratio) aus OD_{260nm}/OD_{280nm} gibt Auskunft über die Reinheit und sollte zwischen 1.5 und 2.0 liegen. Eine reine DNA-Lösung besitzt einen OD_{260nm}/OD_{280nm} von 1.8, eine reine RNA-Lösung von 2.0. Ist die Nucleinsäurelösung mit Proteinen kontaminiert, so ist der Wert signifikant kleiner.

Messung

- die DNA-Probe wird 1:100 mit H₂O_{dest.} verdünnt und die Extinktion bei 260 nm und 280 nm gemessen
- die Konzentration der DNA berechnet man nach folgender Formel:

$$\text{DNA-Konzentration } [\mu\text{g/ml}] = \frac{\text{OD}_{260\text{nm}} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 50 \text{ (dsDNA)}}{\text{OD}_{260\text{nm}} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 30 \text{ (ssDNA)}}$$

4.1.4 Elektrophoretische Auftrennung von DNA

Verschieden große DNA-Fragmente können mittels Gel-Elektrophorese aufgrund ihrer elektrischen Ladung aufgetrennt werden. Das dem Agarosegel zugesetzte Ethidiumbromid lagert sich in die dsDNA ein. Unter einer UV-Lampe werden somit fluoreszierende DNA-Fragmente in Form von Banden sichtbar.

Das Wanderungsverhalten der DNA im Agarosegel hängt ab von:

⇒ *Größe der dsDNA*

Die Wanderung zur Anode ist umso langsamer, je größer das DNA-Fragment ist.

⇒ *Konformation der dsDNA*

Die relaxierte DNA wandert langsamer als die ringförmige superhelikale Form.

⇒ *Agarosekonzentration*

Es können je nach Agarosekonzentration 0,2 bis 20 kb große DNA-Fragmente aufgetrennt werden. Ein 1 %iges Agarosegel eignet sich zur Auftrennung von DNA-Fragmenten im Bereich von 0,4 bis 6 kb.

⇒ *Stromstärke; Puffer*

Puffer für Agarosegel-Elektrophorese

<u>50 x TAE-Puffer:</u>	Tris	242,0 g
	Eisessig	57,1 ml
	EDTA 0,5 M, pH 8,0	100 ml
		ad 1000 ml H ₂ O _{dest.}

<u>5 x TBE-Puffer:</u>	Tris	54,0 g
	Borsäure	27,5 g
	EDTA 0,5 M, pH 8,0	20,0 ml
		ad 1000 ml H ₂ O _{dest.}

Ethidiumbromid-Lösung: 10 mg/ml H₂O_{dest.}
lichtgeschützt bei 4°C lagern
Vorsicht! EtBr ist mutagen und toxisch!

<u>10 x Probenpuffer:</u> (bei 4°C lagern)	Bromphenolblau	0,01 g
	Xylen Cyanol FF	0,02 g
	Saccharose	4,0 g
		ad 10 ml H ₂ O _{dest.}

Herstellung eines 1 %igen Agarosegels

- als Laufpuffer dient 1 x TAE oder 0,5 x TBE
- in 150 ml Laufpuffer wird 1,5 g Agarose kurz aufgekocht, bis sich die Agarose vollständig gelöst hat
- anschließend wird das Gel in eine Gelkammer mit eingesetztem Kamm gegossen
- nach 45 min werden die DNA-Proben mit 1/10 Vol. Probenpuffer gemischt und in die Geltaschen pipettiert
- die Elektrophorese erfolgt bei einer Spannung von 160 V für 45 min
- nach dem Färben in einem EtBr-Bad (1 x TBE/TAE + 1 µg/ml EtBr) betrachtet man das Gel unter einer UV-Lampe (300 nm) und dokumentiert die aufgetrennten DNA-Fragmente

4.1.5 Polymerase Chain Reaction (PCR)

Die PCR ermöglicht die Anreicherung von DNA-Bereichen mit definierter Sequenz und Länge in einem mehrfach wiederholten Kreisprozess. In der PCR kommen hitzestabile DNA-Polymerasen aus thermophilen Bakterien zum Einsatz, wie z.B. die Taq-Polymerase aus *Thermus aquaticus*, Tfl-Polymerase aus *Thermus flavus* und Tth-Polymerase aus *Thermus thermophilus*. Diese Polymerasen sind auch nach mehrfachem Erhitzen bis auf 94°C noch aktiv. Als Template kann gereinigte chromosomale DNA, isolierte Plasmid-DNA oder Bakterien-Zellysate dienen. Die DNA-Polymerase benötigt einen kurzen doppelsträngigen Bereich als Oligonukleotid. Der zu amplifizierende Bereich wird von zwei Oligonukleotiden (Oligonukleotiden) flankiert, die jeweils an einen der beiden DNA-Stränge binden. Für Klonierungsansätze wurde eine proof-reading DNA-Polymerase verwendet.

Folgende Schritte werden bei der PCR wiederholt durchlaufen:

- **Denaturierung:** die doppelsträngige Ausgangs-DNA (dsDNA) wird durch Erhitzen auf 94°C in Einzelstrang-DNA (ssDNA) überführt
- **Annealing:** Anlagerung eines bzw. mehrerer (i.d.R. zwei) für die Zielsequenz spezifischen Oligonukleotide an die komplementäre ssDNA; die gewählten Annealingtemperaturen liegen zwischen 48°C und 58°C und sind von der Schmelztemperatur und der Homologie der Oligonukleotide zum DNA-Template abhängig.
- **Elongation:** Kettenverlängerung, d.h. Vervielfältigung der zwischen den Oligonukleotiden liegenden DNA-Sequenz an den 3'-OH-Enden der Oligonukleotide durch die thermostabile DNA-Polymerase bei 72°C; die Elongationszeit hängt von der verwendeten Polymerase ab [z.B. i-proof (BioRad) 15 s / 1kb; Taq (Molzym) 1 min/1 kb)].

Standard-PCR-Ansatz:

DNA (Plasmid- oder chromosomale)	100 - 500 ng
Polymerase Puffer 10 x (+MgCl ₂)	10,0 µl
dNTPs (20 mM)	1,0 µl
Enhancer	1,0 µl
Oligonukleotid I (0,5 µg/µl)	1,0 µl
Oligonukleotid II (0,5 µg/µl)	1,0 µl
MolTaq Polymerase (5 U/µl)	0,4 µl
	ad 100 µl H ₂ O _{dest.}

Standard-PCR-Bedingungen:

94°C 3 min initiale Denaturierung

30 Zyklen:

94°C 1 min Denaturierung

x°C 1 min Annealing

72°C x min Elongation (1 kb)

72°C 7 min last step delay

Bei der Auswahl der Oligonukleotide sollten folgende Kriterien beachtet werden:

→ GC-Gehalt ca. 50 %

→ ideale Länge 18 - 28 bp

→ palindromische Sequenzen vermeiden

→ Homologien der Oligonukleotide 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

Anhand einer Faustformel wird die Schmelztemperatur (T_m) der Oligonukleotide errechnet:

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

Die optimale Annealingtemperatur liegt 2 - 5°C unter dem niedrigeren beider errechneter Schmelzpunkte.

Diese Faustregel gilt allerdings nur für Oligonukleotide mit ca. 18 - 24 Nukleotiden.

Wenn unspezifische PCR-Produkte gebildet werden, sollte die Annealingtemperatur angehoben werden.

PCR mit Bakterienlysat

Der Einsatz von Lysat-DNA eignet sich zum spezifischen Test mehrerer Klone mittels PCR:

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

Touchdown-PCR

Um in einer PCR die Spezifität der PCR-Produkte zu erhöhen und eine größere Ausbeute dieser Produkte zu erhalten, kann die Methode der Touchdown-PCR angewendet werden. Zudem eignet sich diese Methode auch für PCRs mit Oligonukleotiden, die stark unterschiedliche Schmelztemperaturen (T_m) haben.

Dabei handelt es sich um eine Standard-PCR, bei der die Annealingtemperatur pro Zyklus abgesenkt wird. Man startet die PCR 2 - 3°C über der ermittelten Annealingtemperatur und senkt sie dann in den ersten 10 - 15 Zyklen pro Zyklus um 0,2 - 0,5°C. So ist das Annealing der Oligonukleotide bei hohen Temperaturen begünstigt, was zu großer Spezifität der PCR-Produkte führt. Anschließend werden nochmals 10 - 15 Zyklen mit der ursprünglich ermittelten Temperatur durchgeführt.

In dieser Arbeit wurde die Methode der Touchdown-PCR hauptsächlich angewendet, da sich die Oligonukleotidpaare in ihrer Schmelztemperatur häufig stark unterschieden.

4.1.6 Restriktionsverdau von DNA

Restriktionsendonukleasen sind Bestandteil des Restriktions-/Modifikations-Systems, welches 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 das sequenzspezifische Schneiden von dsDNA. Je nach Restriktionsenzym und Angaben des Herstellers werden verschiedene Pufferbedingungen (1 x oder 2 x) und optimale Temperaturen (37°C oder 30°C) benötigt. Ein Unit Restriktionsenzym spaltet bei optimalen Reaktionsbedingungen 1 µg DNA pro Stunde. Man unterscheidet den *partiellen Verdau*, bei dem geringe Enzymmengen eingesetzt werden, und den *vollständigen Verdau*, bei dem ein Überschuss an Restriktionsenzym eingesetzt wird. Allerdings sollte die eingesetzte Enzymmenge nicht 1/10 des Gesamtvolumens überschreiten, weil sonst eine Inhibition der Enzymreaktion durch zu hohe Glycerin-Konzentrationen stattfinden könnte.

Verdau von Plasmid-DNA/PCR-Fragmenten

Standardansatz:

Plasmid-DNA/PCR-Fragment	1-2 µg
10 x Puffer (Enzymspezifisch)	2/4 µl (je nach Enzym)
Restriktionsenzym	1 - 2 µl (ca. 10 - 20 Units)
	<u>ad 20 µl H₂O_{dest.}</u>

Der Verdau inkubiert 2 h bei 37°C (Temperaturwahl ist abhängig vom Enzym).

Bei einem Doppelverdau wird nach dem ersten Restriktionsverdau mit Enzym I die Probe mit dem QIAquick PCR Purification Kit gereinigt (siehe 4.1.2). Danach kann der Restriktionsverdau mit dem Enzym II durchgeführt werden.

Die Kontrolle des Verdau erfolgt über elektrophoretische Auftrennung auf einem Agarosegel (siehe 4.1.4).

4.1.7 Ligation von DNA-Fragmenten

Zusammen mit den Restriktionsenzymen ist die T4-DNA-Ligase eines der grundlegenden Enzyme zur Herstellung rekombinanter DNA-Moleküle. Sie ist in der Lage, freie 3'-Hydroxylenden mit 5'-Phosphatenden von doppelsträngiger DNA unter ATP-Verbrauch zu verknüpfen. Sowohl kohäsive Enden ("sticky ends") als auch glatte Enden ("blunt ends") können jeweils miteinander verbunden werden.

Häufig soll ein spezielles DNA-Fragment (Insert) in einen Klonierungsvektor eingefügt werden. Wird das Insert vorher durch PCR amplifiziert, so können über die Oligonukleotide Schnittstellen für gewünschte Enzyme eingefügt werden.

Klonierungsvektor und Insert werden vor der Ligation mit den entsprechenden Enzymen geschnitten (siehe 4.1.6) und gereinigt (siehe 4.1.2). Bei einer Ligation wird ungefähr dreimal mehr Insert als Vektor-DNA eingesetzt (Größe der DNA-Fragmente und Konzentrationen werden berücksichtigt).

Ligation kohäsiver Enden:

Die DNA-Gesamtmenge sollte zwischen 10 ng und 100 ng betragen.

geschnittener Vektor	25 ng
Insert bzw. mehrere Inserts je	75 ng
10 x T4-Ligase-Puffer (enthält ATP)	2,0 µl
T4-Ligase (1 U/µl)	1,0 µl
	ad 20 µl H ₂ O _{dest.}

Der Ligationsansatz wird 1 h bei Raumtemperatur bzw. über Nacht bei 16°C inkubiert und der gesamte Ansatz für eine Transformation in *E. coli* (siehe 4.1.8) eingesetzt.

4.1.8 Transformation in *E. coli*

Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen (DH5α)

<u>Lösung I:</u> (frisch ansetzen)	MgSO ₄ (steril filtriert)	10 mM
	Glukose (steril filtriert)	0,2 % (w/v)
		ad 100 ml LB-Medium

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

- eine ÜN-Kultur von *E. coli* wird im Klettkolben 1:100 mit 50 ml Lösung I verdünnt und im Schüttler bei 37°C bis zur mittleren log. Phase (OD_{600nm} = 0,5; 100 - 120 Klett) angezogen
- die Zellen werden in vorgekühlte Greinerröhrchen gefüllt und für 10 min auf Eis gestellt

- nach dem Abzentrifugieren (6000 rpm; 4°C; 10 min) wird das Pellet in 0,5 ml Lösung I (vorgekühlt) aufgenommen
- nach Zugabe von 2,5 ml Lösung II werden Aliquots von je 100 µl bei -80°C eingefroren

Transformation von Plasmid-DNA in *E. coli*

- zu 100 µl kompetenten *E. coli*-Zellen wird der gesamte Ligationsansatz (20 µl) gegeben
- als Negativkontrolle wird ein Aliquot kompetenter Zellen eingesetzt
- Inkubation des Ansatzes von 30 bis 60 min auf Eis
- anschließend wird der Ansatz 90 s lang in ein 42°C-warmes Wasserbad gegeben und danach 2 min auf Eis gestellt
- es werden 800 µl LB-Medium zugegeben und der Ansatz bei 37°C inkubiert; zur Ausprägung von Antibiotikaresistenzen, wie z.B. Ampicillin, Chloramphenicol oder Kanamycin wird normalerweise 1 h lang, bei Erythromycin hingegen muss 5 - 6 h lang inkubiert werden
- je 100 µl Transformationsansatz werden dann auf LB-Platten mit den entsprechenden Antibiotika ausplattiert und ÜN bei 37°C inkubiert

4.1.9 Elektroporation in Listerien

Herstellung kompetenter Listerien

<u>SMHEM-Medium (3,5 x):</u>	Saccharose	952 mM
	MgCl ₂	3,7 mM
	HEPES	7,0 mM
	ad 200 ml H ₂ O _{dest.} , pH 7,2	

- eine *Listerien*-ÜN-Kultur wird 1:20 mit 100 ml BHI-Medium + 0,2 % Glycin verdünnt
- nach Inkubation bei 37°C bis 90 Klett erfolgt die Zugabe von Penicillin G (5 µg/ml)
- erneute Inkubation bei 37°C bis 120 Klett
- die Bakterienzellen werden abzentrifugiert (6000 rpm; 4°C; 10 min) und anschließend zweimal mit 1/10 Vol. 3,5 x SMHEM gewaschen
- nach dem letzten Waschschrift wird das Bakterienpellet in 1/100 Vol. SMHEM resuspendiert und in 100 µl-Aliquots bei -80°C eingefroren

Elektroporation

- 100 µl kompetente Listerien werden auf Eis aufgetaut und mit maximal 5 µl DNA-Lösung (2 – 4 µg) in einer vorgekühlten Elektroporationsküvette gemischt
- nach einer kurzen Inkubation der Küvette auf Eis erfolgt die Elektroporation bei 2,25 kV für 3 - 4 s
- anschließend wird sofort 1 ml vorgewärmtes BHI-Medium zugegeben und der Elektroporationsansatz in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt
- die Zwischenzüchtung erfolgt bei 37°C (bzw. 30°C bei temperatursensitivem Vektor) für 1 bis 6 h (je nach Antibiotikumresistenz: Cm und Km 1 h; Em 5 - 6 h)
- die Zellen werden dann auf den entsprechenden Selektionsplatten ausplattiert und für 1 - 3 Tage bei 37°C (bzw. 30°C) inkubiert

4.1.10 Mutagenese durch homologe Rekombination (Wuenscher *et al.*, 1991)

Die homologe Rekombination ist eine gängige Methode, um mit Hilfe eines temperatursensitiven (*ts*) Vektors Deletions- oder Insertionsmutanten herzustellen, bzw. chromosomale Genabschnitte auszutauschen. Dieser Vektor, der eine Antibiotikumresistenz trägt, kann aufgrund seines *ts*-Origins in Gram-positiven Bakterien (Listerien) nur bei 30°C, nicht aber bei 42°C (auch nicht bei 37°C) replizieren. Besitzt dieser Vektor homologe Bereiche zum Genom des zu mutierenden Bakteriums, so kann eine Integration des Vektors ins bakterielle Chromosom erfolgen. Nur durch die Integration des rekombinanten *ts*-Plasmids in das bakterielle Chromosom ist eine Replikation (zusammen mit dem Chromosom) und somit die Ausbildung einer Antibiotikaresistenz bei 37°C bzw. 42°C gewährleistet.

Für die homologe Rekombination sind mindestens 100 bp des chromosomalen Bereichs, der mutiert werden soll, erforderlich. Je größer dieser Bereich ist, umso wahrscheinlicher tritt das Ereignis der homologen Rekombination ein. Dieser Bereich kann mittels PCR amplifiziert und anschließend in die "multiple cloning site" eines Vektors kloniert werden.

Konstruktion von Deletionsmutanten

Bei der Herstellung von Deletionsmutanten werden zwei zum Chromosom homologe DNA-Fragmente in den temperatur-sensitiven Vektor pLSV101 inseriert. Die in den Vektor klonierten Fragmente D1 und D2 liegen „upstream“ bzw. „downstream“ des zu deletierenden Gens. Bei der ersten homologen Rekombination inseriert das Deletionsplasmid entweder über Fragment D1 oder D2. Nach Überprüfung des „einmal cross-over“ wird ohne Antibiotikum bei 30°C subkultiviert. Dabei kann es zufällig zu einem zweiten Rekombinationsereignis kommen. Je nachdem, über welches Fragment die Rekombination erfolgt, kann es entweder zur Exzision des Deletionsplasmids und somit zur Wiederherstellung des wildtypischen Genotyps kommen oder zur gewünschten Deletion führen.

- das Deletionsplasmid wird in *L. monocytogenes* über Elektroporation (siehe 4.1.9) transformiert
- die transformierten Zellen werden auf den entsprechenden Selektionsplatten [BHI –Platten mit 10 µg/ml Erythromycin (Em)] ausplattiert und bei 30°C inkubiert
- nach 2 - 3 Tagen wird mit dem erhaltenen Klon, der mittels PCR auf das Vorhandensein des Plasmids überprüft wurde, eine ÜN-Kultur mit dem entsprechenden Antibiotikum (BHI, 10 µg/µl Em) angelegt und bei 30°C inkubiert
- anschließend wird die ÜN-Kultur auf vorgewärmte BHI-Platten (mit 10 µg/µl Em) in den Verdünnungsstufen 10^{-1} bis 10^{-4} ausplattiert und bei 42°C inkubiert
- nach 1 - 2 Tagen wird die Integration des Deletionsplasmids in das bakterielle Chromosom mittels PCR überprüft, unter Verwendung von Vektor-spezifischen Oligonukleotiden und Oligonukleotide, die flankierend des klonierten Bereichs liegen
- die positiven Klone, die nun das Plasmid über homologe Rekombination in ihr Chromosom integriert haben und somit bei 42°C die Erythromycinresistenz ausbilden, werden nun in BHI bei 30°C ohne Antibiotikum subkultiviert
- nach einigen Subkultivierungsschritten wird durch Ausplattieren auf BHI-Platten mit und ohne Em auf den Verlust der Erythromycinresistenz hin überprüft

- nur in Em-sensitive Klone hat sich eine zweite homologe Rekombination ereignet, die entweder zur Herstellung der wildtypischen Genlokus geführt hat oder zur Entfernung des gewünschten chromosomalen Bereichs.
- durch die Verwendung von geeigneten Oligonukleotiden müssen die Deletionsmutanten mittels PCR (siehe 4.1.5) identifiziert werden und durch Sequenzierung (siehe 4.1.11) überprüft werden.

4.1.11 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung von PCR-Fragmenten oder Plasmid-DNA werden von SEQLAB Sequence Laboratories Göttingen GmbH durchgeführt. Dazu wurden folgende Ansätze pipettiert und eingeschickt.

Plasmid-DNA	0,6 µg
PCR-Produkt	25 ng pro 100 bp
Oligonukleotid	20 pMol
	ad 7 µl H ₂ O _{dest.}

4.1.12 Herstellung von Glyzerinkulturen

Um Bakterien längerfristig lagern zu können, werden diese bei -80°C eingefroren. Hierfür wird allerdings ein spezielles Medium benötigt:

<u>Einfriermedium:</u>	Glyzerin	50 % (v/v)
	NaCl	2,9 % (w/v)

- eine Bakterien-ÜN-Kultur wird 1:1 mit dem Einfriermedium gemischt und 1,8 ml dieser Lösung bei -80°C eingefroren

4.1.13 RNA-Isolierung aus *Listeria monocytogenes*

Beim Arbeiten mit RNA sollten, um Kontaminationen mit RNasen zu vermeiden, Handschuhe getragen und RNase freie Materialien (z.B. Pipetten, Pipettenspitzen, Lösungen etc.) verwendet werden.

RNA-Isolierung aus Listerien gewachsen in BHI-Vollmedium

- eine ÜN-Kultur wird 1:10 in BHI verdünnt und im Schüttler bei 37°C inkubiert
- bei einer gewünschten optischen Dichte werden 10 ml der Listerienkultur abzentrifugiert (6000 rpm; 4°C; 15 min) und das Pellet wird in flüssigem N₂ schockgefroren
- bis zur Weiterbearbeitung kann das Pellet bei -80°C gelagert werden
- das Pellet wird in 700 µl RLT-Puffer (RNeasy Mini Kit von Qiagen) und 7 µl β-Mercaptoethanol resuspendiert
- die entstandene Lösung wird in ein Lysing Matrix B Tube (Qbiogene) mit Silikatkügelchen überführt

- die Bakterienzellen werden im FastPrep FP120 (dreimal; Geschwindigkeit 6,5; 45 s) lysiert; um ein starkes Erwärmen der Lösung zu vermeiden, wird das Tube zwischen den einzelnen Vorgängen kurze Zeit auf Eis inkubiert
- die Bakterientrümmen und Silikatkügelchen werden für 3 - 5 min bei 15000 rpm abzentrifugiert
- der Überstand wird in ein Greinerröhrchen überführt, mit 500 µl absolutem EtOH gemischt, auf eine Säule (RNeasy Mini Kit) gegeben und zentrifugiert (15000 rpm, 1 min; RT)
- es werden 700 µl RWI Puffer zugegeben und erneut zentrifugiert (15000 rpm, 1 min; RT)
- DNase-Behandlung: 70 µl RDD-Puffer und 10 µl DNase I (Qiagen) werden vorsichtig gemischt (DNase I ist sehr empfindlich gegenüber physikalischer Denaturierung) und auf die Säule gegeben, es erfolgt eine Inkubation bei RT für 15 min
- anschließend werden 350 µl RWI-Puffer zugegeben und zentrifugiert (15000 rpm, 1 min; RT)
- die Säule wird zweimal mit je 500 µl RDE-Puffer gewaschen
- nach dem letzten Waschschrift wird die Säule durch erneutes Zentrifugieren getrocknet (15000 rpm, 3 min; RT)
- die Säule wird in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und die RNA wird in 30 µl RNase freiem Wasser mittels Zentrifugation (15000 rpm, 1 min; RT) eluiert
- Konzentrationsbestimmung (siehe 4.1.15)
- die Aufbewahrung der isolierten RNA erfolgt bei -80 °C

RNA-Isolierung aus Listerien gewachsen in definiertem Minimalmedium

- eine ÜN-Kultur wird 1:10 in Minimalmedium (MM) verdünnt und im Schüttler bei 37°C inkubiert
- bei einer gewünschten optischen Dichte werden 50 ml Listerienkultur abzentrifugiert (6000 rpm; 4°C; 15 min) und das Pellet wird in flüssigem N₂ schockgefroren
- bis zur Weiterbearbeitung kann das Pellet bei -80°C gelagert werden
- das Pellet wird in 1,5 ml RLT-Puffer (Qiagen) und 15 µl β-Mercaptoethanol resuspendiert
- die entstandene Lösung wird auf zwei Lysing Matrix B Tubes (Qbiogene) mit Silikatkügelchen verteilt
- die Bakterienzellen werden im FastPrep FP120 (dreimal; Geschwindigkeit 6,5; 45 s) lysiert; um ein starkes Erwärmen der Lösung zu vermeiden, wird das Tube zwischen den einzelnen Vorgängen kurze Zeit auf Eis inkubiert
- die Bakterientrümmen und Silikatkügelchen werden für 3 - 5 min bei 15000 rpm abzentrifugiert
- der Überstand wird in zwei 2 ml-Reaktionsgefäße überführt und mit je 1 ml TRIzol Reagent (Invitrogen) versetzt, gevortext und 5 min bei RT inkubiert
- anschließend werden 200 µl Chlorophorm hinzugefügt, der Ansatz gevortext und 3 min bei RT inkubiert
- die Proben werden zentrifugiert (15000 rpm, 4°C, 10 min)
- die obere Phase wird in ein frisches 2 ml-Reaktionsgefäß überführt und die TRIzol Reagent- und Chlorophorm-Behandlung wiederholt
- die obere Phase wird erneut in ein frisches Reaktionsgefäß überführt, 500 µl Isopropanol werden hinzugefügt und zentrifugiert (15000 rpm, 4°C, 15 min)
- das Pellet wird mit 1 ml 70 %igem EtOH mittels Zentrifugation gewaschen (15000 rpm, 4°C, 10 min) und getrocknet

- anschließend wird das Pellet in 100 ml RNase freiem H₂O resuspendiert und durch Wärmebehandlung (2 min, 50°C) gelöst
- die RNA-Lösung wird nun mit 350 µl RLT-Puffer und 250 µl EtOH vermischt und auf eine Säule (Qiagen) überführt
- im Anschluss daran erfolgt das Waschen mit 700 µl RWI-Puffer, die DNase-Behandlung, die Waschschritte mit dem PRE-Puffer und die Elution in 40 µl RNase-freiem H₂O, wie sie schon für die RNA-Isolierung aus in BHI gewachsenen Listerien im oberen Teil beschrieben wurden

4.1.14 DNase-Behandlung mit DNA-freeTM Kit von Ambion

Die DNase-Behandlung mit dem DNA-freeTM Kit von Ambion ist eine sehr schnelle und effiziente Methode zur Herstellung DNA-freier RNA. Die Durchführung erfolgte nach Anleitung des Herstellers.

Wird die RNA zur Herstellung von cDNA für die Real-time RT-PCR verwendet, ist diese zusätzliche DNase-Behandlung erforderlich, damit nicht noch vorhandene DNA in der Real-time RT-PCR amplifiziert wird und somit das Ergebnis verfälscht.

Nach der DNase-Behandlung sollte eine PCR (siehe 4.1.5) mit 1 µg RNA-Ansatz als Template durchgeführt werden, um zu überprüfen, ob die RNA frei von DNA ist. Erhält man kein PCR-Produkt, so kann davon ausgegangen werden, dass die DNA vollständig entfernt wurde.

4.1.15 Konzentrationsbestimmung von RNA

Die Konzentrationsbestimmung von RNA erfolgt, wie für die DNA (siehe 4.1.3), aber mit folgender Umrechnungsformel (Der Quotient OD_{260 nm}/OD_{280 nm} gibt wieder den Reinheitsgrad an und sollte bei 2.0 liegen.):

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

4.1.16 Reverse Transkription von RNA für die Real-time RT-PCR

Der Ausdruck cDNA steht für komplementäre DNA, d.h. der Ursprung der DNA liegt nicht in der DNA selbst, sondern in der RNA. Die Reverse Transkriptase ist *in vivo* ein Enzym mit drei verschiedenen enzymatischen Aktivitäten: RNA-abhängige DNA-Polymerase („Reverse Transkriptase“), Ribonuclease („RNaseH“; Abbau von RNA in RNA/DNA-Hybriden) und DNA-abhängige DNA-Polymerase. Die Kombination der drei Funktionen erlaubt z.B. Retroviren, wie Vogel-Leukämie-Virus, Maus-Leukämie-Virus oder HIV *in vivo* ihr RNA-Genom mit Hilfe der Virus-codierten reversen Transkriptase in einer eukaryotischen Zelle in dsDNA umzuschreiben.

In der molekularen Genetik ist die Reverse Transkriptase ein nützliches Werkzeug, denn jede beliebige RNA wird unter geeigneten Bedingungen als Matrize von der reversen Transkriptase akzeptiert. Auf diese Weise lassen sich DNA-Kopien von mRNA-Molekülen herstellen.

Die Reverse Transkriptase ist eine 5`-3`-RNA-abhängige DNA-Polymerase, welche einzelsträngige RNA als Matrize verwendet, um doppelsträngige DNA herzustellen. Alle Reversen Transkriptasen sind Mg²⁺-abhängig und verwenden Oligonukleotide, d.h. kurze

doppelsträngige Nukleinsäurebereiche mit einem freien 3'Hydroxyl-Ende, an dem die Synthese beginnen kann (unter natürlichen Bedingungen wird dieses Oligonukleotid durch eine tRNA gebildet).

Die M-MLV Reverse Transkriptase von Invitrogen ist ein Produkt des *pol*-Gens vom Maloney-Mäuse-Leukämie-Virus, deren RNaseH-Aktivität eliminiert wurde.

Reverse Transkription mit der SuperScript™ II (Invitrogen)

- 5 µg RNA werden in 15 µl DEPC-H₂O aufgenommen
- es werden 9 µg random Hexamer-Oligonukleotide (Invitrogen) für die Reverse Transkription eingesetzt
- der Ansatz wird für 5 min bei 70°C inkubiert, damit die Sekundärstruktur der RNA zerstört wird und die Oligonukleotide an die komplementäre mRNA-Sequenz binden können
- danach erfolgt eine Abkühlung des Ansatzes für 10 min auf Eis
- 20 µl des folgenden Mixes werden hinzu pipettiert:

5 x 1st Strand Buffer (Invitrogen)	8,0 µl
0,1 M DTT (Invitrogen)	0,4 µl
dATP (20 mM)	1,0 µl
dCTP (20 mM)	1,0 µl
dGTP (20 mM)	1,0 µl
dTTP (20 mM)	1,0 µl
Ribonuclease Inhibitor (RNase out; Invitrogen)	1,0 µl
Superscript TM II (Invitrogen)	1,0 µl
	ad 20 µl DEPC-H ₂ O _{dest.}

- der gesamte Ansatz wird gut gemischt und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert
- die cDNA-Synthese erfolgt bei 42°C für 2 h
- anschließend wird der Ansatz zur Zerstörung des Ribonuclease-Inhibitors für 15 min bei 70°C inkubiert
- kurze Zentrifugation des Ansatzes (14000 rpm; RT; 30 s)
- optional: 2 µl RNase (Roche, DNasefree) wird zu diesem Ansatz hinzugefügt und es erfolgt eine weitere Inkubation für 45 min bei 37°C
- die cDNA wird mit dem Qiagen PCR-Purification Kit gereinigt (siehe 4.1.2) und zum Schluss in 30 µl EB-Puffer (Qiagen) eluiert
- die fertige cDNA kann entweder sofort für die Real-time RT-PCR (siehe 4.1.17) eingesetzt oder bei -20°C eingefroren werden

4.1.17 Quantitative Real-time RT-PCR (RT-PCR)

Die PCR mit der durch reverse Transkription entstandenen cDNA ermöglicht eine semiquantitative Analyse der mRNA-Konzentration.

Die Real-time RT-PCR stellt die modernste Methode der Quantifizierung von Nukleinsäuren dar. Bei dieser empfindlichen Methode werden nicht absolute Mengen an PCR-Produkt gemessen, sondern die DNA-Amplifikation kann Zyklus für Zyklus verfolgt werden. Dies geschieht mit Hilfe von Fluoreszenzsignalen, die durch einen bestimmten Farbstoff entstehen, welcher zum Reaktionsansatz hinzugegeben wird. Dieser Fluoreszenzfarbstoff, Sybr® Green I, kann sich sequenzunspezifisch in die kleine Furche der DNA-Doppel-Helix einlagern und

dadurch Licht emittieren. Im ungebundenen Zustand besitzt Sybr[®]Green I eine relativ niedrige Fluoreszenz. Sybr[®]Green I bindet nicht an ssDNA.

Steigt also die DNA-Menge in der PCR-Reaktion an, so steigt auch proportional die Fluoreszenz des Farbstoffes. Die Fluoreszenz der Probe kann mit Hilfe eines LightCyclers[®] (BIO-RAD) nach jedem Zyklus quantifiziert werden. Die gemessene Stärke des Fluoreszenzsignals wird gegen die Zyklenzahlen per Computer in einem Diagramm dargestellt. Durch die Mitführung von Standardwerten mit bekannten DNA-Konzentrationen können die im Reaktionsansatz enthaltenden DNA-Mengen zu jedem Zeitpunkt quantifiziert (ng) werden. Die quantitative Information in einer RT-PCR-Reaktion liefern nur wenige Zyklen, in denen die DNA-Menge logarithmisch ansteigt.

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 die Spezifität der PCR-Reaktion überprüfen zu können, werden im Anschluss an die Bildung der PCR-Produkte Schmelzkurven gebildet. Unspezifische Produkte schmelzen meist bei niedrigeren Temperaturen als die längeren spezifischen Produkte. Aufgrund des Schmelzverhaltens von DNA nimmt die Fluoreszenz mit steigender Temperatur ab. Die maximale Fluoreszenzänderung pro Temperaturerhöhung ergibt ein Maximum in der Schmelzkurve, welches charakteristisch für jedes PCR-Produkt ist.

Bei der Wahl der Oligonukleotide für die Real-time RT-PCR sollten folgende Kriterien beachtet werden:

- die Wahl der Oligonukleotide sollte in der Mitte des Gens erfolgen, um trotz eines möglichen Abbaus der weniger stabilen mRNA, ein Produkt bei der cDNA-Synthese und somit auch in der Real-Time RT-PCR zu erhalten
- das resultierende PCR-Fragment sollte 130 – 150 bp lang sein
- GC-Gehalt 40 – 50 %
- ideale Oligonukleotidlänge 20 – 25 bp
- palindromische Sequenzen vermeiden
- Homologie der Oligonukleotide zueinander vermeiden
- höchstens zwei GCs in den letzten fünf Basen am 3'-OH-Ende

Die RT-PCR-Oligonukleotide sind in im Material-Abschnitt 3.7 aufgeführt.

Bevor die RNA mittels Real-time RT-PCR untersucht wird, sollte mittels PCR-Überprüfung gewährleistet sein, dass sich keine DNA im Ansatz befindet (siehe 4.1.14).

Standardreaktions-RT-PCR-Ansatz:

Der Absolute[™] QPCR SYBR Green Mix (ABgene) enthält bereits den Reaktionspuffer, eine Thermo Start DNA Polymerase (Aktivierung des Enzyms bei 95°C für 15 min), dNTPs und MgCl₂.

Absolute [™] QPCR SYBR Green Mix	25 µl
Oligonukleotid I	100 nM
Oligonukleotid II	100 nM
cDNA (1:50 verdünnt)	4 µl
	ad 50 µl H ₂ O _{dest.}

Standard-RT-PCR-Bedingungen:

95°C 15 min Aktivierung der Polymerase

40 Zyklen:

95°C 15 s Denaturierung

60°C 1 min Annealing und Elongation

4.2 Arbeiten mit Bakterien

4.2.1 Untersuchung des Wachstumsverhaltens von *Listeria monocytogenes*

- eine bei 37°C bzw. 42°C gewachsene Listerien-ÜN-Kultur wird 1:10 verdünnt und in einem Kolben bei 37°C im Schüttler (190 rpm) inkubiert
- in regelmäßigen Abständen wird die optische Dichte der Listeriensuspension im Klett-Photometer bzw. im Photometer bei 600 nm gemessen und notiert
- man lässt die Listerien bis zur stationären Phase wachsen und kann dann anhand der gemessenen Werte eine Wachstumskurve erstellen
- alternativ kann in den verschiedenen Wachstumsphasen (frühe- und spät-logarithmische Wachstumsphase) die Bakterienkultur abzentrifugiert werden (6000 rpm; 4°C;15 min) und das Pellet für die spätere Isolierung von RNA und zytoplasmatischen Proteinen (siehe 4.1.13 und 4.3.2) bei -80°C gelagert werden

4.2.2 Anzucht von Listerien in XAD-4-haltigem Medium

- die gewünschte Menge an Amberlite © XAD-4 (Sigma) wird in einem Kolben in H₂Odest. autoklaviert
- anschließend wird das Wasser unter der Sterilbank mittels Vakuumpumpe abgesaugt
- steriles Medium wird hinzugefügt, so dass eine 5 %ige XAD-4-Lösung (w/v) entsteht
- das XAD-haltige Medium wird dann mit Listerien einer ÜN-Kultur angeimpft und bei 37°C im Schüttler (190 rpm) inkubiert
- in regelmäßigen Abständen wird die optische Dichte der Listeriensuspension im Klett-Photometer bzw. im Photometer bei 600 nm gemessen und notiert
- alternativ kann bei einer gewünschten optischen Dichte die Bakterienkultur mittels eines sterilen Filters (Rössner) von den XAD Kügelchen abgetrennt werden und bei 6000 rpm (4°C;15 min) pelletiert werden; das Pellet kann für die spätere Isolierung von RNA und zytoplasmatischen Proteinen (siehe 4.1.13 und 4.3.2) bei -80°C gelagert werden

4.2.3 Überführungs-Experiment mit *Listeria monocytogenes*

- die verschiedenen *Listeria*-Stämme wurden zuerst in einem Medium bis zu der gewünschten optischen Dichte OD_{600nm} von 0.5 - 1.0 herangezogen
- nach der Zentrifugation (5000 rpm, 3 min, 4°C) wird das Pellet zweimal mit 1x PBS bzw. mit dem Medium, in das überführt wird, gewaschen
- das Pellet wird dann in dem gleichen Volumen neuem Medium resuspendiert
- in regelmäßigen Abständen wird die optische Dichte der Listeriensuspension im Klett-Photometer bzw. im Photometer bei 600 nm gemessen und notiert

4.2.4 Messung der [¹⁴C]-Glukose-Aufnahme in *Listeria monocytogenes*

<u>Transportpuffer:</u>	Tris-HCl, pH 7,2	50 mM
	MgCl ₂	20 mM

- zur Messung der Glukose-Aufnahme wurde der entsprechende Stamm in LB-Medium mit 50 mM Glukose bis zu der OD_{600nm} von 0.4 und 1.0 herangezogen (120 ml Ansatz).
- 40 ml Kultur werden durch Zentrifugation (5000 rpm, 3 min, 4 °C) pelletiert
- das Bakterienpellet wird dreimal mit 10 ml eiskaltem Transportpuffer gewaschen
- danach wird das Pellet in 2 ml Transportpuffer resuspendiert und in 850 µl Aliquots portioniert, auf Eis gehalten und für die Aufnahmemessung verwendet
- vor der Glukosezugabe werden 50 µl aus dem Aliquot auf einem Filter pipettiert, ohne Filtration und Waschen mit 3 ml Scintilationsflüssigkeit versetzt und im Scintilationszähler gemessen (Beckmann) (= Nullwert)
- zur Aufnahmemessung wird der Ansatz mit 2 mM Glukose und 2 µCi/ml mit einem Gemisch aus [¹⁴C]-Glukose (GE Healthcare) und [¹²C]-Glukose versetzt und bei 37°C im Heizblock inkubiert
- zu den folgenden Zeiten: 15 s, 30 s, 60 s, 90 s, 120 s und 180 s werden 50 µl Probe entnommen und durch einen Nitrozellulosefilter mit einer Porengröße von 0,45 µm (Sanatorius) gesaugt [Gerät:1225 Sampling Mannifold (Millipore)]
- der Filter wird dreimal mit 3 ml kalter Saline (0,9 % NaCl) gewaschen
- anschließend wird der Filter bei 42 °C 45 - 60 min getrocknet
- der Filter wird mit 3 ml Scintilationsflüssigkeit versetzt und die Menge an Radioaktivität auf den Filtern im Scintilationszähler gemessen
- als Standard für die Gesamtmenge an eingesetzter Radioaktivität werden aus jedem Ansatz 50 µl Probe unfiltriert gemessen
- die LZZ (Lebendzellzahl) der Ansätze wird parallel bestimmt: dazu werden bei der OD_{600nm} von 0.4 und 1.0 Verdünnungsreihen erstellt und 100 µl der Verdünnungsstufe 10⁻⁷ ausplattiert
- mittels gemessener DPM (Disintegration / min) und Einberechnung der LZZ lässt sich die Anzahl der aufgenommenen Glukosemoleküle berechnen

4.3 Methoden zur Aufreinigung und Analyse von Proteinen

4.3.1 TCA-Fällung von Überstandsproteinen

<u>Harnstoffpuffer:</u>	Harnstoff	7 M
	Thioharnstoff	2 M
	DTT	70 mM

		ad 10 ml H ₂ O _{dest.}

CHAPS: wird in H₂O_{dest.} gelöst
(3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-Propansulfonat)

- eine ÜN-Kultur wird 1:10 in BHI verdünnt und im Schüttler bei 37°C inkubiert
- bei der optischen Dichte von OD_{600nm} 1.0 (spät-logarithmische Wachstumsphase) werden 20 ml der Listerienkultur in einem Greinerröhrchen zentrifugiert (6000 rpm; 4°C; 10 min)
- der Überstand wird abgenommen und mit 10 % TCA (Trichloressigsäure) versetzt
- das Gemisch wird für 1 h auf Eis inkubiert
- die mit TCA gefällten Proteine werden abzentrifugiert (6000 rpm; 4°C; 30 min)
- das Proteinpellet wird in 4 ml eiskaltem Aceton (-20°C) resuspendiert und zentrifugiert (14.000 rpm; 4°C; 5 min)
- das Pellet wird 2 x mit 0,9 ml Aceton gewaschen
- anschließend wird das Pellet bei 30°C im Heizblock getrocknet
- je nach Größe des Pellets werden Harnstoffpuffer und CHAPS im Verhältnis 1:10 hinzugefügt

4.3.2 Herstellung von bakteriellen Zellextrakten

- *Listeria monocytogenes*-Stämme werden in verschiedenen Medien im Schüttler bei 37°C inkubiert
- bei einer gewünschten optische Dichte OD_{600nm} werden 20 ml der Listerienkultur in einem Greinerröhrchen zentrifugiert (6000 rpm; 4°C; 10 min)
- der Überstand wird verworfen und das Pellet 2 x mit PBS gewaschen, um mögliche Medien-Reste zu entfernen
- anschließend wird das Pellet in kaltem Lysispuffer (1x PBS mit Protease-Inhibitor [Roche]) resuspendiert
- 0,8 ml der Probe wird in ein Lysing Matrix B Tube (Qbiogene) mit Silikatkügelchen überführt
- die Bakterienzellen werden im FastPrep FP120 (sechsmal; Geschwindigkeit 6,5; 30 s) lysiert; um ein starkes Erwärmen der Lösung zu vermeiden, wird das Cap zwischen den einzelnen Vorgängen kurze Zeit auf Eis inkubiert
- die Bakterientrümmen und Silikatkügelchen werden abzentrifugiert (14.000 rpm; 4°C; 1 h)
- der Überstand mit den gelösten Proteinen wird vorsichtig abgenommen, aliquotiert und bei -80°C bis zur weiteren Analyse eingefroren

4.3.3 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Stammlösung für den Bradford-Assay stammt von der Firma BioRad und setzt sich zusammen aus:

Coomassie brilliant blue G-250
Methanol
Phosphorsäure

Bei der Bindung des Coomassie Brilliant Blue Farbstoffes an Proteine im sauren Milieu verschiebt sich das Absorptionsmaximum von 465 nm auf 595 nm. Die Absorptionzunahme bei 595 nm ist hierbei ein Maß für die Proteinkonzentration der Lösung.

Zur Messung wird die Stammlsg. 1:4 mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ verdünnt. 800 μl Proteinprobe (verdünnt) werden mit 200 μl fertiger Bradfordlösung in einem Eppendorfgefäß gut gemischt (10 s vortexen) und 10 min bei RT stehen gelassen. Danach wird die Extinktion bei 595 nm gemessen.

Zum Eichen dieser Messung wurde eine Vergleichsmessung mit bekannten BSA-Konzentrationen durchgeführt. Die Proteinkonzentration kann dann anhand der mit BSA erstellten Eichgerade ermittelt werden.

4.3.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Bei der SDS-PAGE handelt es sich um eine Methode, mit der Proteine entsprechend ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden.

Die Proteinauftrennung mittels SDS-PAGE findet unter denaturierenden Bedingungen in Gegenwart von Natriumdodecylsulfat (SDS) und Mercaptoethanol statt. Durch die Bindung von SDS an die hydrophobe Region des Proteinmoleküls bildet sich ein SDS-Protein-Komplex, dessen negative Ladungsenergie etwa proportional zum Molekulargewicht des Proteins ist. Der Überschuss an negativen Ladungen ermöglicht die Gelelektrophorese. Mercaptoethanol ist eine reduzierende Substanz, die alle Disulfid-Brücken-Bindungen im Protein löst. Auf diese Weise werden Proteine, unabhängig von ihrer ursprünglichen Ladung und Konformation, der Größe nach im Spannungsfeld von der Kathode zur Anode hin aufgetrennt.

<u>30 % Acrylamid-Lösung:</u>	Acrylamid-Lösung	292 g/l
	Bisacrylamid	8 g/l
<u>1,5 M Tris-HCl (pH 8,8):</u>	Tris Base	181,5 g/l
	konz. HCl	bis pH 8,8
<u>1 M Tris-HCl (pH 6,8):</u>	Tris Base	121 g/l
	konz. HCl	bis pH 6,8
<u>10 % SDS (w/v):</u>	10 g SDS auf 100 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$	
<u>10 % Ammoniumpersulfat (w/v) :</u>	10 g Ammoniumpersulfat auf 100 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$	
<u>4 x Laemmli-Puffer:</u>	Glycerin	20 ml
	10 % SDS	15 ml
	2 M Tris pH 6,8	10 ml
	β -Mercaptoethanol	3,75 ml
	Bromphenolblau	50 mg
		<hr/>
		ad 50 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$

<u>PAGE-Puffer:</u>	Tris Base	3 g/l
	Glycin	14,4 g/l
	SDS	1 g/l

Zusammensetzung eines 12 %igen SDS-Polyacrylamidgels:

Reagenzien	Trenngel 12 %	Trenngel 15 %	Sammelgel 5 %
30 % Acrylamid Mix	8,0 ml	10,0 ml	1,0 ml
1,5 M Tris (pH 8,8)	5,0 ml	5,0 ml	-----
1 M Tris (pH 6,8)	-----	-----	750 µl
10 % SDS	200 µl	200 µl	60 µl
10 % Ammonium Persulfat	200 µl	200 µl	60 µl
TEMED	8,0 µl	8,0 µl	6,0 µl
	ad 20 ml H ₂ O _{dest.}	ad 20 ml H ₂ O _{dest.}	ad 6 ml H ₂ O _{dest.}

Zur Denaturierung werden die Proteinproben in 1x Laemmli-Puffer bei 95°C 5 min aufgeköcht. Die Elektrophorese erfolgt bei 25 mA (pro Gel) und 150 V und wird beendet, sobald die Bromphenolblaufront aus dem Gel herausgelaufen ist.

Anschließend erfolgt entweder die Färbung des Trenngels mit Coomassie oder eine Immunfärbung (siehe 4.3.7 und 4.3.8).

4.3.5 Native Polyacrylamidgelelektrophorese (native-PAGE)

Bei der Gelelektrophorese unter nativen Bedingungen geht es darum, die physiologischen Eigenschaften der aufzutrennenden Proteine zu erhalten. Es lassen sich somit z. B. phosphorylierte und nicht phosphorylierte Varianten desselben Proteins auftrennen. Desweiteren können biologisch relevante Konformationen (Monomere, Dimere etc.) eines Proteins oder auch Komplexbildung verschiedener Proteine nachgewiesen werden.

Im Gegensatz zur SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese, bei der Proteine nur anhand ihrer Größe aufgetrennt werden, erfolgt bei der nativen Gelelektrophorese eine Trennung nach bestehender Ladung, Größe und Form des Proteins. Deshalb eignet sich die native-PAGE allerdings nicht zur Bestimmung der molekularen Masse eines Proteins, da die Wanderungsgeschwindigkeit des nativen Proteins auch u.a. von seiner Konformation abhängt.

Die Wahl des Puffersystems hängt vom isoelektrischen Punkt des Proteins ab. Ein Protein mit einem pI-Wert von 6,0 ist in einem Puffer mit pH 7 schwach negativ geladen und wandert daher im elektrischen Feld langsamer zur Anode als ein anderes Protein von pI 5,2. Stark basische Proteine (mit pI-Wert über 8) können in neutralen Puffern aufgetrennt werden, indem man Anode und Kathode vertauscht. Ebenso wandert die phosphorylierte Variante desselben Proteins aufgrund seiner zusätzlichen Ladung schneller zur Anode.

Da bei der Gelelektrophorese Wärme entsteht und dies zu einer Denaturierung des Proteins führen kann, wurde im Kühlraum bei 4°C gearbeitet. Die verwendeten Lösungen und Puffer entsprechen bis auf den SDS- und Mercaptoethanol-Zusatz dem SDS-Gelelektrophorese Protokoll (siehe 4.3.4). Die Proben werden jedoch vor dem Auftragen nicht bei 95°C erhitzt. Die native Polyacrylamid-Gelelektrophorese erfolgt nur mit einem Trenngel, bei dem das SDS durch H₂O_{dest.} ersetzt wird (kein Sammelgel). Eine Detektion der Proteine im Anschluß an die Gelelektrophorese wird entweder mittels Coomassie- oder Immunfärbung durchgeführt (siehe 4.3.7 und 4.3.8).

4.3.6 Bestimmung der HPr-Phosphorylierungs-Zustände in *Listeria monocytogenes* (Halbedel & Stülke, 2005, Huynh *et al.*, 2000)

Das hitzestabile HPr liegt im Zytoplasma von *Listeria monocytogenes* in verschiedenen Phosphorylierungs-Zuständen vor: unphosphoryliertes HPr, HPr-Ser46~P und HPr-His15~P. Diese verschiedenen Zustände besitzen die Eigenschaft, in nativen Polyacrylamidgelen aufgrund ihrer Ladung und Konformation unterschiedlich schnell zu laufen. Die His-Phosphorylierung ist eine sehr instabile Phosphorylierung und kann durch Hitze- oder Säurebehandlung zerstört werden.

Isolierung zytoplasmatischer Proteine

- die verschiedenen *Listeria*-Stämme werden im gewünschten Medium bei 37° im Schüttler herangezogen
- zu den verschiedenen Wachstumsphasen werden 25 ml Bakteriensuspension mittels Zentrifugation pelletiert (6000 rpm; 4°C; 10 min)
- der Überstand wird verworfen und das Pellet zweimal mit PBS gewaschen
- anschließend wird das Pellet in kaltem Lysispuffer (50 mM Tris-HCl pH 7,5 und 50 mM EDTA pH 8,0 mit Protease-Inhibitor [Roche]) resuspendiert
- 0,8 ml der Probe wird in ein Lysing Matrix B Tube (Qbiogene) mit Silikatkügelchen überführt
- die Bakterienzellen werden im FastPrep FP120 (sechsmal; Geschwindigkeit 6,5; 30 s) lysiert; um ein starkes Erwärmen der Lösung zu vermeiden, wird das Reaktionsgefäß zwischen den einzelnen Vorgängen kurze Zeit auf Eis inkubiert
- die Bakterientrümmen und Silikatkügelchen werden abzentrifugiert (14000 rpm; 4°C; 1 h)
- der Überstand mit den gelösten Proteinen wird vorsichtig abgenommen, aliquotiert und bei -80°C bis zur weiteren Analyse eingefroren
- die Proteinkonzentration wird mittels Bradford bestimmt (siehe 4.3.3)

Aufarbeitung der Proben und nativer Gellauf

- die Proben werden mit nativem 1x Laemmli-Puffer versetzt
- ein Teil des Ansatzes wird ohne Erwärmung auf ein 15 %iges natives Polyacrylamidgel (ohne Sammelgel) aufgetragen
- die andere Hälfte wird vor dem Auftragen für 10 min bei 70°C hitzebehandelt (Zerstörung der HPr-His15-Phosphorylierung)
- die Elektrophorese erfolgt bei 200 V im Kühlraum für ca. 6 h
- im Anschluß daran erfolgt entweder eine Färbung mit Coomassie- oder eine Immunfärbung mit dem Antikörper anti-HPr (siehe 4.3.7 und 4.3.8)

4.3.7 Coomassiefärbung von Polyacrylamidgelen

Die Coomassiefärbung ist dazu geeignet, Proteinbanden mit einer Masse ab 0,1 - 0,2 µg nachzuweisen. Coomassie Brilliant Blue R-250 ist gut wasserlöslich und bindet unspezifisch an nahezu alle Proteine.

<u>Coomassie-Färbelösung:</u>	EtOH	500 ml
	Essigsäure	100 ml
	Coomassie R-250	2,5 g
		ad 1 l H ₂ O _{dest.}

Das Gel wird 15 - 30 min in der Coomassie-Färbelösung geschwenkt und anschließend in 10 % Essigsäure so lange entfärbt, bis sich die blau gefärbten Proteinbanden deutlich vom Hintergrund abheben.

4.3.8 Proteinanalyse im Western Blot

Der Western Blot ist eine Methode, bei der gelelektrophoretisch aufgetrennte Proteine (siehe 4.3.4 und 4.3.5) aus einem Trenngel auf einen geeigneten Trägerfilter z. B. Nitrozellulose übertragen werden (Blotting). Es wird eine Kopie des Gels erzeugt, wobei die Proteine auf dem Filter immobilisiert und dann mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen werden können. Dabei wird der Antikörper-Antigen-Komplex durch Zugabe eines sekundären Antikörpers sichtbar gemacht. Der sekundäre Antikörper ist mit einem Enzym, meistens einer Peroxidase konjugiert. Dieses Enzym regt ein Substrat (luminogenes Substrat) zur Lichtemission an. Die Umsetzung des Substrats durch die Peroxidase führt an der Stelle des gebundenen Antikörpers zu einer Lichtemission, die mit Hilfe eines aufgelegten Röntgenfilms oder speziellen Scannern detektiert werden kann.

Bei einer PAGE, dessen Gel für eine Proteinanalyse im Western Blot verwendet wird, wird der Prestained Precision Plus ProteinTM Standards Marker (BioRad) verwendet.

Transfer von Proteinen auf eine Nitrozellulosemembran (Blotten)

<u>Blotpuffer:</u>	Tris	5,8 g/l
	Glycin	2,9 g/l
	SDS	0,37 g/l
	Ethanol	20 % (v/v)

Der Transfer der Proteine auf die Nitrozellulose erfolgt nach der „Semidry Electroblothing“-Methode mit Hilfe einer Graphit-Blot-Kammer.

- die Graphitplatten der Blotkammer werden mit H₂O_{dest.} angefeuchtet
- auf die als Anode dienende Platte werden luftblasenfrei drei zuvor mit Blotpuffer getränkte Whatman-Papiere und eine, ebenfalls auf Gelgröße zugeschnittene, Nitrozellulosemembran gelegt
- das Trenngel wird passend auf der Nitrozellulose platziert

- auf das Gel werden drei weitere, in Blotpuffer getränkte Whatman-Papiere gelegt, die Kathodenplatte aufgesetzt und die Kammer an eine Spannungsquelle angeschlossen
- der Protein-Transfer erfolgt für etwa 2 h bei Raumtemperatur mit einer Stromstärke von $0,8 \text{ mA} / \text{cm}^2$ Gelfläche

Immunodetektion von Proteinen

<u>10 x PBS:</u>	NaCl	80,0 g/l
	KCl	2,0 g/l
	Na ₂ HPO ₄	11,5 g/l
	KH ₂ PO ₄	2,0 g/l

<u>Blockingpuffer:</u>	1 x PBS
	5 % Magermilch (w/v)

<u>Waschpuffer (T-PBS):</u>	1 x PBS
	0,05 % Tween 20 (v/v)

- die Membran wird nach dem Proteintransfer für 1 h im Blockingpuffer geschwenkt, was der Absättigung freier Proteinbindestellen dient, so dass unspezifische Bindungen der Antikörper an die Membran verhindert werden (störende Hintergrundsignale)
- anschließend erfolgt die Inkubation mit dem ersten Antikörper über Nacht bei 4°C (die Verdünnungen unterscheiden sich je nach Antikörper; Verdünnung erfolgt im Blockingpuffer)
- sorgfältiges Waschen der Membran mit T-PBS
- Inkubation der Membran mit dem Meerrettich-Peroxidase konjugierten Sekundärantikörper für 1 h bei RT
- sorgfältiges Waschen mit T-PBS
- die Membran wird mit ECLTM-Substrat (GE Healthcare) überschichtet
- das überschüssige Substrat wird entfernt und der Blot in einer Filmkassette fixiert
- die Exposition des Röntgenfilms (x-ray RETINA) erfolgt je nach Stärke des Signals zwischen wenigen Sekunden und einigen Minuten

Im Western Blot verwendete Primärantikörper:

Antigen	Klon	Verdünnung
CcpA	Kaninchen	1:3000
HPr	Kaninchen	1:3000
EIIA ^{Glc}	Kaninchen	1:3000
InlC	Kaninchen	1:1000
ActA	Kaninchen	1:1000
Hly	Kaninchen	1:1000
PrfA	Kaninchen	1:750

Als Sekundärantikörper, konjugiert mit der Meerrettich-Peroxidase, wird in dieser Arbeit ein Ziege- α -Kaninchen Antikörper (Dianova) mit einer Verdünnung von 1:10000 (in Blockingpuffer) verwendet.

4.3.9 Spektralphotometrischer Hämolyse-Assay

Die Menge des aus den lysierten Erythrozyten freigesetzten Hämoglobins wird im Spektralphotometer bei 543 nm photometrisch gemessen und dient als Maß für die hämolytische Aktivität des Hämolysins bzw. Listeriolysins LLO (codiert vom *hly*-Gen).

Vorbereitung der Pferdeerythrozyten

- zwei 2 ml-Eppendorfgeläße werden jeweils mit 1 ml Pferdeblut gefüllt und kurz zentrifugiert (2500 rpm; RT; 5 min)
- der Überstand wird verworfen
- das Erythrozytenpellet wird anschließend so oft mit 1 ml 0,9 %iger NaCl-Lösung gewaschen, bis der Überstand farblos ist
- danach werden die Erythrozyten aus den beiden 2 ml-Eppendorfgeläßen in insgesamt 50 ml 0,9 %iger NaCl-Lösung resuspendiert
- die Erythrozytensuspension wird bei 4°C oder auf Eis aufbewahrt (max. einen Tag)

Durchführung des Hämolysetests

- bei der gewünschten optischen Dichte werden 1 ml Listerienkultur zentrifugiert (5000 rpm; RT; 5 min)
- je nach PrfA-Aktivität werden 25 µl, 50 µl oder 100 µl des Kulturüberstandes in ein neues Eppendorfgeläße pipettiert, dann wird jeweils 1 ml der Erythrozytensuspension hinzugefügt
- der Ansatz inkubiert für 30 min bei 37°C
- danach wird die Probe bei 2500 rpm (RT) 5 min in der Tischzentrifuge pelletiert (für den Nullwert wird 1 ml Erythrozytensuspension zentrifugiert)
- die Extinktion des Überstands wird dann im Spektralphotometer bei 543 nm gemessen

4.4 Microarray-Assay

Mit Hilfe der Microarray-Technik wird die parallele Analyse sowie der Vergleich des Expressionsprofils einer Vielzahl von Genen ermöglicht. Die hohe Effizienz steigert die Geschwindigkeit in der molekularbiologischen Forschung. Die Microarray-Technik basiert auf der Hybridisierung von Nukleinsäuren. Eine komplementäre Sequenz führt zur Hybridisierung von zwei einzelsträngigen Nukleinsäuremolekülen, von denen eine auf einer Matrix fest gebunden vorliegt.

Es existieren zwei Chip-Varianten: cDNA-Microarrays und Oligonukleotid-Microarrays. In beiden Fällen dient DNA als Sonde, die an definierten Positionen eines Rasters auf den Chip aufgebracht werden.

- **cDNA-Microarrays:** lange DNA Moleküle (100 Nukleotide) werden auf einer festen Oberfläche (Membranen, Glas oder Silikon-Chip) fixiert; die DNA wird mit Hilfe der PCR amplifiziert
- **Oligonukleotid Microarrays:** kurze DNA-Fragmente (25 Nukleotide) mit bekannter Sequenz werden an der Oberfläche des Chips synthetisiert

In dieser Arbeit wurden Oligonukleotid-Microarrays verwendet. Die Oligonukleotide wurden entsprechend der Herstellerangaben auf Epoxy-beschichteten Glas-Objekträgern (Quantifoil) gespottet (T. Chakraborty Institut für Medizinische Mikrobiologie, Gießen; M. Frosch, Institut für Hygiene und Mikrobiologie, Würzburg). Die Firma Operon hat die 70 Nukleotid langen Oligomere aller in *L. monocytogenes* vorliegenden ORFs (ca. 3000) entworfen und synthetisiert.

Zunächst wird RNA aus dem zu untersuchenden Objekt extrahiert und mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben. Dabei werden fluoreszenzmarkierte Nukleotide (dCTP) eingebaut. Die markierte cDNA wird dann mit den DNA-Microarrays hybridisiert. Hierbei binden markierte cDNA Stücke an ihren komplementären Gegenpart auf dem Array. Nach Abwaschung der nicht gebundenen cDNA-Stücke wird das Fluoreszenzsignal jeder Position des DNA-Microarrays mittels eines Lasers detektiert.

4.4.1 Herstellung der Sonden

- Isolierung bakterieller RNA (siehe 4.1.13)
- es werden 30-40 µg RNA pro Stamm in einem Volumen von 15 µl benötigt.

gesamte RNA	30-40 µg
random Oligonukleotide (3 µg/µl; Invitrogen)	3 µl
	<hr/> ad 18 µl DEPC-H ₂ O

- der Ansatz wird 5 min bei 70°C inkubiert, damit die Sekundärstruktur der RNA zerstört wird und die Oligonukleotide an die komplementäre mRNA-Sequenz binden können
- danach erfolgt eine Abkühlung des Ansatzes für 10 min auf Eis
- der folgende Mix wird hinzu pipettiert:

5 x 1st Strand Buffer (Invitrogen)	8 µl
0,1 M DTT (Invitrogen)	0,4 µl
dATP (20 mM)	1 µl
dGTP (20 mM)	1 µl
dTTP (20 mM)	1 µl
dCTP (10 mM)	1 µl
Ribonuclease Inhibitor (RNase out TM; Invitrogen)	1 µl
Superscript TM II (Invitrogen)	1 µl
	<hr/> ad 20 µl DEPC-H ₂ O

- 20 µl des Mastermix und 2 µl fluoreszenzmarkierte dCTPs (Cyto dye 3 und Cyto dye 5; GE Healthcare) werden hinzugefügt und der Ansatz wird 10 min bei RT inkubiert (ab hier wird im Dunkeln gearbeitet)
- die cDNA-Synthese erfolgt bei 42°C für 2 h
- zur Zerstörung des Ribonuclease-Inhibitors erfolgt eine Inkubation des Ansatzes für 15 min bei 70°C
- der Ansatz wird kurz zentrifugiert und es werden 2 µl RNase (Roche, DNase free) hinzugefügt (Zerstörung der RNA)

- nach einer Inkubation von 45 min bei 37°C wird die markierte cDNA mit dem PCR-Purification Kit (Qiagen) aufgereinigt (siehe 4.1.2), und in 30 µl EB-Puffer eluiert
- die mittels Microarray zu vergleichenden Ansätze werden vereint und in der Speedvac bei 45°C auf ein Gesamtvolumen von 30 µl reduziert
- die cDNA wird entweder direkt für Microarray-Experimente verwendet oder bei -20°C eingefroren

4.4.2 Hybridisierung

Waschen und Blocken des Microarray-Slides

Rinsing Solution 1: 0,1 % Triton-X100 in H₂O_{dest.}

Rinsing Solution 2: $\frac{100 \mu\text{l } 37 \% \text{ige HCl}}{\text{ad } 1 \text{ l H}_2\text{O}_{\text{dest.}}}$

Rinsing Solution 3: 100 mM KCl in H₂O_{dest.}

<u>QMT Blocking Solution:</u>	Ethanolamin	50 mM
(pH-Wert: 9,0)	SDS	0,1 % (w/v)
	Tris	0,1 M

- der Slide wird 5 min in Rinsing Solution 1 bei RT gewaschen
- danach erfolgt ein Waschschrift für 2 x 2 min in Rinsing Solution 2
- der Slide wird 10 min in Rinsing Solution 3 bei RT gewaschen
- Slide wird 1 min in H₂O_{dest.} gewaschen
- es folgt eine Inkubation des Slides im QMT Blocking-Puffer für 15 min bei 60°C
- danach erfolgt noch ein Waschschrift für 1 min in H₂O_{dest.}
- der Slide wird durch Zentrifugation (16000 rpm; RT; 3 min) getrocknet

Vorbereitung der Sonde und Hybridisierung

<u>20 x SSC:</u> (pH 7,0)	NaCl	3,0 M
	NaCitrat	0,3 M

- die 30 µl Cy3-/Cy5-markierte cDNA wird mit 6,0 µl 20x SSC und 5 µl 1 % SDS versetzt und 1 min bei 94°C inkubiert
- der Microarray-Slide wird in den Slide-holder gelegt
- der Ansatz wird auf den Microarray-Slides aufgetragen und luftblasenfrei mit einem Deckglas abgedeckt
- in die Löcher des Slide-holders werden je 10 µl H₂O_{dest.} pipettiert; der Slide wird so vor dem Austrocknen geschützt
- der Slide-holder wird in Alufolie eingewickelt und mit der Oberseite nach oben für mehr als 12 h in einem 64°C warmen Wasserbad inkubiert

<u>10 x Ca²⁺ / Mg²⁺:</u>	MgCl ₂	1,0 g
	CaCl ₂	1,0 g
		ad 1 l H ₂ O _{dest.}
<u>1 x PBS + Ca²⁺ / Mg²⁺:</u> (nicht autoklavieren)	MgCl ₂	100 ml
	CaCl ₂	100 ml
		ad 1 l H ₂ O _{dest.}

4.5.1 Auftauen und Einfrieren von J744 Makrophagen

Die Lagerung von eukaryotischen Zellen über längere Zeit erfolgt in flüssigem Stickstoff bei -196°C. Dies schützt die Zellen vor Kontaminationen und bewahrt sie vor Variabilität durch Subkultivierung. Um eine schädigende Kristallbildung innerhalb und außerhalb der Zelle sowie eine partielle Dehydrierung des Zytoplasmas zu vermeiden, wird ein Gefrierschutzmittel, hier 12 % DMSO (Dimethylsulfoxid), hinzugefügt.

Einfrieren von J744 Makrophagen

- die Makrophagen werden zunächst vom Flaschenboden in 9 ml RPMI-Medium mit FKS durch mechanisches Abkratzen abgelöst
- die Zellsuspension wird langsam auf Eis abgekühlt
- zur Zellsuspension werden 1,2 ml DMSO hinzugefügt
- dann werden 1 ml Aliquots in Kryoröhrchen hergestellt
- diese werden nach langsamer Abkühlung bei -80°C in einem geschlossenen Styroporbehälter in flüssigen Stickstoff überführt

Auftauen von J744 Makrophagen

Die Zellen werden bei 37°C im Wasserbad aufgetaut und sofort in eine Zellkulturflasche mit vorgewärmtem Medium überführt. Am nächsten Tag, wenn sich die Zellen abgesetzt haben, wird das DMSO-haltige Medium abgesaugt und frisches Medium hinzugefügt. Erst nach dem Erreichen der Konfluenz (Monolayer) werden die Zellen das erste Mal passagiert.

4.5.2 Subkultivierung von J744 Makrophagen

J744 Makrophagen bilden nach ca. 3 - 4 Tagen einen Monolayer und müssen dann auf neue Zellkulturflaschen gesplittet werden.

- nach dem Absaugen des Mediums werden die Zellen zweimal mit 1x PBS bzw. serumfreiem RPMI-Medium gewaschen
- das Ablösen der adhärenen Zellen vom Untergrund der Zellkulturflasche erfolgt durch mechanisches Abkratzen der Zellen
- die Zellen werden in frischem Medium resuspendiert
- die erhaltene Zellsuspension wird um den Faktor 2 - 8 mit RPMI-Medium in einer neuen Zellkulturflasche verdünnt
- es erfolgt eine Inkubation der Zellkulturflaschen im Brutschrank bei 37°C

4.5.3 Bestimmung der Lebendzellzahl (LZZ)

Der Farbstoff Trypanblau dient der Differenzierung von lebenden und toten Zellen. Bei toten Zellen dringt der Farbstoff schnell ein und verursacht eine Blaufärbung. Lebende Zellen dagegen nehmen den Farbstoff nur sehr langsam auf und werden im Mikroskop als hell leuchtende Zellen sichtbar. Die Bestimmung der Lebendzellzahl erfolgt in der Fuchs-Rosenthal-Zählkammer.

- Die Zellsuspension wird 1:1 mit Trypanblau angefärbt und in der Zählkammer ausgezählt
- Es werden 4 Großquadrate mit je 16 Kleinquadraten ausgezählt und das arithmetische Mittel bestimmt
- Die Lebendzellzahl wird wie folgt berechnet (Kammerfaktor der Fuchs-Rosenthal-Zählkammer ist 5000)

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

4.5.4 Herstellung von Infektionsaliquots

- eine ÜN-Kultur des jeweiligen Bakterienstamms wird 1:30 verdünnt
- der Stamm wird bei 37°C bis zu der optischen Dichte von OD_{600nm} 1.0 herangezogen
- 20 ml Bakteriensuspension werden durch Zentrifugation (5000 rpm; 10 min und 4°C) pelletiert
- das Pellet wird zweimal mit 1x PBS gewaschen
- das Zellpellet wird dann in 20 ml 1x PBS/20% Glycerin resuspendiert, in 1 ml-Portionen aliquotiert und bei -80°C eingefroren
- zur Bestimmung der Bakterienzellzahl werden von jeweils zwei Aliquots eines Bakterienstammes Verdünnungsreihen hergestellt
- je 100 µl der Verdünnungsstufen 10⁻⁶ und 10⁻⁷ werden auf BHI Platten ausplattiert und inkubiert
- die Bakterienzahl / ml (gezählte Kolonienzahl x Verdünnungsstufe x 10) wird nach dem Zählen der Kolonien bestimmt
- am Tag der Infektion wird anhand der Bakterienzahl / ml das Infektionsmedium mit FKS-freiem RPMI-Medium auf eine MOI 1 bezogen auf die am Infektionstag ermittelte Zellzahl pro Napf eingestellt

4.5.5 Infektion mit *Listeria monocytogenes*

In den Infektionsversuchen werden verschiedene Listerien-Stämme mit einer MOI 1 („multiplicity of infection“; Verhältnis der Bakterien zur ausgesäten Zellzahl) in serumfreien RPMI-Medium auf einen semikonfluenten Zellrasen gegeben. Bei der verwendeten Zelllinie handelt es sich um professionell phagozytierende J744 Makrophagen, die gemäß ihrer natürlichen Funktion eine erhöhte Anzahl von Bakterien aufnehmen. Diese Eigenschaft sollte bei der Wahl der MOI beachtet werden.

Nach der Infektionszeit von 45 min wird Gentamycin zugegeben, wodurch alle extrazellulären Bakterien abgetötet werden und somit eine sekundäre Infektion vermieden wird. Zu den verschiedenen Zeitpunkten 0, 1, 3, 5 und 7 h werden die Zellen lysiert und die Lebendzellzahl der Bakterien durch Ausplattieren bestimmt. So kann eine Aussage über die

Invasivität und das intrazelluläre Wachstumsverhalten der verschiedenen Bakterienstämme getroffen werden.

Aussäen der J744

- für eine Infektion von J744 Makrophagen wird ca. 42 h vor Infektionsbeginn mit dem Aussäen der Zellen begonnen
- die Zellen werden durch mechanisches Abkratzen vom Boden der Zellkulturflasche gelöst und die Zellzahl in einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer bestimmt
- die Zellzahl wird dann auf 1×10^5 Zellen / ml eingestellt
- je 1 ml der Zellsuspension wird pro Well in einer 24-Napf-Kulturplatte ausgesät

Infektion der J744 Makrophagen

- um die MOI berechnen zu können, wird vor der Infektion die genaue Zellzahl pro Napf bestimmt; dazu werden zwei Näpfe mit 1 x PBS gewaschen, die Zellen durch Abkratzen in 1 ml RPMI-Medium gelöst und die Zellzahl in der Fuchs-Rosenthal-Zählkammer bestimmt
- die Zellen werden einmal mit 1 ml 1 x PBS + Ca^{2+} / Mg^{2+} gewaschen und mit 1 ml Infektionsmedium (siehe 4.5.4) infiziert, die Bakterienzellzahl wird durch Ausplattieren bestimmt.
- nach einer Infektionsdauer von 45 min im Zellkulturbrutschrank bei 37°C und 5 % CO_2 wird das Medium abgenommen
- die Zellen werden einmal mit 1 ml 1 x PBS + Ca^{2+} / Mg^{2+} gewaschen um einen Großteil extrazellulärer Bakterien zu entfernen (**Zeitpunkt t0**)
- zusätzlich werden die noch extrazellulär verbliebenen Bakterien durch die die Inkubation von Gentamycin-haltigem RPMI-Medium (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Gentamycin) für 1 h im Zellkulturschrank abgetötet
- nach dieser Inkubation wird der zweite Messwert (**Zeitpunkt t1**) genommen, nach längerem Resuspendieren wird das Lysat in ein Eppendorf-Gefäß überführt und auf Eis gelagert
- die restlichen Zellen werden ebenfalls mit 1 ml 1 x PBS / Ca^{2+} Mg^{2+} gewaschen und pro Napf wird 1 ml RPMI-Medium mit 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Gentamycin zugegeben, die Zellen werden bis zu den weiteren Messwerten (**Zeitpunkte t3, t5 und t7**) im Zellkulturbrutschrank bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert
- zu den verschiedenen Zeitpunkten (t0, t1, t3, t5 und t7) wird das Medium in den jeweiligen Ansätzen vorsichtig abgesaugt, die Zellen werden einmal mit 1 ml 1 x PBS + Ca^{2+} / Mg^{2+} gewaschen, durch die Zugabe von 1 ml eiskaltem, sterilem $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ und Ultraschallbehandlung (5 s) werden die Zellen lysiert
- von den gut gemischten Zelllysaten werden Verdünnungsreihen hergestellt und je 100 μl aus verschiedenen Verdünnungsstufen auf BHI Platten ausplattiert
- die BHI Platten werden inkubiert und die Bakterienzahl / ml (gezählte Kolonienzahl x Verdünnungsstufe x 10) wird nach dem Zählen der Kolonien bestimmt

5 Ergebnisse

5.1 Untersuchung der Katabolitrepression in *L. monocytogenes* in Hinblick auf die PrfA-Regulation

Die Insertionsmutanten *::ccpA*, *::hprK* und *::ptsH* aus *L. monocytogenes* EGD-e, die in den an der Katabolitrepression beteiligten Genen *ccpA* (kodierend für das CcpA), *hprK* (kodierend für die HPr-Kinase/Phosphorylase) und *ptsH* (kodierend für das HPr) eine pLSV101SM1-3 (pSM1-3) Insertion tragen, wurden in dieser Arbeit genauer untersucht. Die Herstellung der Insertionsmutanten *::ccpA*, *::hprK* und *::ptsH* erfolgte im Rahmen der Diplomarbeit.

Zur näheren Charakterisierung dieser Insertionsmutanten wurde ihr Wachstum in verschiedenen Medien durchgeführt und die Glukose-Aufnahme bestimmt. Mittels Transkriptom- und Western Blot-Analysen wurde ein möglicher Einfluss der Kohlenstoff-Katabolitrepression (KKR) auf die PrfA-Aktivität analysiert.

5.1.1 Überprüfung der pLSV101SM1-3 Vektorinsertion in Genen der Katabolitrepression (*ccpA*, *hprk* und *ptsH*)

Überprüfung der *ccpA*-, *hprK*- und *ptsH*-Insertionsmutanten mittels PCR

Die Mutanten *::ccpA*, *::hprK* und *::ptsH* wurden mittels PCR auf ihre korrekte pSM1-3 Insertion analysiert. Dazu wurden jeweils chromosomale Oligonukleotide mit Vektor-spezifischen Oligonukleotiden kombiniert. Bei einer korrekten Vektorinsertion in die Gene *ccpA*, *hprK* und *ptsH* erhält man Fragmente mit einer definierten Größe. In der folgenden Tab. 5.1 sind die zu erwartenden PCR-Produktgrößen mit den verschiedenen Oligonukleotidkombinationen dargestellt.

Insertionsmutante	Oligonukleotidpaar	PCR-Produkt [bp]
<i>::ccpA</i> -Mutante	ccpA-1 / pLSVEcoRI	415
	ccpA-2 / pLSVBamHI	384
<i>::hprK</i> -Mutante	hprK-1 / pLSVEcoRI	404
	hprK-2 / pLSVBamHI	408
<i>::ptsH</i> -Mutante	ptsH-1 / pLSVBamHI	527
	ptsH-2 / pLSVEcoRI	375

Tab. 5.1: Größe der PCR-Produkte mit den vorgegebenen Oligonukleotidpaaren

Mit DNA aus Schnelllysaten dieser Mutanten wurde mit den oben genannten Oligonukleotiden PCR durchgeführt (siehe Abb. 5.1). Um eine unspezifische Amplifikation mittels chromosomaler und Vektor-spezifischer Oligonukleotide auszuschließen, wurde zur Kontrolle DNA aus dem Zelllysate des Wildtyp-Stammes über PCR untersucht (Spur 3/4, 7/8 und 11/12).

Bei allen drei Mutanten konnte festgestellt werden, dass der Vektor an der gewünschten Stelle in das listerielle Genom integriert wurde. Die Größen der DNA-Fragmente, die über PCR mit den jeweiligen Oligonukleotidpaaren erhalten wurden, stimmen mit denen in Tab. 5.1 aufgeführten Werten überein. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die Oligonukleotide spezifisch binden, da mit dem wildtypischen Kontrolllysate und den in Tab. 5.1 aufgelisteten Oligonukleotidkombinationen kein PCR-Produkt erhalten wurde. Durch Southern Blot-Analysen konnte sichergestellt werden, dass pSM1-3 sequenzspezifisch in das jeweilige gewünschte Gen und auch jeweils nur einmal in das listerielle Genom inseriert wurden (Daten nicht gezeigt).

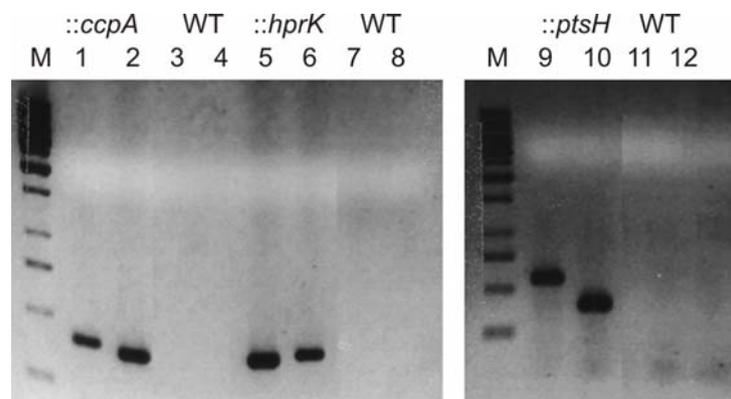


Abb. 5.1: PCR mit Schnelllysaten der Insertionsmutanten *::ccpA*, *::hprK* und *::ptsH* und des Wildtyps (WT). Es wurden folgende Oligonukleotidpaare verwendet: **1** = *ccpA1* – pLSVEcoRI, **2** = *ccpA2* – pLSVBamHI, **3** = *ccpA1* – pLSVEcoRI, **4** = *ccpA2* – pLSVBamHI, **5** = *hprK1* – pLSVEcoRI, **6** = *hprK2* – pLSVBamHI, **7** = *hprK1* – pLSVEcoRI, **8** = *hprK2* – pLSVBamHI, **9** = *ptsH1* – pLSVBamHI, **10** = *ptsH8* – pLSVEcoRI, **11** = *ptsH1* – pLSVBamHI, **12** = *ptsH8* – pLSVEcoRI, **M** = Marker

Polarer Effekt der pSM1-3 Vektorinsertion auf die benachbarten Gene

Die drei Gene (*ccpA*, *hprK* und *ptsH*), kodierend für die Komponenten der Katabolitrepresseion CcpA, HPrK/P und HPr, befinden sich laut ListiList (<http://genolist.pasteur.fr/ListiList>) jeweils in einer Operonstruktur (siehe Abb. 5.2).

Wie in Abb. 5.2 schematisch dargestellt, liegt stromabwärts des *ccpA*-Gens das Gen *tyrS*, welches für eine Tyrosyl-tRNA-Synthetase kodiert. Das *hprK*-Gen (*lmo2483*) liegt in einer Operonstruktur mit sieben weiteren Genen, von denen *lgt* (Prolipoprotein-Diacylglyceryl-Transferase), *lmo2481* (HPr-P(Ser)-Phosphorylase, *hprP*) und *lmo2480* (Acetyltransferase) stromabwärts von *hprK* liegen. Nach dem *ptsH*-Gen folgt *lmo1003*, das für das Phosphotransferase System Enzym I kodiert.

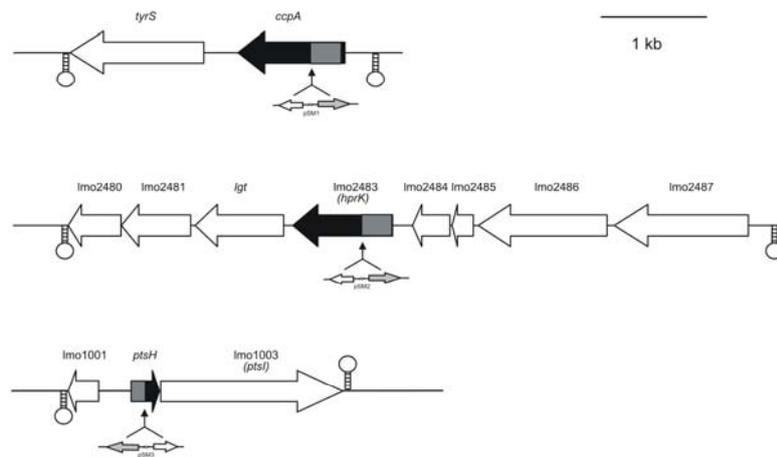


Abb. 5.2: Schematische Operonstruktur der Gene *ccpA*, *hprK* und *ptsH*. Alle Gene der Operonstrukturen wurden anhand der ListiList Datenbank (<http://genolist.pasteur.fr/ListiList>) maßstabsgetreu gezeichnet. Die Gene *ccpA*, *hprK* und *ptsH* sind in schwarz gefärbten Pfeilen dargestellt, die benachbarten Gene des Operons sind weiß dargestellt, der grau gefärbte Teil markiert den Bereich, der zur Herstellung der Insertionsmutanten in die Vektoren pSM1-3 kloniert wurde. Der dünne schwarze Pfeil markiert die Insertionsstelle von pSM1-3 in den jeweiligen Genen. **Genbeschreibung:** *tyrS* = tyrosyl-tRNA-Synthetase; *ccpA* = catabolite control protein; lmo 2480 = similar to acetyltransferase; lmo2481 = similar to *B. subtilis* HPr-P(Ser)-phosphorylase (*hprP*); *lgt* = highly similar to prolipoprotein diacylglyceryl transferase; lmo2483 (*hprK*) = HPr-P(Ser)-kinase/phosphorylase; lmo2484 = similar to *B. subtilis* YvID protein; lmo2485 = similar to *B. subtilis* YvIC protein; lmo1001 = similar to *B. subtilis* YkvS protein; *ptsH* = PTS phosphocarrier protein HPr; lmo1003 = phosphotransferase system enzym I

Um sicher zu stellen, dass sich die Insertionen in die Gene *ccpA*, *hprK* und *ptsH* nicht auf die Transkription der benachbarten Gene auswirken, d.h. kein polarer Effekt vorliegt, wurde die Transkription der stromaufwärts und –abwärts lokalisierten Gene mittels Real-time RT-PCR analysiert. Dazu wurden die Insertionsmutanten *::ccpA*, *::hprK* und *::ptsH* sowie der WT EGD-e in BHI-Vollmedium bis zur optischen Dichte OD_{600nm} von 1.0 angezogen und die RNA isoliert (siehe 4.1.13). Nach der reversen Transkription wurde die gewonnene cDNA mit den entsprechenden Oligonukleotiden über Real-time RT-PCR amplifiziert und quantifiziert (siehe Abb. 5.3; siehe 4.1.16 und 4.1.17).

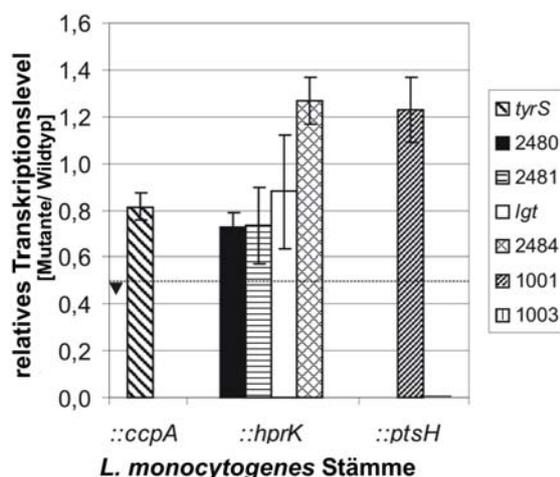


Abb. 5.3: Real-time RT-PCR zur Untersuchung des polaren Effekts auf die benachbarten Gene von *ccpA*, *hprK* und *ptsH*. Die Stämme wurden in BHI bis zu einer OD_{600nm} von 1.0 angezogen, RNA isoliert und cDNA synthetisiert. Auf der y-Achse wurde der Quotient des relativen Transkriptionslevels von Mutante gegen Wildtyp aufgetragen. Die relative Expression der untersuchten Gene (für *::ccpA*: *tyrS*; für *::hprK*: lmo2480, lmo2481, *lgt* und lmo2484 und für *::ptsH*: lmo1001 und lmo1003) (Genbeschreibung siehe Abb. 5.2) wurde auf das Haushaltsgen *rpoB* normalisiert. Ein signifikanter Unterschied in der Genexpression besteht erst bei Werten $\geq 1,8$ und $\leq 0,55$. Die schwarze Pfeilspitze markiert die untere Grenze bei 0,55.

In Abb. 5.3 ist die relative Transkription der untersuchten Gene, berechnet aus dem Quotienten der Transkriptionsmenge von Mutante und Wildtyp *L. monocytogenes* EGD-e, im Balkendiagramm dargestellt. Ein signifikanter Unterschied in der Genexpression liegt vor, wenn der Quotient über 1,8 bzw. unter 0,55 liegt. Werte über 1,8 bedeuten eine verstärkte Genexpression in der Insertionsmutante, Werte kleiner 0,55 eine verminderte Genexpression.

Die Insertionen von pSM1-2 führten in den stromaufwärts und –abwärts lokalisierten Genen *tyrS* (*ccpA*) bzw. *lmo2480*, *lmo2481*, *lgt*, *lmo2484* (*hprK*) zu keiner signifikant veränderten Genexpression in den *::ccpA*- und *::hprK*-Insertionsmutanten. Die Insertion (pSM-3) in das *ptsH*-Gen führt jedoch zu einem vollständigen Transkriptionsverlust des stromabwärts gelegenen Gens *lmo1003* (*ptsI*). Das stromaufwärts von *ptsH* gelegene Gen *lmo1001* wird dagegen durch die pSM-3-Insertion in seiner Transkription nicht beeinflusst.

Untersuchung der Insertionsmutanten auf Translationsebene

Die Insertionen pSM1-3 in die Gene *ccpA*, *hprK* und *ptsH* sollten zum Verlust der Funktion ihrer Genprodukte führen. Mittels Western Blot-Analyse war nachzuweisen, ob in den Insertionsmutanten noch Genprodukte gebildet werden. Dazu wurden der Wildtyp, die *::ccpA*-, *::hprK*- und *::ptsH*-Insertionsmutanten und die entsprechenden Revertanten *RccpA*, *RhprK* und *RptsH* in BHI-Vollmedium bis zu einer optischen Dichte von OD_{600nm} 1.0 kultiviert, die zytoplasmatische Proteinfraction isoliert (siehe 4.3.2) und diese mittels SDS-PAGE aufgetrennt (siehe 4.3.4). Nach dem Transfer der aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulosemembran erfolgte die Detektion von CcpA und HPr mit gereinigtem polyklonalem anti-CcpA- und anti-HPr-Kaninchenserum (siehe Abb. 5.4 und Abb. 5.5; siehe 4.3.8).

Wie in Abb. 5.4 und Abb. 5.5 gezeigt, bilden die *::ccpA*- und *::ptsH*-Mutanten nur sehr wenig CcpA- bzw. HPr-Protein. In den entsprechenden Revertanten konnten dagegen wieder wildtypische Proteinmengen nachgewiesen werden. Gegen die HPr-Kinase/Phosphorylase (kodiert vom *hprK*-Gen) stand kein Antikörper zur Verfügung, so dass in der *::hprK*-Mutante der Verlust des aktiven Genproduktes enzymatisch über die fehlende Phosphorylierung von HPr zu HPr-Ser46~P nachgewiesen wurde (siehe Abb. 5.6).

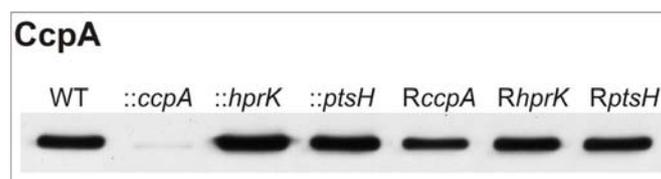


Abb. 5.4: Nachweis von CcpA im Western Blot. Der Wildtyp (WT), die Insertionsmutanten (*::ccpA*, *::hprK* und *::ptsH*) und die Revertanten (*RccpA*, *RhprK* und *RptsH*) wurden in BHI bei 37°C bis zu einer OD_{600nm} von 1.0 angezogen; 5 µg zytoplasmatische Proteine wurden pro Spur auf ein 12 %iges SDS-PAGE-Gel geladen und mit Kaninchen-α-CcpA immungefärbt.

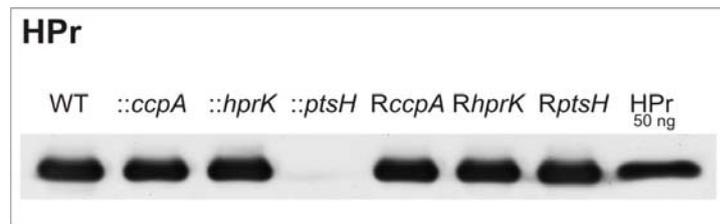


Abb. 5.5: Nachweis von HPr im Western Blot. Der Wildtyp (WT), die Insertionsmutanten (*::ccpA*, *::hprK* und *::ptsH*) und die Revertanten (*RccpA*, *RhprK* und *RptsH*) wurden in BHI bei 37°C bis zu einer OD_{600nm} von 1.0 angezogen. 5 µg zytoplasmatische Proteine wurden pro Spur auf ein 12 %iges SDS-PAGE-Gel geladen und mit Kaninchen- α -HPr immungefärbt. Zur Kontrolle wurden 50 ng gereinigtes HPr aufgetragen.

Die Abb. 5.6 zeigt das HPr-Phosphorylierungsmuster vom Wildtyp (WT) und den Insertionsmutanten *::ccpA* und *::hprK* nach Anzucht dieser Bakterienstämme in Minimalmedium (MM) mit Glukose. Da die *::ptsH*-Insertionsmutante kein HPr bildet (siehe Abb. 5.5), wurde sie in diesem Versuchsansatz nicht verwendet. Die verschiedenen Stämme wurden in MM mit 50 mM Glukose bis zu einer OD_{600nm} von 0.6 und 1.0 angezogen, zelluläre Proteine isoliert (siehe 4.3.3) und die Proteinkonzentration mittels Bradford bestimmt (siehe 4.3.3). Gleiche Mengen an zellulären Proteinen wurden zur Bestimmung der HPr-Phosphorylierung auf ein 15 %iges natives Acrylamidgel geladen, elektrophoretisch aufgetrennt und mit polyklonalem anti-HPr-Kaninchenserum immungefärbt (siehe 4.3.5 und 4.3.8). Parallel dazu wurde jeder Ansatz für 10 min bei 70°C hitzebehandelt, wodurch die hitzelabile His15-Phosphorylierung im HPr zerstört wird, und ebenfalls auf das Gel geladen (siehe 4.3.6).

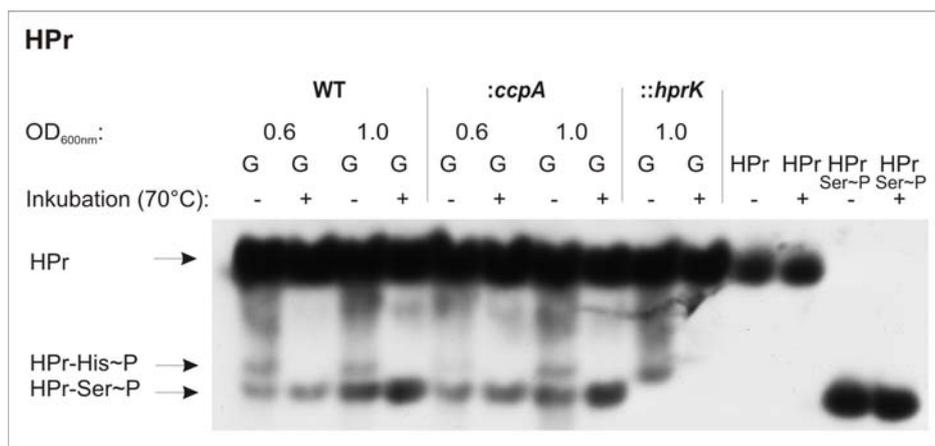


Abb. 5.6: Western Blot-Analyse zur Bestimmung der HPr-Phosphorylierung im Wildtyp EGD-e und in den Insertionsmutanten *::ccpA* und *::hprK* gewachsen in Minimalmedium mit Glukose. Der Wildtyp (WT) und die Insertionsmutanten *::ccpA* und *::hprK* wurden in definiertem Minimalmedium (MM) mit 50 mM Glukose (G) angezogen. Bei einer OD_{600nm} von 0.6 und 1.0 wurden zelluläre Proteine isoliert. 5 µg zelluläre Proteine wurden unbehandelt (-) oder 10 min bei 70°C hitzebehandelt (+) pro Spur auf ein 15 %iges natives Acrylamidgel geladen und mit Kaninchen- α -HPr immungefärbt. Zur Kontrolle wurden je 50 ng gereinigtes HPr und HPr-Ser46~P aufgetragen.

Wie in Abb. 5.6 gezeigt, ist die *::hprK*-Insertionsmutante aufgrund der fehlenden HPr-Kinase nicht in der Lage, HPr am Ser46 zu phosphorylieren. In dieser Mutante konnten nur HPr und HPr-His15~P detektiert werden. Der Wildtyp und die *::ccpA*-Mutante zeigen in beiden Wachstumsphasen eine ähnliche Menge an HPr-Ser46~P und HPr-His15~P.

5.1.2 Einfluss der Vektorinsertion pSM1-3 auf das Wachstum

Zur Überprüfung, ob durch den Verlust der KKR-Komponenten CcpA, HPrK/P und HPr Wachstumsdefekte in den jeweiligen Mutanten auftreten, wurde das Wachstum in verschiedenen Medien analysiert.

Zuerst wurde das Wachstum der Insertionsmutanten in BHI, einem Vollmedium mit undefinierter Zusammensetzung an Kohlenstoffquellen, bei 37°C untersucht und in Abb. 5.7 dargestellt.

Alle drei Insertionsmutanten zeigen in BHI-Vollmedium eine geringere Wachstumsrate als der WT. In der *::ptsH*-Insertionsmutante ist das Wachstumsdefizit am stärksten ausgeprägt.

Des Weiteren wurde das Wachstum der *::ccpA*, *::hprK* und *::ptsH*-Insertionsmutanten in definiertem Minimalmedium (MM) mit Glukose als einziger Kohlenstoffquelle untersucht. Dazu wurden die Stämme in BHI bis zu einer optischen Dichte von OD_{600nm} 0.5 angezogen, pelletiert und in gleichem Volumen MM, supplementiert mit 50 mM Glukose, resuspendiert (siehe 4.2.3). Das Wachstum des Wildtyps und der Insertionsmutanten wurde bei 37°C bestimmt. Die Insertionsmutanten wurden in Erythromycin (Em)-haltigem Medium (10 µg/ml) angezogen.

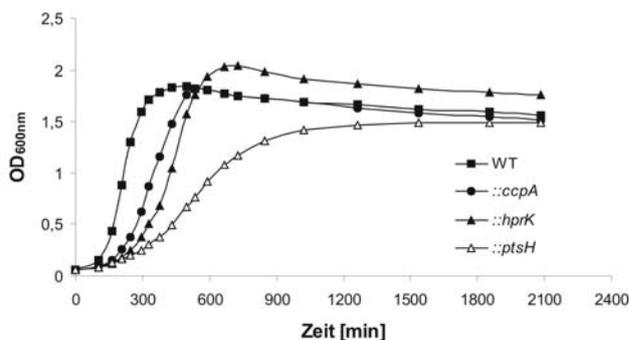


Abb. 5.7: Wachstumskurven von Wildtyp EGD-e (WT) und den Insertionsmutanten *::ccpA*, *::hprK* und *::ptsH* in BHI bei 37°C. Die Insertionsmutanten wurden in Erythromycin-haltigem Medium (10 µg/ml) angezogen.

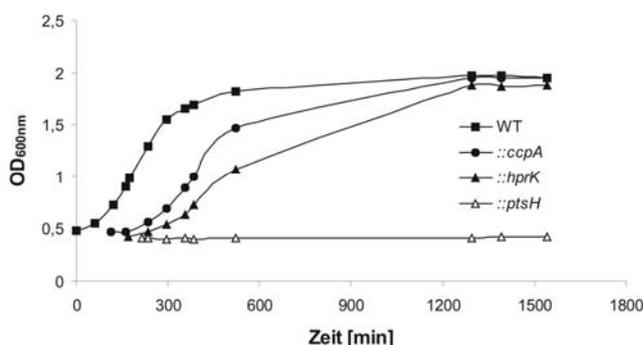


Abb. 5.8: Wachstumskurven von Wildtyp EGD-e (WT) und den Insertionsmutanten *::ccpA*, *::hprK* und *::ptsH* in Minimalmedium mit 50 mM Glukose bei 37°C. Die Bakterien wurden in BHI bis zu einer OD_{600nm} von 0.5 angezogen, pelletiert und in gleichem Volumen Minimalmedium mit 50mM Glukose resuspendiert. Bei den Insertionsmutanten wurde Erythromycin-haltiges (10 µg/ml) Medium verwendet.

In definiertem MM, supplementiert mit 50 mM Glukose als einziger Kohlenstoffquelle, zeigen die *::ccpA*- und *::hprK*-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp eine Wachstumshemmung. Diese ist in der *::hprK*-Mutante stärker ausgeprägt als in der *::ccpA*-Mutante. Die *::ptsH*-Insertionsmutante ist zu keiner Glukose-Aufnahme fähig und zeigt demzufolge unter diesen Bedingungen kein Wachstum (siehe Abb. 5.8).

Das verlangsamte Wachstum der *::ccpA*- und *::hprK*-Insertionsmutanten in Minimalmedium mit 50 mM Glukose lässt auf eine verringerte Glukose-Aufnahme in diesen Mutanten schließen. Aus diesem Grund wurde die Glukose-Aufnahme mit [¹⁴C]-markierter Glukose im Wildtyp und in der *::ccpA*- bzw. *::hprK*-Insertionsmutante untersucht. Hierzu wurden die Bakterienstämme in LB-Medium mit 50 mM Glukose bis zu einer OD_{600nm} von 1.0 angezogen (bei den Insertionsmutanten unter Verwendung von 10 µg/ml Em), in einen speziellen Transportpuffer überführt und die [¹⁴C]-Glukose-Aufnahme zu verschiedenen Zeitpunkten bestimmt (siehe 4.2.4). Um die Glukose-Aufnahme pro Bakterienzelle berechnen zu können, wurde parallel dazu die Lebendzellzahl (LZZ) vor der Überführung in den Transportpuffer bestimmt (siehe Abb. 5.9). Die Steigung der Regressionsgeraden in Abb. 5.9 gibt die Zuckeraufnahmerate pro Bakterienzelle an, d.h. die Anzahl der Glukosemoleküle, die pro Sekunde von der Bakterienzelle aufgenommen werden.

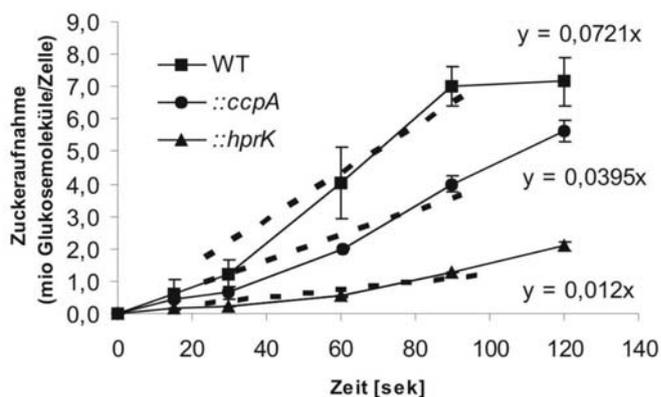


Abb. 5.9: [¹⁴C]-Glukose-Aufnahmekinetik in der *::ccpA*-, *::hprK*-Insertionsmutante und im Wildtyp. Im linearen Bereich der [¹⁴C]-Glukose-Aufnahme wurde mit Hilfe von Excel eine Regressionsgerade gelegt, deren Steigung die Anzahl der Glukosemoleküle pro Zeit angibt.

Beide Insertionsmutanten zeigen im Vergleich zum WT eine verringerte Glukose-Aufnahmerate. Die *::hprK*-Mutante zeigt, wie schon das Wachstum in Minimalmedium mit Glukose als einziger Kohlenstoffquelle vermuten ließ, eine deutlich geringere Glukose-Aufnahmerate als die *::ccpA*-Mutante.

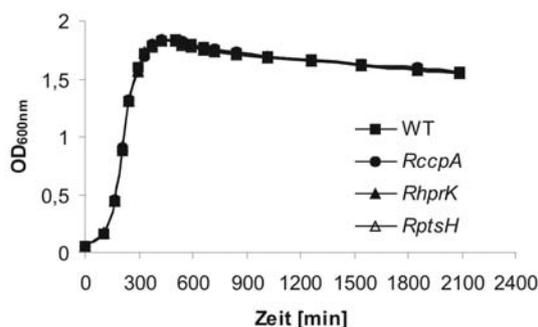


Abb. 5.10: Wachstumskurven von Wildtyp EGD-e und den Revertanten *RccpA*, *RhprK* und *RptsH* in BHI. Das Wachstum wurde bei 37°C untersucht.

Durch die Anzucht der Insertionsmutanten *::ccpA*, *::hprK* und *::ptsH* in BHI bei 30°C ohne Em lassen sich die entsprechenden Revertanten herstellen. Durch den fehlenden Selektionsdruck kommt es zur Exzision der Mutageneseplasmide pSM1-3 aus den jeweiligen Genen *ccpA*, *hprK* und *ptsH*. Zur Überprüfung einer korrekten Plasmidexzision, die zur Wiederherstellung des wildtypischen Gens führt, wurden PCRs und Sequenzierungen durchgeführt (Daten nicht gezeigt). Die Untersuchung des Wachstums der Revertanten zeigt, dass die pSM1-3-Insertionen in Genen, kodierend für Komponenten der KKR, für das verringerte Wachstum in BHI-Vollmedium und definiertem MM verantwortlich sind. Das Wachstumsverhalten der Revertante *RccpA*, *RhprK* und *RptsH* in BHI bei 37°C entspricht wieder dem des Wildtyps (siehe Abb. 5.10).

5.1.3 Untersuchung der *::ccpA*-, *::hprK*- und *::ptsH*-Mutanten in ihrer Virulenzgenexpression

Literaturdaten und eigene Beobachtungen lassen vermuten, dass Komponenten der Kohlenstoff-Katabolitrepression (KKR) an der Modulation der PrfA-Aktivität und dadurch an der Regulation PrfA-abhängiger Virulenzgenexpression beteiligt sind (siehe 2.5.4). Aus diesem Grund wurde die PrfA-abhängige Virulenzgenexpression in Mutanten der KKR (*::ccpA*-, *::hprK*- und *::ptsH*-Mutante) auf mRNA- und Protein-Ebene untersucht.

Auswirkung auf die Transkription der Virulenzgene

Mittels Real-time RT-PCR wurde überprüft, ob sich die Insertionen von pSM1-3 in die Gene *ccpA*, *hprK* und *ptsH* auf die Transkription PrfA-abhängiger Virulenzgene auswirken.

Hierzu wurden die *::ccpA*-, *::hprK*- und *::ptsH*-Insertionsmutanten und der Wildtyp in BHI-Medium bei 37°C bis zu einer optischen Dichte von OD_{600nm} 1.0 angezogen und die RNA isoliert (siehe 4.1.13). Nach der reversen Transkription wurde die gewonnene cDNA mit den entsprechenden Oligonukleotiden über Real-time RT-PCR amplifiziert und quantifiziert (siehe 4.1.16 und 4.1.17). Die Transkription folgender PrfA-abhängiger Gene wurde in diesem Versuchsansatz untersucht: *actA*, *plcA*, *plcB*, *inlA*, *inlB*, *inlC*, *hly*, *prfA*, *mpl* und *uhpT* (siehe Abb. 5.11). Um vergleichende Aussagen über die Transkription der untersuchten Gene in WT und Insertionsmutanten treffen zu können, wurde *rpoB* (*rpoB* kodiert für die β -Untereinheit der RNA-Polymerase aus *L. monocytogenes*) als interner Standard verwendet. Ein signifikanter Unterschied in der Transkription liegt vor, wenn die relative Transkription, berechnet aus dem Quotienten der Transkriptionsmenge von Mutante und Wildtyp, über 1,8 bzw. unter 0,55 liegt. Werte $\geq 1,8$ bedeuten eine verstärkte Transkription in der Insertionsmutante, Werte $\leq 0,55$ eine verminderte Transkription.

Wie in Abb. 5.11 dargestellt, zeigen die *::hprK*- und *::ptsH*-Insertionsmutanten für die Mehrheit aller untersuchten PrfA-abhängigen Virulenzgene eine gesteigerte Transkription im Vergleich zum Wildtyp. Die *::ptsH*-Insertionsmutante zeigt tendenziell eine stärkere PrfA-abhängige Virulenzgenexpression als die *::hprK*-Insertionsmutante. Für alle Gene, mit

Ausnahme des *hly*-Gens, kann eine 2 bis 4fach erhöhte Genexpression in der *::ptsH*-Mutante nachgewiesen werden. Die *::hprK*-Insertionsmutante zeigt für die Gene *plcA*, *plcB*, *inlA*, *inlC*, *hly* und *uhpT* eine mindestens 2fach so starke PrfA-abhängige Virulenzgenexpression. Für die Gene *inlC* und *uhpT* (3 bis 4,5fach) ist die Expression besonders stark ausgeprägt. Dagegen zeigt die *::ccpA*-Insertionsmutante für die PrfA-abhängigen Virulenzgene – besonders deutlich für *actA*, *plcA*, *plcB*, *inlA*, *inlB* und *hly* - eine verringerte Virulenzgenexpression im Vergleich zum Wildtyp.

Die Gesamtgenom-Transkriptom-Analysen unterstützen die Real-time RT-PCR Daten der PrfA-abhängigen Virulenzgenexpression in der *::ccpA*- bzw. *::hprK*-Insertionsmutante (siehe 5.1.4, Tab. 5.2).

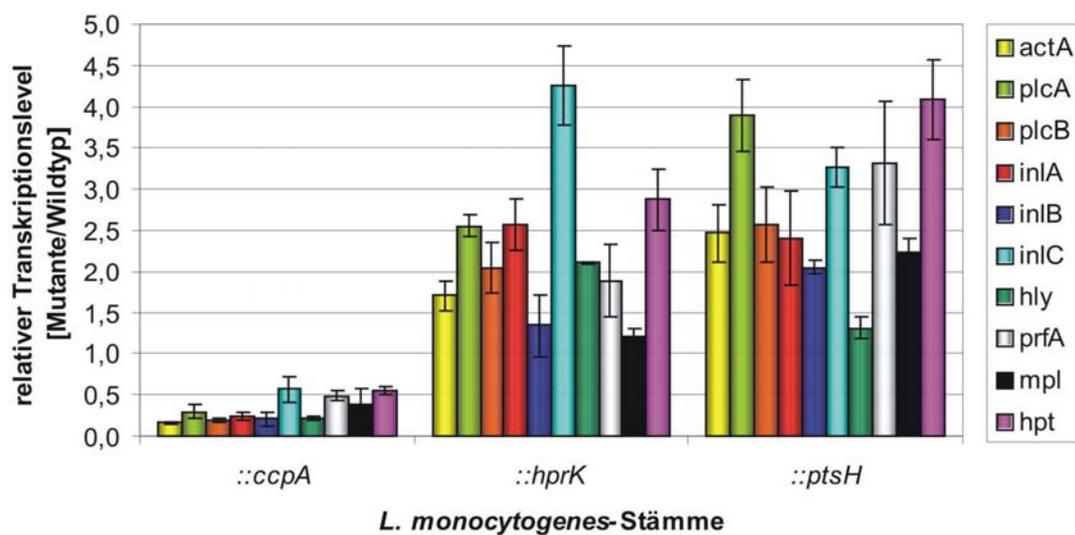


Abb. 5.11: Real-time RT-PCR zur Untersuchung der Virulenzgenexpression in den Insertionsmutanten *::ccpA*, *::hprK* und *::ptsH* im Vergleich zum Wildtyp. Die Stämme wurden in BHI bis zu einer OD_{600nm} von 1.0 angezogen, RNA isoliert und cDNA synthetisiert. Auf der y-Achse wurde der Quotient des relativen Transkriptionslevels von Mutante gegen Wildtyp aufgetragen. Die relative Expression der untersuchten Gene (*actA*, *plcA*, *plcB*, *inlA*, *inlB*, *inlC*, *hly*, *prfA*, *mpl* und *uhpT*) wurde auf das Haushaltsgen *rpoB* normalisiert.

Auswirkung der Virulenzgenexpression auf Proteinebene

Zusätzlich wurde der Einfluss der Komponenten der Kohlenstoff-Katabolitrepression (CcpA, HPrK/P und HPr) auf die Modulation der PrfA-Aktivität auf Translationsebene untersucht. Dazu wurden Hämolyse-Assays und Western Blot-Analysen durchgeführt.

Mittels Hämolyse-Assay wird die Aktivität des Listeriolysins LLO, kodiert vom PrfA-abhängigen *hly*-Gen, nachgewiesen. Als Positivkontrolle für eine gesteigerte PrfA-abhängige LLO-Expression wurde der P14-A-Stamm, der durch eine chromosomale Gly146Ser-Substitution im *prfA*-Gen ein hyperaktives PrfA (PrfA*) bildet, verwendet. Um sicherstellen zu können, dass die LLO-Aktivität der Insertionsmutanten auf den Verlust der jeweiligen

KKR-Komponenten (CcpA, HPrK/P und HPr) zurückzuführen ist, wurden die entsprechenden Revertanten *RccpA*, *RhprK* und *RptsH* ebenfalls untersucht.

Der Wildtyp EGD-e, die Insertionsmutanten *::ccpA*, *::hprK* und *::ptsH*, die entsprechenden Revertanten (*RccpA*, *RhprK* und *RptsH*) und der P14-A-Stamm wurden in BHI (bei den Insertionsmutanten unter Verwendung von 10 µg/ml Em) bei 37°C angezogen. Die Probenentnahme erfolgte bei einer OD_{600nm} von 1.0. 25 µl des Kulturüberstandes wurden in 1 ml Erythrozyten-Suspension eingesetzt und die hämolytische Aktivität bei OD_{543nm} photometrisch bestimmt (siehe 4.3.9).

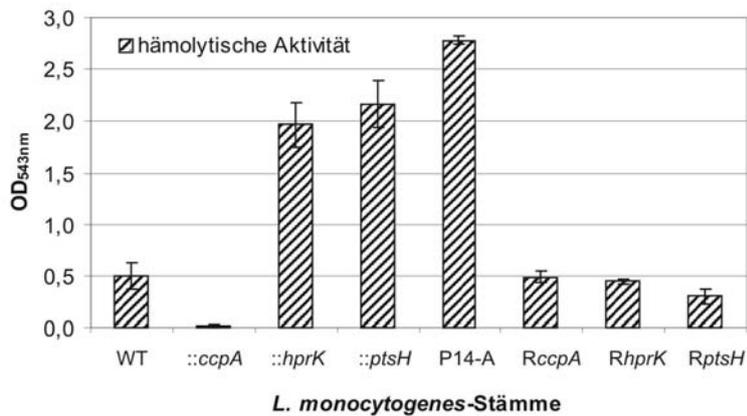


Abb. 5.12: Hämolytische Aktivität der Insertionsmutanten *::ccpA*, *::hprK* und *::ptsH* im Vergleich zum Wildtyp, P14-A-Stamm (PrfA*) und den Revertanten (*RccpA*, *RhprK* und *RptsH*). Zur Bestimmung der hämolytischen Aktivität wurden 25 µl Kulturüberstand eingesetzt. Die hämolytische Aktivität wurde bei OD_{543 nm} gemessen.

Die Insertionsmutanten *::hprK* und *::ptsH* zeigen in BHI-Vollmedium eine deutlich stärkere hämolytische Aktivität als der Wildtyp. Die beiden Mutanten zeigen sogar eine dem P14-A-Stamm, der hyperaktives PrfA* exprimiert, ähnlich starke LLO-Aktivität.

Dagegen ist in der *::ccpA*-Insertionsmutante eine geringere Aktivität des Listeriolysins LLO im Vergleich zum Wildtyp *L. monocytogenes* EGD-e zu erkennen. In den entsprechenden Revertanten *RccpA*, *RhprK* und *RptsH* kann wieder eine dem Wildtyp entsprechende hämolytische Aktivität nachgewiesen werden.

Zur Durchführung der Western Blot-Analysen wurden der Wildtyp, die Insertionsmutanten *::ccpA*, *::hprK* und *::ptsH* und die entsprechenden Revertanten *RccpA*, *RhprK* und *RptsH* in BHI-Vollmedium bei 37 °C angezogen. Bei einer optischen Dichte von OD_{600nm} von 1.0 wurden zytoplasmatische und extrazelluläre Proteinfractionen isoliert (siehe 4.3.1 und 4.3.2). Als zusätzliche Kontrollen wurden Proteine aus Zytoplasma und Überstand von Kontrollstämmen isoliert: P14-A-Stamm mit hyperaktivem PrfA* (Positivkontrolle) und ΔpKP-1-Mutante mit einer Deletion des gesamten LIPI-1 Virulenzgenclusters (Negativkontrolle) (Engelbrecht *et al.*, 1993). Mittels Bradford wurde die Proteinkonzentration bestimmt (siehe 4.3.3) und zur Überprüfung der gemessenen Konzentration gleiche Proteinmengen auf ein SDS-PAGE-Gel aufgetragen und mit Coomassie gefärbt (siehe 4.3.4 und 4.3.7; Daten nicht gezeigt).

Für die Immunfärbung wurden gleiche Mengen an zytoplasmatischen bzw. extrazellulären Proteinen pro Spur auf ein SDS-PAGE-Gel geladen. Nach der elektrophoretischen

Auftrennung wurden die Proteine auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und anschließend mit dem für das zu detektierende Protein spezifischen Antiserum behandelt (siehe 4.3.4 und 4.3.8). In einem zweiten Schritt wurde durch die Behandlung mit einem Meerrettich-Peroxidase konjugierten sekundären Antikörper der Antikörper-Protein-Komplex nachgewiesen. Der Komplex wurde als schwarze Bande auf einem Röntgenfilm sichtbar. In diesem Versuchsansatz wurde die Expression der zytoplasmatischen Virulenzfaktoren ActA und PrfA und die der extrazellulären LLO und InlC untersucht (siehe Abb. 5.13).

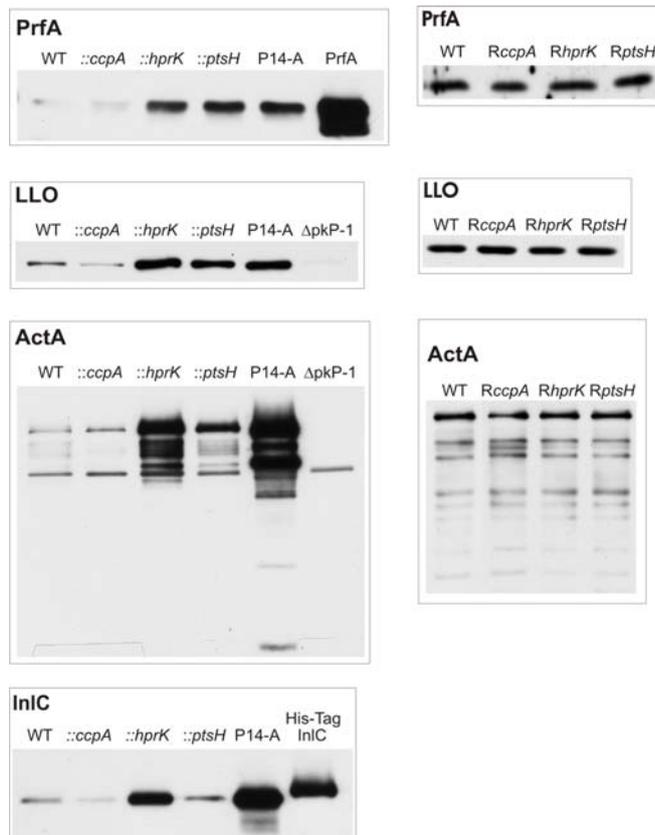


Abb. 5.13: Nachweis von PrfA, LLO, ActA und InlC im Western Blot. Der WT, die Insertionsmutanten (*::ccpA*, *::hprK* und *::ptsH*), die Revertanten (*RccpA*, *RhprK* und *RptsH*), sowie die Kontrollstämme P14-A und Δ pkP-1 wurden in BHI bis zu einer OD_{600nm} von 1.0 kultiviert; 5 μ g zytoplasmatische Proteine bzw. Überstandsproteine wurden pro Spur auf ein 12%iges SDS-PAGE-Gel geladen und immungefärbt; zur Kontrolle wurden 50 ng gereinigtes PrfA und His₆-InlC aufgetragen.

Wie in Abb. 5.13 zu sehen ist, zeigt die *::ccpA*-Insertionsmutante für die untersuchten Virulenzfaktoren LLO, ActA und InlC eine geringere Expression als der Wildtyp. PrfA-Protein scheint unter den gewählten Bedingungen jedoch im Wildtyp und in der *::ccpA*-Mutante in gleicher Menge gebildet zu werden. Dagegen zeigen die *::hprK*- und *::ptsH*-Insertionsmutanten für die PrfA-regulierten Virulenzproteine PrfA, LLO, ActA und InlC eine stärkere Expression als der WT. Für die *::hprK*-Mutante (und für einige Virulenzfaktoren auch in der *::ptsH*-Mutante) kann sogar eine ähnlich starke Virulenzgenexpression wie im P14-A-Stamm mit konstitutiv aktivem PrfA nachgewiesen werden. Wie schon vorausszusehen war, lässt sich in der Δ pkP-1-Mutante (Deletion des gesamten LIPI-1-Virulenzgenclusters) keine LLO- und ActA-Expression nachweisen. Bei der schwachen Bande im Western Blot Kaninchen- α -ActA muss es sich in der Δ pkP-1-Mutante um eine unspezifische Antikörper-Bindung handeln. Die zahlreichen Banden, die neben der unspezifischen Bande durch das

polyklonale anti-ActA-Kaninchenserum erkannt werden, stellen Abbauprodukte des ActA-Proteins dar.

Betrachtet man die Daten der Real-time RT-PCR, der Western Blot-Analyse und die des Hämolyse-Assays, so kann zusammenfassend gesagt werden: die *::ccpA*-Mutante weist in BHI-Medium sowohl auf Transkriptions-, als auch auf Translationsebene eine geringere PrfA-abhängige Virulenzgenexpression als der Wildtyp auf; die Insertionsmutanten *::hprK* und *::ptsH* zeigen unter den selben Wachstumsbedingungen eine stark erhöhte PrfA-regulierte Expression der Virulenzfaktoren (ähnlich der des P14-A-Stammes); die Revertanten zeigen in BHI-Medium wieder eine für den Wildtyp zu erwartende PrfA-abhängige Genexpression.

Einfluss von Cellobiose auf die Virulenzgenexpression

In den letzten zwei Abschnitten wurde aufgezeigt, dass der Verlust der KKR-Komponenten HPr-Kinase/Phosphorylase und HPr zu einer gesteigerten PrfA-abhängigen Virulenzgenexpression auf Transkriptions- und Translationsebene führt. Dies spricht für eine erhöhte PrfA-Aktivität in der *::hprK*- bzw. *::ptsH*-Insertionsmutante, die sich ähnlich der in der PrfA*-Mutante (konstitutiv aktives PrfA) verhält.

Zahlreiche Umweltfaktoren (Temperatur und Nährstoffangebot) haben Einfluss auf die Modulation der PrfA-Aktivität und demzufolge auf die PrfA-abhängige Virulenzgenexpression in *L. monocytogenes*. Während sich die Cellobiose-Verwertung im Wildtyp von *L. monocytogenes* hemmend auf die PrfA-Aktivität auswirkt, so hat sie in der PrfA*-Mutante (konstitutiv aktives PrfA) keinen Einfluss auf die PrfA-Aktivität bzw. PrfA-abhängige Virulenzgenexpression (Bohne *et al.*, 1996, Kreft & Vázquez-Boland, 2001). Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, ob die PrfA-abhängige Virulenzgenexpression in den Insertionsmutanten *::hprK* und *::ptsH* durch die Verwertung des Disaccharids Cellobiose beeinflusst werden kann.

Die Auswirkung der Cellobiose-Verwertung auf die Modulation der PrfA-Aktivität wurde zuerst in undefiniertem BHI-Vollmedium untersucht. Da aber die Cellobiose-Verwertung in BHI keine verringerte PrfA-abhängige Virulenzgenexpression im Wildtyp zeigte (Daten nicht gezeigt), wurden die weiteren Versuche in definiertem Minimalmedium (MM) durchgeführt. Aufgrund des Wachstumsdefizits der *::ptsH*-Mutante in definiertem MM, supplementiert mit PTS-Zuckern wie Glukose und Cellobiose (Daten zur Cellobiose-Verwertung nicht gezeigt), konnte die PrfA-abhängige Virulenzgenexpression unter diesen Wachstumsbedingungen in dieser *::ptsH*-Mutante nicht untersucht werden.

Der Wildtyp und die *::hprK*-Insertionsmutante wurden in MM mit 50 mM Glukose bzw. 50 mM Cellobiose bis zu einer OD_{600nm} von 0.6 bzw. 1.0 bei 37°C angezogen. Überstandsproteine und zelluläre Proteinfractionen wurden zu den zwei Wachstumsphasen isoliert (siehe 4.3.1), aufgetrennt (siehe 4.3.2) und mit polyklonalem anti-PrfA-, anti-LLO, anti-ActA und anti-InlC-Kaninchenserum in Zusammenarbeit mit M. Goetz immungefärbt (siehe 4.3.8) (siehe Abb. 5.14).

Die *::hprK*-Mutante zeigt, wie in BHI-Vollmedium, auch in definiertem MM mit Glukose eine stärkere Expression der Virulenzfaktoren PrfA, LLO, ActA und InlC als der WT (siehe Abb. 5.14). In der früh-logarithmischen Wachstumsphase (OD_{600nm} von 0.6) ist der Unterschied in der Virulenzgenexpression zwischen WT und *::hprK*-Mutante besonders stark ausgeprägt. Die Verwertung des Disaccharids Cellobiose wirkt sich wie erwartet, im Vergleich zur Glukose-Verwertung, hemmend auf PrfA-abhängige Virulenzgenexpression im WT von *L. monocytogenes* aus. Aber auch in der *::hprK*-Insertionsmutante führt die Cellobiose-Verwertung in der früh- und spät-logarithmischen Wachstumsphase zu einer verringerten PrfA-, LLO-, ActA- und InlC-Expression. Jedoch ist der Cellobiose-Effekt in der *::hprK*-Mutante nicht so stark ausgeprägt wie im Wildtyp. Die zahlreichen Banden, die durch das polyklonale anti-ActA-Kaninchenserum erkannt werden, stellen Abbauprodukte des ActA-Proteins dar (siehe auch 5.1.3).

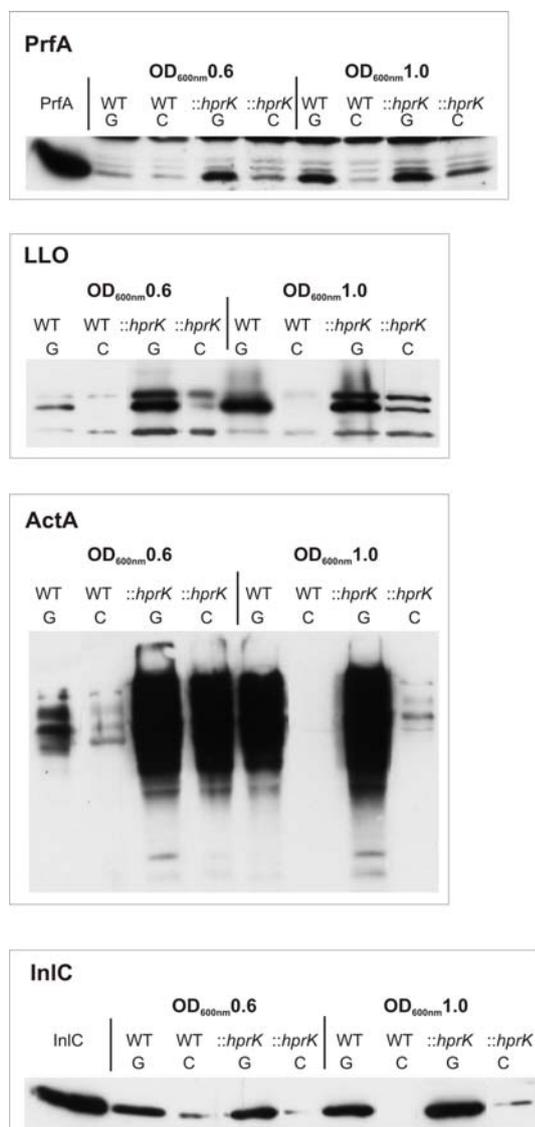


Abb. 5.14: Nachweis von PrfA, LLO, ActA und InlC im Western Blot. Der WT und die Insertionsmutante *::hprK* wurden in definiertem Minimalmedium bis zu einer OD_{600nm} von 0.6 und 1.0 kultiviert; 5 μ g zytoplasmatische Proteine bzw. Überstandsproteine wurden pro Spur auf ein 12%iges SDS-PAGE-Gel geladen und immungefärbt. Zur Kontrolle wurden 50 ng gereinigtes PrfA und His₆-InlC aufgetragen.

5.1.4 Gesamtgenom-Transkriptom-Analysen der *::ccpA* und *::hprK*-Insertionsmutanten

Zur Identifizierung jener Gene, die durch die KKR-Komponenten CcpA (*ccpA*-Gen) und HPrK/P (*hprK*-Gen) bzw. HPr-Ser46~P in ihrer Transkription reguliert werden, wurden DNA-Microarray-Analysen durchgeführt. Die Gesamtgenom-Microarrays enthalten 70mer Oligodesoxyribonukleotide aller offenen Leserahmen des *L. monocytogenes*-Genoms. Mit diesen Arrays wurden Transkriptom-Analysen der *::ccpA*- bzw. *::hprK*-Insertionsmutanten im Vergleich zum Wildtyp durchgeführt. Die zu vergleichenden Stämme wurden in BHI bei 37°C bis zu einer OD_{600nm} von 1.0 kultiviert und die RNA isoliert. Jeweils gleiche Mengen der zu vergleichenden RNA-Proben (40 µg) wurden durch die reverse Transkription mit Fluoreszenz-markierten dCTPs (Cy3-dCTP und Cy5-dCTP; GE Healthcare) in markierte cDNA umgeschrieben. Die beiden unterschiedlich markierten cDNA-Proben wurden vereint und auf dem Microarray hybridisiert. Das Scannen und die Auswertung der Microarrays erfolgte mit dem ScanArray HT Scanner und der ScanArray Express Software (Perkin Elmer) (siehe 4.4).

Die Transkription der jeweiligen Gene wird in den Tabellen Tab. 5.2 und Tab. 8.1 – Tab. 8.3 (siehe Anhang) als Quotient (*::hprK*/WT; *::ccpA*/WT) dargestellt, der sich aus dem normalisierten Hybridisierungssignal für die *::ccpA*- bzw. *::hprK*-Insertionsmutante und dem Wildtyp EGD-e ergibt. Dabei handelt es sich um Durchschnittswerte aus vier unabhängigen Experimenten. Die Ausschlussgrenze wurde bei $\geq 1,8$ und $\leq 0,5$ gesetzt. Demzufolge liegt bei Werten $\leq 0,5$ eine signifikante Herunterregulation und analog dazu eine Hochregulation bei Werten $\geq 1,8$ in den Mutanten vor.

In Tab. 8.1 – Tab. 8.3 (siehe Anhang) werden alle in den *::ccpA*- und *::hprK*-Insertionsmutanten regulierten Gene aufgelistet und in drei Gruppen eingeteilt. Gruppe Ia und b beinhalten solche Gene, die sowohl in der *::ccpA*- als auch in der *::hprK*-Mutante hoch- bzw. herunterreguliert sind und womöglich durch den CcpA/HPr-Ser46~P-Komplex in der Anwesenheit von Glukose aktiviert oder reprimiert werden (siehe Tab. 8.1). In Gruppe IIa und b sind die in der *::ccpA*-Mutante regulierten Gene aufgelistet, die in Anwesenheit von Glukose durch CcpA allein positiv oder negativ reguliert werden (siehe Tab. 8.2). Die letzte Gruppe (IIIa und b) zeigt die Gene, welche nur in der *::hprK*-Mutante und somit möglicherweise nur durch HPr-Ser46~P oder das HPr-Ser46~P/HPr-His15~P-Verhältnis reguliert werden (siehe Tab. 8.3).

In Gruppe Ia (siehe Anhang Tab. 8.1) befinden sich unter den hochregulierten Genen/Operons zahlreiche Gene, die für den Zuckertransport (hauptsächlich Phosphoenolpyruvat-Phosphotransferase-Systeme (PTS)) und Metabolismus kodieren. Ebenso konnten Gene, kodierend für ABC-Transporter, Enzyme des Glyzerin-Metabolismus und für die Synthese von Regulationsfaktoren, eingeordnet werden. Es sind nur wenige herunterregulierte Gene in Gruppe Ib zu finden, wie z.B. Gene, kodierend für Enzyme zur Biosynthese verzweigter Aminosäuren (*ilvN*, *leuC*).

Gene der Gruppe IIa (siehe Anhang Tab. 8.2), die in der *::ccpA*-Mutante hochreguliert werden, kodieren für Komponenten des PTS-abhängigen Zuckertransports und Transkriptionsfaktoren, die sich jedoch von denen aus Gruppe I unterscheiden. Bei den herunterregulierten Genen (Gruppe IIb) handelt es sich hauptsächlich um solche, kodierend

für metabolische Enzyme und einige PrfA-abhängige Virulenzgene, die zusätzlich in Tab. 5.2 aufgeführt sind. Die Anzahl der in der *::hprK*-Mutante hochregulierten Gene (Gruppe IIIa; siehe Anhang Tab. 8.3) ist relativ hoch und beinhaltet die PrfA-abhängigen Virulenzgene (Zusammenfassung siehe Tab. 5.2) und ebenfalls Gene, dessen Genprodukte in den PTS-abhängigen Zuckertransport und den Kohlenhydrat-Metabolismus involviert sind. A118 Phagen-spezifische Gene sowie Gene, kodierend für Transkriptionsfaktoren, gehören auch in diese Gruppe hochregulierter Gene. Unter den in der *::hprK*-Mutante herunterregulierten Genen (Gruppe IIIb; siehe Anhang Tab. 8.3) befinden sich hauptsächlich Gene, dessen Genprodukte in die Biosynthese verzweigter Aminosäuren und Pyrimidinen sowie in den Stickstoff-Metabolismus involviert sind.

In Tab. 5.2 sind die in der *::ccpA*- bzw. *::hprK*-Insertionsmutante regulierten PrfA-abhängigen Virulenzgene dargestellt. Die in diesem Versuch verwendeten Gesamtgenom-Microarrays trugen nicht den kompletten Satz der PrfA-regulierten Virulenzgene. Aus diesem Grund können für die PrfA-abhängigen Gene *actA*, *hly* und *prfA* selber keine Angaben gemacht werden.

Gene	<i>::hprK</i> /WT	<i>::ccpA</i> /WT	Funktion
<i>plcA</i>	3,26	nr	Phosphatidylinositol-spez. Phospholipase C (PI-PLC)
<i>hly</i>	2,04	nr	Listeriolysin O
<i>plcB</i>	2,03	nr	Phospholipase C (PC-PLC)
<i>inlA</i>	4,0	0,23	Internalin A
<i>inlB</i>	2,01	0,15	Internalin B
<i>inlC</i>	2,23	nr	Internalin C
<i>uhpT</i>	1,84	nr	Hexose-Phosphat-Transporter

Tab. 5.2: Tabellarische Auflistung der durch *::ccpA* und *::hprK* regulierten Virulenzgene. Die Intensität der Genexpression wird als Quotient (*::hprK*/WT; *::ccpA*/WT) dargestellt, der sich aus dem normalisierten Hybridisierungssignal für die *::ccpA*- bzw. *::hprK*-Insertionsmutante und dem Wildtyp EGD-e ergibt; nr = nicht differenziell reguliert, d.h. Quotient $\geq 0,55$ und $\leq 1,8$.

Die Gesamtgenom-Transkriptionsanalyse der *::hprK*-Insertionsmutante bestätigt die mittels Real-time RT-PCR gezeigten Daten der verstärkten Expression PrfA-abhängiger Virulenzgene in dieser Mutante (siehe Abb. 5.11). Für die *::ccpA*-Insertionsmutante kann nur eine verringerte Virulenzgenexpression für die Gene *inlA* und *inlB* gezeigt werden.

5.1.5 Invasion und intrazelluläre Replikation der *::ptsH*-Insertionsmutante

Die *::ptsH*-Insertionsmutante (fehlendes HPr) zeichnet sich zum einen durch ein deutlich vermindertes Wachstum in BHI-Vollmedium (siehe Abb. 5.7), ein nicht-vorhandenes Wachstum in definiertem Minimalmedium, supplementiert mit Glukose (siehe Abb. 5.8) bzw. Glycerin (siehe Abb. 5.38) und durch eine erhöhte Expression PrfA-abhängiger Gene aus. Diese gesteigerte Virulengenexpression konnte sowohl auf Transkriptions- und Translationsebene nachgewiesen werden (siehe 5.1.3). Es stellt sich nun die Frage, ob diese Mutante, die zwar eine verstärkte Expression der Virulenzfaktoren aufweist aber aufgrund des

fehlenden HPr-Proteins ein Defizit im PTS-abhängigen Zuckertransport (z.B. Glukose) oder in der Verwertung von Glycerin oder Dihydroxyaceton besitzt (siehe 2.6), zu einer intrazellulären Replikation in eukaryotischen Zellen fähig ist.

Um dies zu überprüfen, wurde die Fähigkeit zur Replikation der *::ptsH*-Insertionsmutante im Vergleich zum Wildtyp in J744 Makrophagen näher untersucht. Die Makrophagen wurden 48 h vor der Infektion in 24-Napfplatten ausgesät und mit den zu untersuchenden Stämmen mit einer MOI von 1 infiziert. Da die *::ptsH*-Insertionsmutante in Vorversuchen eine geringere Invasivität zeigte, wurde die Invasionsrate durch Zentrifugation bei 1100 rpm für 10 min verbessert. Zu verschiedenen Zeitpunkten (0 h, 1 h, 3 h, 5 h und 7 h) wurde die Infektion gestoppt, die Wirtszellen durch Ultraschall lysiert und die Anzahl an lebenden intrazellulären Bakterien durch Ausplattieren geeigneter Verdünnungsstufen bestimmt. Im Falle der *::ptsH*-Insertionsmutante wurde die Anzahl der Bakterien auf BHI-Platten mit 10 µg/ml Erythromycin bei 42°C bestimmt. So kann sichergestellt werden, dass nur die Insertionsmutante *::ptsH* und nicht die aufgrund des fehlenden Selektionsdruckes gebildete Revertante *RptsH* in die CFU-Berechnung einbezogen wird. Die Verdünnungen des WT wurden auf BHI-Platten ausplattiert und bei 37°C inkubiert (siehe 4.5.5).

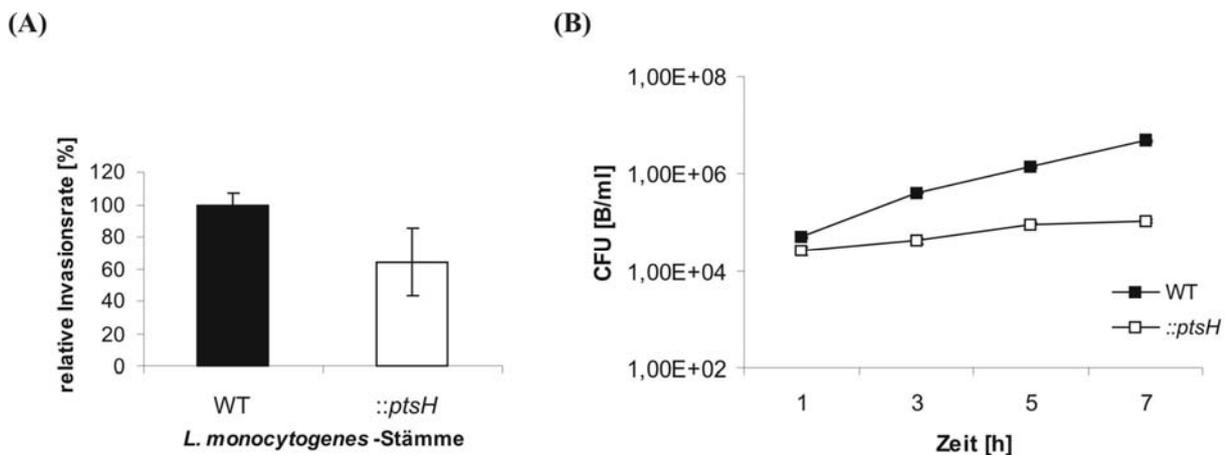


Abb. 5.15: Invasion (A) und intrazelluläre Replikation (B) der *::ptsH*-Insertionsmutante im Vergleich zum Wildtyp (WT) in J744 Makrophagen. Die in der Graphik dargestellten Werte entsprechen dem Mittelwert aus drei Versuchsansätzen mit jeweiliger Standardabweichung eines repräsentativen Versuches.

Wie in Abb. 5.15 (A) zu sehen ist, weist die *::ptsH*-Insertionsmutante eine Reduktion in der Internalisierung durch Makrophagen auf und wurde 1,5fach schlechter als der Wildtyp WT phagozytiert. Auch in der intrazellulären Replikation (siehe Abb. 5.15 (B)) zeigt die *::ptsH*-Mutante deutliche Unterschiede zum WT. Die *::ptsH*-Mutante repliziert mit einer wesentlich geringeren Rate als der Wildtyp. Zu späteren Zeitpunkten der Infektion (zwischen t5 und t7) ist kaum eine Zunahme der Bakterienzahl mehr zu erkennen.

5.2 Untersuchung der Korrelation zwischen PrfA-Aktivität und HPr-Phosphorylierung in Minimalmedium mit verschiedenen Kohlenstoffquellen

Wie bereits in der Literatur beschrieben, wirkt sich die Verwertung von verschiedenen Kohlenstoffquellen (z. B. Glukose, Mannose, Cellobiose, Fruktose oder Glukose-1-Phosphat) unterschiedlich auf die PrfA-Aktivität und demzufolge auf die PrfA-abhängige Expression der Virulenzfaktoren aus (Milenbachs *et al.*, 1997, Gilbreth *et al.*, 2004, Ripio *et al.*, 1997a). Die erhöhte PrfA-abhängige Virulenzgenexpression in der *::ptsH*- und der *::hprK*-Mutante gibt Hinweise dafür, dass HPr (kodiert vom *ptsH*-Gen) bzw. die phosphorylierten Formen HPr-Ser46~P oder HPr-His15~P direkt oder indirekt in die Modulation der PrfA-Aktivität involviert sind (siehe Abb. 5.11 - Abb. 5.13). Um zu überprüfen, ob ein Zusammenhang zwischen PrfA-Aktivität und der Konzentration von HPr, HPr-Ser46~P und HPr-His15~P besteht, wurde die PrfA-abhängigen Virulenzgenexpression und parallel dazu die Menge an HPr-Ser46~P und HPr-His15~P in definiertem Minimalmedium (MM) mit verschiedenen Kohlenstoffquellen bestimmt.

5.2.1 Wachstum in Minimalmedium mit Glukose, Cellobiose, Glycerin und Glukose-6-Phosphat als Kohlenstoffquelle

Zuerst wurde das Wachstum des Wildtyps in definiertem Minimalmedium (MM) mit jeweils 50 mM Glukose, Cellobiose und Glycerin bei 37°C untersucht (siehe Abb. 5.16). Bei Glukose und Cellobiose handelt es sich um PTS-gängige Zucker, bei Glycerin dagegen um eine nicht-PTS-abhängige Kohlenstoffquelle (siehe 4.2.1).

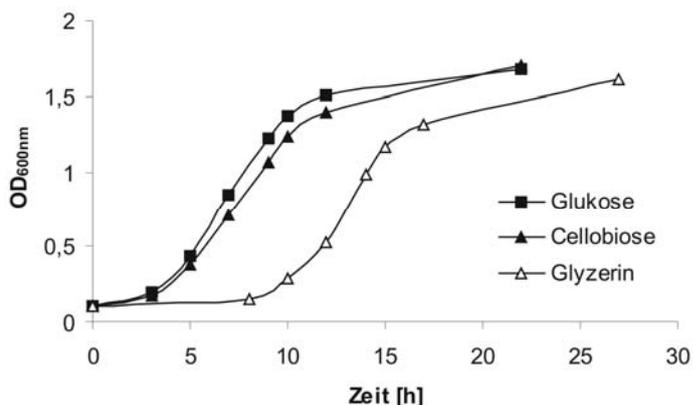


Abb. 5.16: Wachstumskurven des Wildtyps EGD-e in Minimalmedium mit den verschiedenen Kohlenstoffquellen (50 mM Glukose, 50 mM Cellobiose und 50 mM Glycerin). Das Wachstum wurde bei 37°C untersucht.

Wie in Abb. 5.16 zu sehen, führt die Verwertung der Kohlenstoffquellen Glukose, Cellobiose und Glycerin im Wildtyp zu keinem signifikanten Wachstumsunterschied in der logarithmischen Wachstumsphase. Jedoch weist der Wildtyp in Glycerin-haltigem MM eine längere Lag-Phase von ca. 6 h auf.

Glukose-6-P (G6P) stellt für *L. monocytogenes* eine weitere PTS-unabhängige Kohlenstoffquelle dar, die über den Hexose-Phosphat-Transporter UhpT in die Bakterienzelle transportiert wird. Dieser Transporter wird von dem strikt PrfA-abhängigen Gen *uhpT* kodiert. Glukose-6-Phosphat stellt für *L. monocytogenes* im Zytoplasma der Wirtszelle eine wichtige Kohlenstoffquelle dar, da eine $\Delta uhpT$ -Mutante im eukaryotischen Zytosol eine verringerte Replikationsrate zeigte (Chico-Calero *et al.*, 2002b).

Das Wachstum mit G6P ist strikt PrfA-abhängig, d.h. nur unter PrfA-stimulierenden Bedingungen wird das *uhpT*-Gen exprimiert und G6P von der Bakterienzelle aufgenommen. In LB-Medium oder definiertem MM jeweils supplementiert mit 50 mM G6P konnte kein Wachstum von *L. monocytogenes* EGD-e nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Es ist bekannt, dass die Substanz Amberlite XAD-4 (XAD) eine ähnliche Eigenschaft wie Aktivkohle besitzt, hauptsächlich hydrophobe Verbindungen binden kann und sich als Zusatz im Wachstumsmedium stimulierend auf die PrfA-Aktivität auswirkt (Ripio *et al.*, 1996, Ermolaeva *et al.*, 2004).

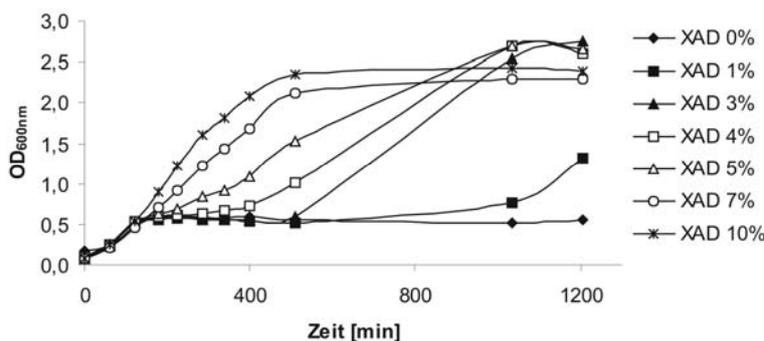


Abb. 5.17: Wachstumskurven von Wildtyp EGD-e in LB-Medium mit verschiedenen XAD-Konz. supplementiert mit 50 mM Glukose-6-Phosphat. Das Wachstum wurde bei 37°C untersucht.

Wie in Abb. 5.17 gezeigt, kann erst durch XAD-Zugabe in G6P-haltiges LB-Medium ein Wachstum von *L. monocytogenes* nachgewiesen werden. Dabei hat die XAD-Konzentration einen Einfluss auf die Wachstumsrate in G6P-haltigem LB-Medium. Je mehr XAD dem Wachstumsmedium zugefügt wurde, desto effizienter ist das Wachstum von *L. monocytogenes* in G6P-haltigem LB-Medium. Bei Abwesenheit von XAD (0 % XAD) kann in LB-Medium mit G6P kein Wachstum des WT's nachgewiesen werden. Der WT zeigt unter diesen Bedingungen ein für LB-Medium ohne zusätzliche Kohlenstoffquelle typisches Wachstum, wo schon bei einer OD_{600nm} von ca. 0,6 - 0,7 die stationäre Wachstumsphase erreicht wird.

Für die weiteren Wachstumsversuche in G6P-haltigem LB-Medium, die Untersuchung der PrfA-anhängigen Virulenzgenexpression sowie die Bestimmung der HPr-Phosphorylierungszustände, wurden 5 % XAD dem Wachstumsmedium zugefügt.

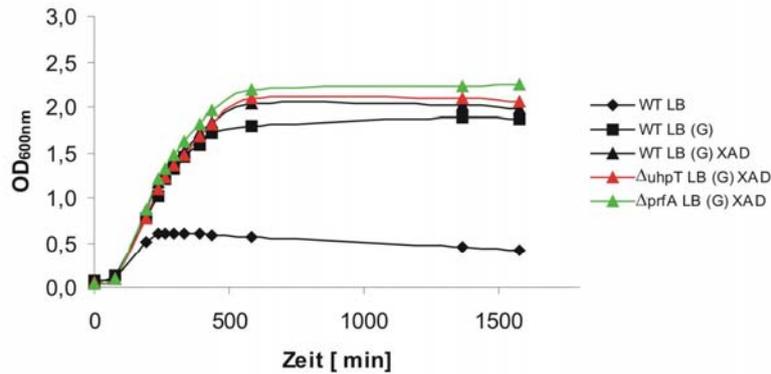


Abb. 5.18: Wachstumskurven von Wildtyp (WT) (schwarz), $\Delta uhpT$ (rot) und $\Delta prfA$ (grün) in LB-Medium mit 50mM Glukose (G) mit und ohne 5 % XAD. Das Wachstum wurde bei 37°C untersucht. Zur Kontrolle wurde zusätzlich das Wachstum des WT in reinem LB-Medium bestimmt.

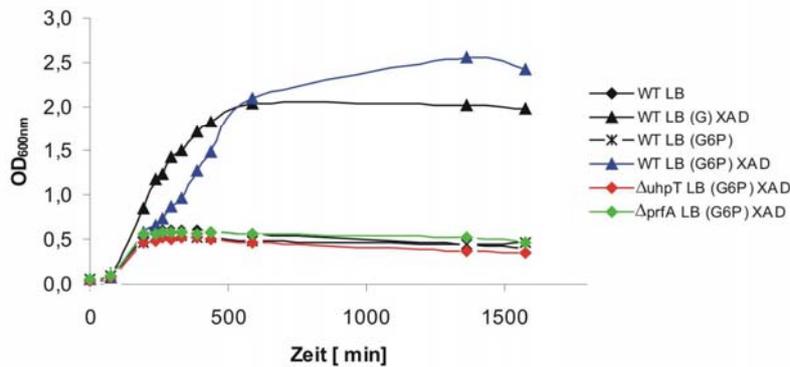


Abb. 5.19: Wachstumskurven von Wildtyp (WT) (schwarz, blau), $\Delta uhpT$ (rot) und $\Delta prfA$ (grün) in LB-Medium mit 50mM Glukose (G) bzw. Glukose-6-Phosphat (G6P) mit und ohne 5 % XAD. Das Wachstum wurde bei 37°C untersucht. Zur Kontrolle wurde zusätzlich das Wachstum des WT in reinem LB-Medium bestimmt.

Die Abb. 5.18 und Abb. 5.19 zeigen das Wachstumsverhalten von *L. monocytogenes* EGD-e und den Kontrollstämmen $\Delta uhpT$ und $\Delta prfA$ in G6P- bzw. Glukose-haltigem LB-Medium mit und ohne Zugabe von 5 % XAD. Zusätzlich wurde das Wachstum des Wildtyps in LB-Medium ohne zusätzliche Kohlenstoffquelle untersucht. Die Kontrollstämme $\Delta uhpT$ und $\Delta prfA$ sollten aufgrund des fehlenden Hexose-Phosphat-Transporters UhpT bzw. des fehlenden Transkriptions-Aktivators PrfA nicht mehr in der Lage sein, in G6P-haltigem Medium wachsen zu können.

Für *L. monocytogenes* kann in LB-Medium ohne zusätzliche Kohlenstoffquelle nur ein Wachstum bis zu einer optischen Dichte von OD_{600nm} 0,6 – 0,7 (schwarze Raute; Abb. 5.18 und Abb. 5.19) gezeigt werden. Das Hinzufügen von zusätzlicher Glukose in LB-Medium gewährleistet ein Wachstum des WT bis zu einer OD_{600nm} von 2,0 (schwarzes Quadrat; Abb. 5.18). Die An- bzw. Abwesenheit von XAD hat keinen Einfluss auf das Wachstum des WTs in Glukose-haltigem LB-Medium. Auch die Kontrollstämme $\Delta uhpT$ (rot) und $\Delta prfA$ (grün) zeigen in Glukose-haltigem LB-Medium mit XAD zum WT keine Wachstumsunterschiede (siehe Abb. 5.18).

Wie in Abb. 5.19 dargestellt, zeigt der WT in LB-Medium mit G6P ohne XAD-Zugabe ein für LB-Medium ohne zusätzliche Kohlenstoffquelle typisches Wachstum, welches schon bei einer optischen Dichte von OD_{600nm} 0,6 die stationäre Wachstumsphase erreicht (schwarzer Stern; Abb. 5.19). Erst das Hinzufügen von 5 % XAD ins Wachstumsmedium ermöglicht die Verwertung von G6P (blaues Dreieck; Abb. 5.19). Der WT zeigt in G6P-haltigem LB-Medium im Vergleich zu Glukose-haltigem LB-Medium (mit oder ohne XAD-Zugabe) eine

leichte Wachstumsverzögerung. Wie erwartet, weisen die beiden Kontrollstämme $\Delta uhpT$ (rot) und $\Delta prfA$ (grün) einen Wachstumsverlust in G6P-haltigem LB-Medium auf.

Eine weitere Methode zur Stimulierung der PrfA-abhängigen *uhpT*-Expression, die erst ein Wachstum mit G6P ermöglicht, ist die Vorzucht der Bakterien in MM mit 50 mM Glycerin. Bei einer optischen Dichte von OD_{600nm} 0.5 wird die Bakteriensuspension pelletiert, mit PBS gewaschen, im gleichen Volumen MM mit 50 mM G6P aufgenommen und das Wachstum bei 37°C bestimmt (siehe Abb. 5.20; siehe 4.2.3).

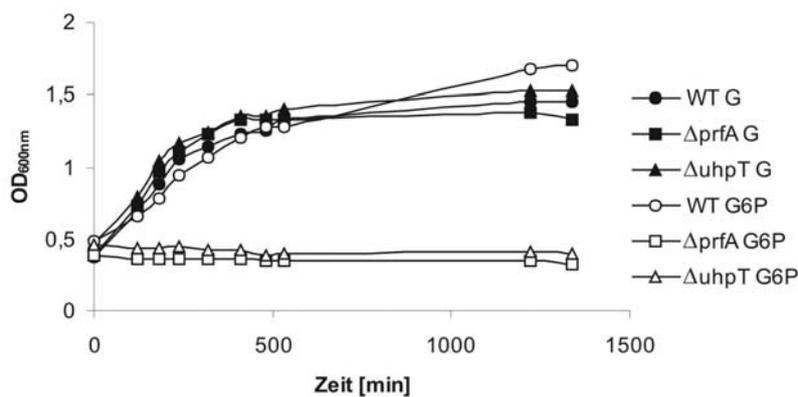


Abb. 5.20: Wachstumskurven von Wildtyp (WT), $\Delta uhpT$ und $\Delta prfA$ in Minimalmedium mit 50 mM Glukose und Glukose-6-Phosphat. Die Stämme wurden in Minimalmedium (MM) mit 50 mM Glycerin bis zu einer OD_{600nm} von 0.5 angezogen, pelletiert und in gleichem Volumen MM mit 50 mM Glukose-6-Phosphat (G6P) überführt. Das Wachstum wurde bei 37°C untersucht.

Die Vorzucht in Glycerin-haltigem MM stimuliert die PrfA-anhängige Expression des Hexose-Phosphat-Transporters UhpT ausreichend genug, so dass ein effizientes Wachstum des Wildtyps (WT) in definiertem MM mit 50 mM G6P möglich ist (ungefüllter Kreis; Abb. 5.20). Die Wachstumsraten des WT, gewachsen in Glukose bzw. G6P, unterscheiden sich nur geringfügig. In G6P-haltigem MM erreicht der WT die stationäre Wachstumsphase erst bei einer optischen Dichte von OD_{600nm} 1.7. Dagegen wird die stationäre Phase in Glukose-haltigem MM im WT schon bei einer OD_{600nm} von 1.7 erlangt. Die Kontrollstämme $\Delta uhpT$ und $\Delta prfA$ zeigen, wie erwartet, kein Wachstum mit G6P als einziger Kohlenstoffquelle. In Glukose-haltigem MM zeigen die Kontrollstämme ($\Delta uhpT$ und $\Delta prfA$) das gleiche Wachstumsverhalten wie der WT.

5.2.2 Einfluss der Glukose-, Cellobiose-, Glycerin- und Glukose-6-Phosphat-Verwertung auf die PrfA-abhängige Virulenzgenexpression

Nach dem Wachstum von *L. monocytogenes* in definiertem Minimalmedium (MM) mit verschiedenen Kohlenstoffquellen (Glukose, Cellobiose, Glycerin und Glukose-6-Phosphat) wurde zu unterschiedlichen Wachstumsphasen die PrfA-abhängige Virulenzgenexpression auf Transkriptions- und Translationsebene untersucht.

Der WT wurde in definiertem MM mit entweder 50 mM Glukose, 50mM Cellobiose bzw. 50 mM Glycerin bis zu einer optischen Dichte von OD_{600nm} 0.6 und 1.0 angezogen. Die isolierte

RNA wurde in cDNA umgeschrieben und in der Real-time RT-PCR zur Untersuchung der PrfA-abhängigen Virulenzgenexpression eingesetzt (4.1.13, 4.1.16 und 4.1.17). Um vergleichende Aussagen über die Transkription der untersuchten Gene in WT, gewachsen mit unterschiedlichen Kohlenstoffquellen, treffen zu können, wurde *rpoB* (*rpoB* kodiert für die β -Untereinheit der RNA-Polymerase aus *L. monocytogenes*) als interner Standard verwendet.

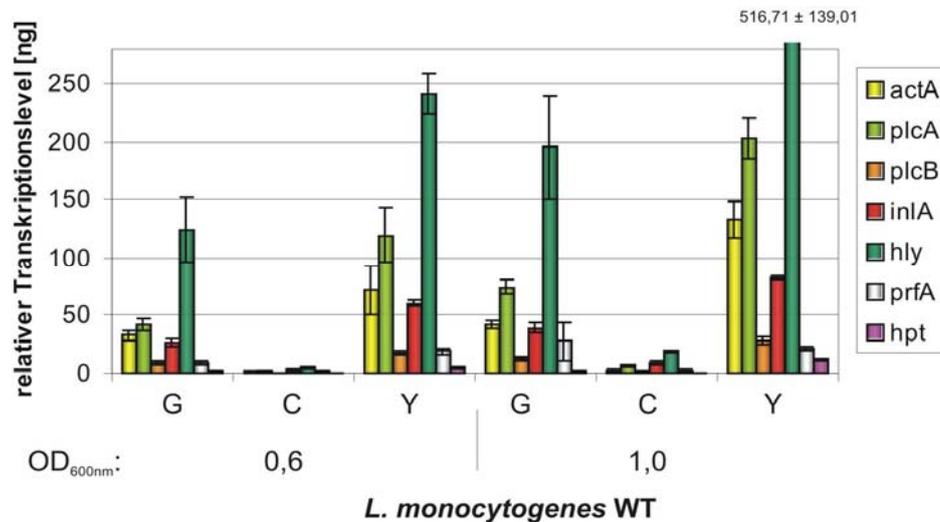


Abb. 5.21: Real-time RT-PCR zur Untersuchung der Virulenzgenexpression im Wildtyp (WT) gewachsen in Minimalmedium mit verschiedenen Kohlenstoffquellen. Der WT wurde in Minimalmedium mit jeweils 50 mM Glukose (G), Cellobiose (C) und Glyzerin (Y) bis zu einer OD_{600nm} von 0.6 und 1.0 angezogen. Die RNA wurde isoliert und cDNA synthetisiert. Auf der y-Achse wurde der relative Transkriptionslevel in ng aufgetragen. Die relative Expression der untersuchten Gene (*actA*, *plcA*, *plcB*, *inlA*, *hly*, *prfA*, und *uhpT*) wurde auf das Haushaltsgen *rpoB* normalisiert.

Die Verwertung der PTS-unabhängigen Kohlenstoffquelle Glyzerin hat einen stimulierenden Effekt auf die PrfA-abhängige Virulenzgenexpression. Die Glyzerin-Verwertung zeigt im Vergleich zu der von Glukose bzw. Cellobiose sowohl in der früh- (OD_{600nm} von 0.6) als auch in der spät- (OD_{600nm} von 1.0) logarithmischen Wachstumsphase die höchste Expression der Virulenzgene *actA*, *plcA* und *B*, *inlA*, *hly*, *prfA* und *uhpT* (siehe Abb. 5.21).

In Glukose-haltigem MM kann eine verstärkte PrfA-regulierte Virulenzgenexpression mit steigender optischer Dichte nachgewiesen werden, jedoch wird das Transkriptionslevel von dem in Glyzerin-haltigem MM gewachsenen Wildtyp (WT) nicht erreicht. Der hemmende Effekt der Cellobiose-Verwertung auf die PrfA-Aktivität und somit auf die PrfA-regulierte Virulenzgenexpression (siehe auch Abb. 5.14) kann ebenfalls mittels Real-time RT-PCR bestätigt werden (Abb. 5.21). Alle untersuchten Virulenzgene (*actA*, *plcA* und *B*, *inlA*, *hly*, *prfA* und *uhpT*) zeigen in der frühen Wachstumsphase (OD_{600nm} von 0.6) kaum eine Expression, die sich auch nur geringfügig in der späteren Wachstumsphase (OD_{600nm} von 1.0) steigert.

Zur Durchführung des Hämolyse-Assays, mit dem die LLO-Aktivität bestimmt werden kann, wurde der WT in MM entweder mit 50mM Glukose, Cellobiose oder Glyzerin bei 37°C angezogen. Zu den verschiedenen Wachstumsphasen OD_{600nm} von 0.4, 0.6, 1.0 und 1.5

wurden 25 µl Kulturüberstand entnommen und in 1 ml Erythrozyten-Suspension eingesetzt (siehe 4.3.9). Die hämolytische Aktivität wurde bei OD_{543nm} gemessen und in Abb. 5.22 dargestellt.

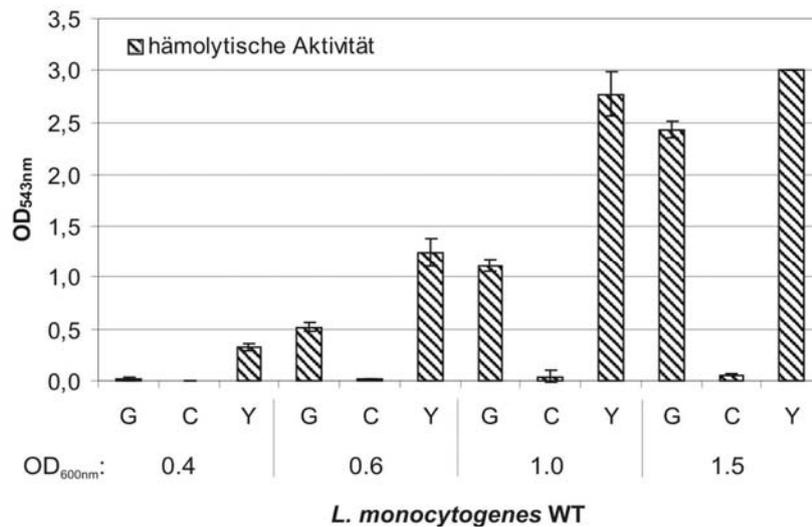


Abb. 5.22: Hämolytische Aktivität des Wildtyps (WT) in verschiedenen Wachstumsphasen und verschiedenen Kohlenstoffquellen. Zur Bestimmung der hämolytischen Aktivität des Wildtyps (WT) gewachsen in Minimalmedium mit Glukose (G), Cellobiose (C) und Glycerin (Y) wurden 25 µl Kulturüberstand eingesetzt; die hämolytische Aktivität wurde bei OD_{543nm} gemessen.

Wie in Abb. 5.22 zu sehen ist, führt die Glycerin-Verwertung von *L. monocytogenes* zu einer gesteigerten LLO-Aktivität. Dagegen zeigt der WT, gewachsen mit den PTS-abhängigen Zucker Glukose und Cellobiose, eine geringe LLO-Aktivität. Vor allem in den früh- (OD_{600nm} von 0.4 und 0.6) und spät- (OD_{600nm} von 1.0) logarithmischen Wachstumsphasen ist der Unterschied in der hämolytischen Aktivität zwischen Glukose- und Glycerin-haltigem MM besonders deutlich. Die Verwertung von Glycerin zeigt schon zu Beginn des Wachstums im WT eine erhöhte LLO-Aktivität, während die hämolytische Aktivität in Glukose-haltigem Medium erst in der früh-stationären Wachstumsphase (OD_{600nm} 1.5) ansteigt. In Cellobiose-haltigem MM kann auch in der früh-stationären Phase (OD_{600nm} von 1.5) kaum hämolytische Aktivität im WT detektiert werden.

Zusätzlich wurde die PrfA-abhängige Virulenzgenexpression nach dem Wachstum des Wildtyps in definiertem Minimalmedium (MM) mit Glukose bzw. Glycerin, auf Translationsebene mittels Western Blot-Analyse untersucht (siehe Abb. 5.23). Dazu wurde der WT in definiertem MM mit 50 mM Glukose bzw. 50 mM Glycerin bei 37°C kultiviert. Bei einer optischen Dichte von OD_{600nm} 0.6 und 1.0 wurde die zytoplasmatische Proteinfraction isoliert (siehe 4.3.2), die Proteinkonzentration bestimmt (siehe 4.3.3) und gleiche Mengen an Protein auf ein SDS-PAGE-Gel aufgetragen (siehe 4.3.4). Nach dem Transfer der aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulosemembran erfolgte die Detektion von PrfA und ActA mit polyklonalem anti-ActA und anit-PrfA-Kaninchenserum (siehe 4.3.8).

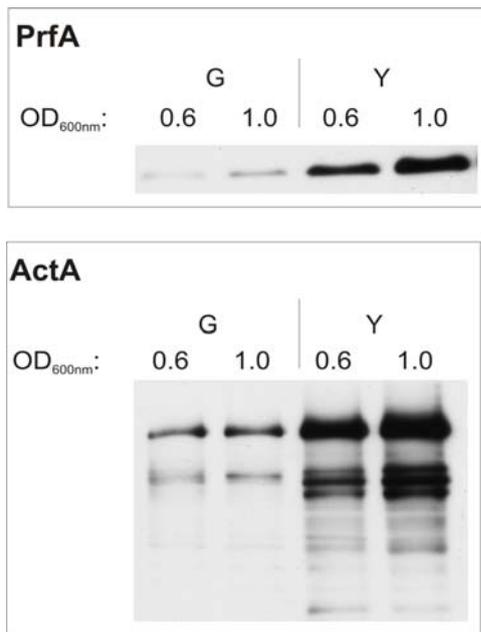


Abb. 5.23: Nachweis von PrfA und ActA im Western Blot. Der Wildtyp wurde in definiertem Minimalmedium mit jeweils 50 mM Glukose (G) und Glycerin (Y) bis zu einer OD_{600nm} von 0.6 und 1.0 angezogen; 5 µg zytoplasmatische Proteine wurden pro Spur auf ein 12 %iges SDS-PAGE-Gel geladen und immungefärbt.

Wie in Abb. 5.23 zu sehen ist, zeigt der WT, gewachsen in Glycerin-haltigem MM, eine wesentlich höhere PrfA- und ActA-Expression in der früh- (OD_{600nm} von 0.6) und spät-logarithmischen (OD_{600nm} von 1.0) Wachstumsphase als der in Glukose gewachsene WT. Bei den zahlreichen Banden, die durch das polyklonale anti-ActA-Kaninchenserum erkannt werden, handelt es sich um Abbauprodukte des ActA-Proteins (siehe auch 5.1.3).

Die Verwertung von Glukose-1-Phosphat (G1P) bzw. Glukose-6-Phosphat (G6P) spielt bei der intrazellulären Replikation von *L. monocytogenes* eine Rolle, da eine Deletionsmutante des Hexose-Phosphat-Transporters UhpT zu einer verringerten Replikationsrate im Zytoplasma der infizierten Wirtszelle führte (Chico-Calero *et al.*, 2002). Zusätzlich wurde beschrieben, dass die PTS-unabhängige Verwertung von G1P nicht, wie die von Glukose, Mannose, Fruktose oder Cellobiose (PTS-Zucker), zu einer verringerten PrfA-abhängigen Virulenzgenexpression führte (Ripio *et al.*, 1997a). Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einfluss der G6P-Verwertung auf die Modulation der PrfA-Aktivität näher untersucht.

Um ein effizientes Wachstum des WT in G6P-haltigem Medium zu erzielen, ist eine verstärkte PrfA-Aktivität erforderlich, die zu einer PrfA-abhängigen *uhpT* (kodierend für Hexose-Phosphat-Transporter UhpT)-Expression führt. Eine gesteigerte PrfA-Aktivität, die ein effizientes Wachstum des WT mit G6P ermöglichte, konnte entweder durch die Zugabe von Amberlite XAD-4 (XAD) während des Wachstums oder die Vorzucht des WT in Glycerin-haltigem MM erzielt werden (siehe 5.2.1). Zur Untersuchung der PrfA-abhängigen Virulenzgenexpression in G6P-haltigem Medium wurden beide Methoden (XAD-Zugabe und Vorzucht in Glycerin-haltigem MM) angewandt.

Der WT wurde in LB-Medium mit 5 % XAD und 50 mM G6P bzw. 50 mM Glukose bei 37°C angezogen (siehe 4.2.2). Bei einer optischen Dichte von OD_{600nm} 1.0 wurden zytoplasmatische Proteine zur Durchführung von Western Blot-Analysen isoliert und bei OD_{600nm} 0.6 und 1.0 Kulturüberstände für einen Hämolyse-Assay entnommen.

Mittels des Hämolyse-Assays kann die Aktivität des Listeriolysins LLO, kodiert vom PrfA-abhängigen *hly*-Gen, im WT in Anwesenheit von Glukose und G6P bestimmt werden. Da es sich bei LB-Medium um ein für die PrfA-Aktivität stark hemmendes Medium handelt, wurden anstatt der 25 μ l 50 μ l Kulturüberstand (Wachstumsphasen OD_{600nm} von 0.6 und 1.0) in 1 ml Erythrozyten-Suspension eingesetzt (siehe 4.3.9).

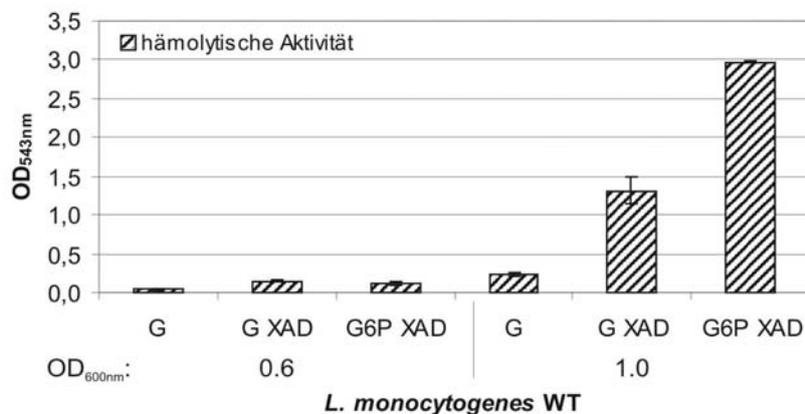


Abb. 5.24: Hämolytische Aktivität des Wildtyps (WT), gewachsen in LB-Medium mit Glukose (G) bzw. Glukose-6-Phosphat (G6P). Zur Bestimmung der hämolytischen Aktivität wurde der Wildtyp (WT) in LB-Medium mit 5 % XAD und 50 mM Glukose (G) und 50 mM Glukose-6-Phosphat (G6P) bis zu einer OD_{600nm} von 0.6 und 1.0 angezogen. Zur Kontrolle wurde der Wildtyp (WT) in LB-Medium mit Glukose ohne XAD zusätzlich angezogen. 50 μ l Kulturüberstand wurden zur Messung eingesetzt und die hämolytische Aktivität bei OD_{543nm} gemessen.

Wie in Abb. 5.24 zu erkennen ist, zeigt sich in der früh-logarithmischen Wachstumsphase (OD_{600nm} von 0.6), kein Unterschied in der LLO-Aktivität zwischen der Verwertung von Glukose (G^{XAD}) und Glukose-6-Phosphat ($G6P^{XAD}$). In dieser Wachstumsphase führt XAD im Wachstumsmedium nur zu einer geringfügigen erhöhten LLO-Aktivität. Erst in der spät-logarithmischen Wachstumsphase (OD_{600nm} von 1.0), in der das Wachstum auf zusätzlich supplementierte Kohlenstoffquellen beruht, werden Unterschiede in der LLO-Aktivität sichtbar (siehe Wachstumskurven des WT in LB-Medium mit und ohne zusätzliche Kohlenstoffquellen Abb. 5.18 und Abb. 5.19). Die Messung der hämolytischen Aktivität in dieser Wachstumsphase (OD_{600nm} von 1.0) zeigt für die PTS-unabhängige Verwertung von $G6P^{XAD}$ eine gesteigerte LLO-Aktivität, die mindestens 2fach höher ist als im Glukose-gewachsenen (G^{XAD}) WT (siehe Abb. 5.24). Auch XAD hat in der spät-logarithmischen Wachstumsphase einen stimulierenden Effekt auf die hämolytische Aktivität im WT (Vergleich G mit G^{XAD}).

Zur Western Blot-Analyse wurde die zytoplasmatische Proteinfraction isoliert (siehe 4.3.2), die Proteinkonzentration über Bradford bestimmt (siehe 4.3.3) und gleiche Mengen an zytoplasmatischen Proteinen mittels SDS-PAGE aufgetrennt (siehe 4.3.4). Nach dem Transfer auf eine Nitrozellulosemembran erfolgte die Detektion von PrfA und ActA mit polyklonalem anti-PrfA- und anti-ActA-Kaninchenserum (siehe 4.3.8). Der in $G6P^{XAD}$ -haltigem LB-Medium gewachsene WT weist eine größere Menge an PrfA-Protein auf, als der in Glukose mit XAD (G^{XAD}) (siehe Abb. 5.25). In der ActA-Expression ist jedoch kein signifikanter Unterschied in der Intensität zwischen G^{XAD} und $G6P^{XAD}$ zu erkennen. Bei den zahlreichen Banden, die durch das polyklonale anti-ActA-Kaninchenserum erkannt werden, handelt es sich um Abbauprodukte des ActA-Proteins. Auffällig ist, dass sich das ActA-Abbaumuster, je nachdem welche Kohlenstoffquelle verwendet wurde, stark unterscheidet. LB-Medium mit Glukose ohne XAD-Zusatz (5 %) hemmt die PrfA-regulierte Virulenzgenexpression. Der WT zeigt unter diesen Wachstumsbedingungen kaum eine LLO-Aktivität im Hämolyse-Assay sowie PrfA- bzw ActA-Expression in der Western Blot-Analyse (siehe Abb. 5.24 und Abb. 5.25).

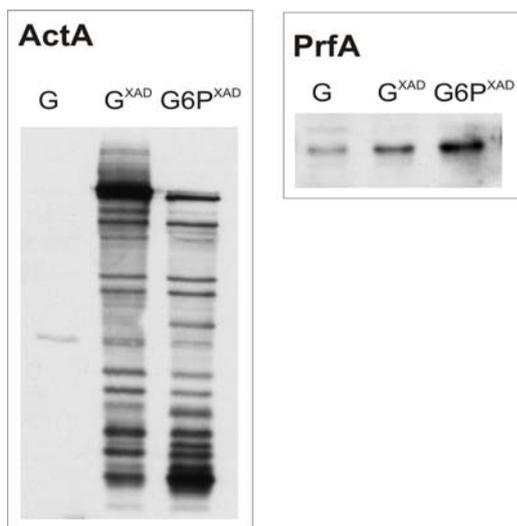


Abb. 5.25: Nachweis von PrfA und ActA im Western Blot. Der Wildtyp wurde in LB-Medium mit 5 % XAD und entweder mit 50 mM Glukose-6-Phosphat (G6P) oder Glukose (G) bis zu einer OD_{600nm} von 1.0 angezogen; 5 μ g zytoplasmatische Proteine wurden pro Spur auf ein 12 %iges SDS-PAGE-Gel geladen und immungefärbt.

Eine weitere Methode zur Stimulierung der UhpT-Expression und somit die Voraussetzung zum effizienten Wachstum von *L. monocytogenes* in $G6P$ -haltigem Medium, ist die Vorzucht der Bakterien in Glycerin-haltigem MM. Dementsprechend wurde der Wildtyp (WT) in MM mit 50 mM Glycerin bis zu einer optischen Dichte von OD_{600nm} 0.5 kultiviert und in gleichem Volumen MM supplementiert mit 50 mM Glukose (G) oder 50 mM Glukose-6-Phosphat ($G6P$) überführt (siehe 4.2.3). Das Wachstum erfolgte bei 37°C. Bei einer OD_{600nm} von 1.0 wurden zum einen zytoplasmatische Proteine zur Durchführung von Western Blot-Analysen isoliert und zum anderen Kulturüberstände zur Bestimmung der LLO-Aktivität entnommen.

Mit Hilfe des Hämolyse-Assays kann die Aktivität des Listeriolysins LLO, kodiert vom PrfA-abhängigen *hly*-Gen, im WT in Glukose- und $G6P$ -haltigem MM bestimmt werden.

Dazu wurden, um einen direkten Vergleich mit dem in LB-Medium durchgeführten Hämolyse-Assay (siehe Abb. 5.24) machen zu können, ebenfalls 50 µl Kulturüberstand in 1 ml Erythrozyten-Suspension eingesetzt (siehe 4.3.9). Zusätzlich wurde die hämolytische Aktivität des WT nach der Vorzucht in Glycerin-haltigem MM bestimmt, um so Rückschlüsse auf die PrfA-Aktivität machen zu können. Eine verstärkte PrfA-Aktivität ist für ein Wachstum von *L. monocytogenes* mit G6P erforderlich.

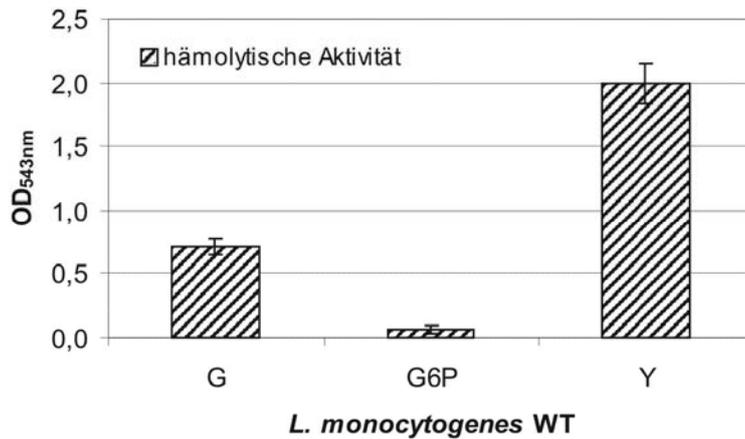


Abb. 5.26: Hämolytische Aktivität des Wildtyps, gewachsen in definiertem Minimalmedium mit Glukose (G), Glukose-6-Phosphat (G6P) und Glycerin (Y). Der Wildtyp (WT) wurde zuerst in Minimalmedium (MM) mit 50 mM Glycerin (Y) bis zu einer OD_{600nm} von 0.5 angezogen (ebenfalls Messung der hämolytischen Aktivität), pelletiert und dann in MM mit Glukose-6-Phosphat (G6P) bzw. Glukose (G) überführt. Dann wurde der WT in MM mit 50 mM Glukose (G) und 50 mM Glukose-6-Phosphat (G6P) bis zu einer OD_{600nm} von 1.0 angezogen und Kulturüberstand abgenommen; 50 µl Kulturüberstand wurden eingesetzt und die hämolytische Aktivität bei OD_{543nm} gemessen.

Wie in Abb. 5.26 zu erkennen, zeigt der WT in definiertem MM, supplementiert mit 50 mM G6P, eine geringe hämolytische Aktivität. Die LLO-Aktivität des WT, gewachsen in G6P-haltigem MM, ist sogar geringer als die im Glukose-gewachsenen Vergleichsstamm. Dieses Ergebnis steht im Widerspruch mit der in Abb. 5.24 dargestellten erhöhten hämolytischen Aktivität im WT nach G6P-Verwertung. Mögliche pH-Wert-Unterschiede in Glukose- oder G6P-haltigem MM, die Einfluss auf die hämolytische Aktivität haben könnten, konnten ausgeschlossen werden, da sich der pH-Wert bei OD_{600nm} von 1.0 (Probenentnahme) nicht unterschieden hat. Wie in Abb. 5.26 gezeigt, führt die Vorzucht des WT in Glycerin-haltigem MM und dessen Verwertung, wie erwartet, zu einer gesteigerten LLO-Aktivität.

Zur Durchführung von Western Blot-Analysen wurde bei einer optischen Dichte von OD_{600nm} 1.0 die zytoplasmatische Proteinfraction isoliert (siehe 4.3.2). Gleiche Mengen an Protein wurden auf ein SDS-PAGE-Gel geladen, elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran übertragen und mit polyklonalem anti-ActA- und anti-PrfA-Kaninchenserum immungefärbt (siehe 4.3.4 und 4.3.8). Wie in Abb. 5.27 zu erkennen ist, zeigt der WT nach dem Wachstum in G6P-haltigem MM eine stärkere PrfA-Expression, jedoch nur geringfügig mehr ActA-Protein als in Glukose-haltigem Medium. Bei den

zahlreichen Banden, die durch das polyklonale anti-ActA-Kaninchenserum erkannt werden, handelt es sich um Abbauprodukte des ActA-Proteins (siehe auch 5.1.3).

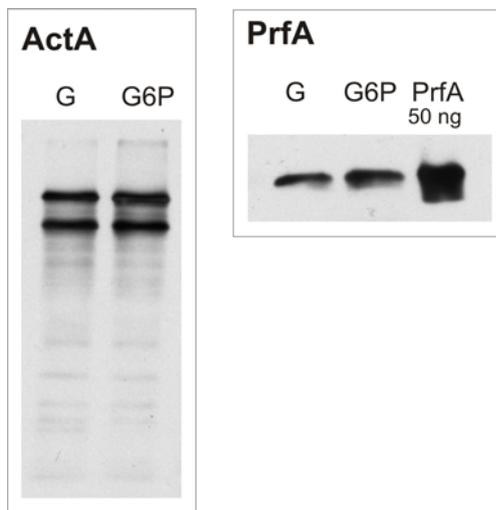


Abb. 5.27: Nachweis von PrfA und ActA im Western Blot. Der Wildtyp (WT) wurde zuerst in Minimalmedium (MM) mit 50 mM Glycerin bis zu einer OD_{600nm} von 0.5 angezogen, pelletiert und dann in MM mit Glukose-6-Phosphat (G6P) bzw. Glukose (G) überführt. Dann wurde der WT in MM mit 50 mM Glukose (G) und 50 mM Glukose-6-Phosphat (G6P) bis zu OD_{600nm} von 1.0 angezogen und zytoplasmatische Proteine isoliert; 5 μ g zytoplasmatische Proteine wurden pro Spur auf ein 12 %iges SDS-PAGE-Gel geladen und mit Kaninchen-anti-PrfA und -anti-ActA immungefärbt. Zur Kontrolle wurde 50 ng gereinigtes PrfA aufgetragen.

Die Verwertung von Cellobiose und anderen unphosphorylierten PTS-Zuckern, wie z.B. Glukose, führt in verschieden starkem Maße zu einer Inhibierung der PrfA-abhängigen Virulenzgenexpression (siehe Abb. 5.21). Dieses Phänomen wurde auch schon von zahlreichen anderen Arbeitsgruppen beschrieben (Park & Kroll, 1993, Milenbachs *et al.*, 1997, Gilbreth *et al.*, 2004). Im Gegensatz dazu zeigt die Verwertung von Glycerin, einer PTS-unabhängigen Kohlenstoffquelle, eine gesteigerte PrfA-regulierte Virulenzgenexpression (siehe Abb. 5.21 - Abb. 5.23). Für die G6P-Verwertung in LB-Medium (XAD-Zugabe erforderlich) oder in definiertem MM (Vorzucht in Glycerin-haltigem MM erforderlich) kann eine leicht erhöhte PrfA-abhängige Virulenzgenexpression in *L. monocytogenes* nachgewiesen werden. Die Expressions-Daten sind jedoch nicht immer eindeutig und in Bezug auf die LLO-Aktivität widersprüchlich.

5.2.3 HPr-Phosphorylierungszustände in Minimalmedium mit Glukose, Cellobiose, Glycerin und Glukose-6-Phosphat als Kohlenstoffquelle

Um die Frage beantworten zu können, ob eine Korrelation zwischen PrfA-Aktivität und der Menge an HPr, His15- oder Ser46-phosphoryliertem HPr besteht, wurden die HPr-Phosphorylierungszustände in definiertem Minimalmedium (MM), supplementiert mit Glukose, Cellobiose oder Glycerin, untersucht. Dazu wurde der Wildtyp (WT) EDG-e in MM mit 50 mM Glukose, 50 mM Cellobiose bzw. 50 mM Glycerin bei 37°C angezogen. Zu verschiedenen Wachstumsphasen OD_{600nm} von 0.4, 0.6, 1.0 und 1.5, in denen auch die PrfA-abhängige Virulenzgenexpression untersucht wurde (siehe Abb. 5.21 und Abb. 5.22), ist die zytoplasmatische Proteinfraction worden (siehe 4.3.2). Gleiche Mengen an zellulären Proteinen wurden auf ein 15 % natives Acrylamidgel geladen und zur Bestimmung des HPr-Phosphorylierungsmusters mit polyklonalem anti-HPr-Kaninchenserum immungefärbt (siehe 4.3.6 und 4.3.8).

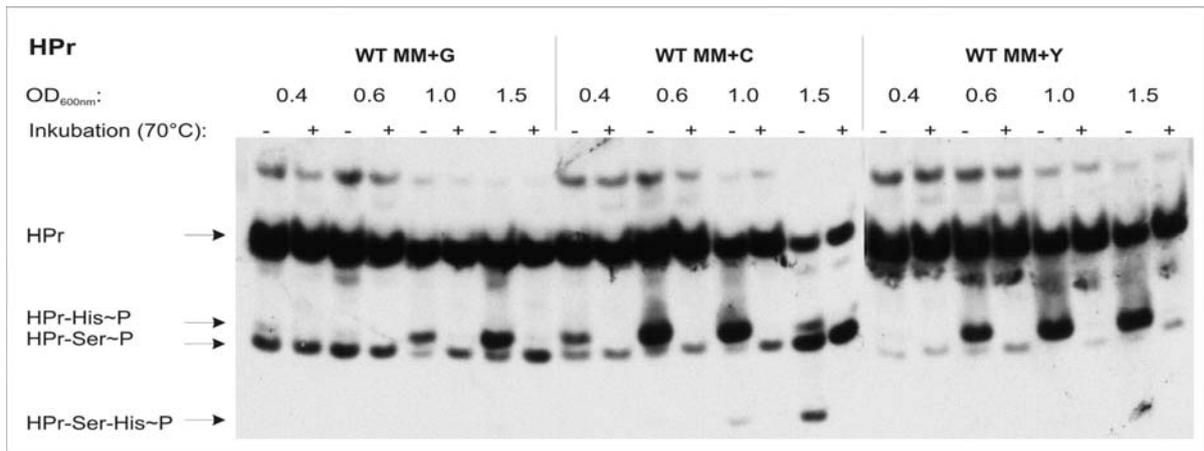


Abb. 5.28 : Western Blot-Analyse zur Bestimmung der HPr-Phosphorylierung im Wildtyp EGD-e in Minimalmedium mit verschiedenen Kohlenstoffquellen. Der WT wurde in definiertem Minimalmedium (MM) mit 50 mM Glukose (G), 50 mM Cellobiose (C) und 50 mM Glycerin (Y) angezogen. Bei einer OD_{600nm} von 0.4, 0.6, 1.0 und 1.5 wurden zelluläre Proteine isoliert. 5 µg zelluläre Proteine wurden unbehandelt (-) oder 10 min bei 70°C hitzebehandelt (+) pro Spur auf ein 15 %iges natives Acrylamidgel geladen und mit Kaninchen-anti-HPr immungefärbt.

In Abb. 5.28 werden die verschiedenen HPr-Phosphorylierungszustände (HPr, HPr-Ser46~P, HPr-His15~P und HPr-Ser46-His15~P) zu unterschiedlichen Wachstumsphasen in *L. monocytogenes*, gewachsen in MM mit Glukose, Cellobiose und Glycerin, dargestellt (siehe auch HPr-Phosphorylierung in den *::ccpA*- und *::hprK*-Insertionsmutanten Abb. 5.6). Eine zusätzliche Hitzebehandlung jeder Probe bei 70°C (siehe Abb. 5.28 die mit + gekennzeichneten Spuren), führt zur Zerstörung der hitzelabilen His15-Phosphorylierung des HPr-Proteins und ermöglicht so eine Zuordnung der HPr-His15~P-Bande im Western Blot.

In MM mit Glukose ist in der früh-logarithmischen Wachstumsphase (OD_{600nm} von 0.4 und 0.6), in der ein aktiver PTS-abhängiger GlukoseTransport in die Bakterienzelle erfolgt, der Level an HPr-His15~P gering, der von HPr-Ser46~P jedoch hoch. Dagegen steigt der Level an HPr-His15~P in der spät-logarithmischen und früh-stationären Phase (OD_{600nm} von 1.0 und 1.5) stark an, während der von HPr-Ser46~P sinkt. Während des aktiven Wachstums (OD_{600nm} 0.6 und 1.0) in MM mit Glycerin kann, wie mit Cellobiose, ein hoher Level an HPr-His15~P detektiert werden. Die Menge an Ser46-phosphoryliertem HPr ist in diesen Wachstumsphasen in Glycerin- bzw. Cellobiose-haltigem MM gering. In der spät-logarithmischen bis früh-stationären Wachstumsphase kann bei der Cellobiose-Verwertung sogar eine Doppelphosphorylierung des HPr (HPr-Ser46-His15~P) detektiert werden, die auch schon in *Streptococcus salvarius* beschrieben wurde (Casabon *et al.*, 2006).

Obwohl sich die PrfA-abhängige Virulenzgenexpression in Glycerin- und Cellobiose-haltigem MM gegenläufig verhält (siehe Abb. 5.21 und Abb. 5.22), ist das HPr-Phosphorylierungsmuster bei der Glycerin- bzw. Cellobiose-Verwertung sehr ähnlich und durch eine starke HPr-His15-Phosphorylierung gekennzeichnet.

Zur Bestimmung der HPr-Phosphorylierungszustände in Glukose-6-Phosphat (G6P)-haltigem Medium wurde der Wildtyp (WT) zum einen in LB-Medium mit 5 % XAD und zum anderen in definiertem MM, mit einer Vorzucht in Glycerin-haltigem MM, bei 37°C angezogen (siehe dazu 4.2.2 und 4.2.3). Bei einer optischen Dichte von OD_{600nm} 1.0 wurde die zytoplasmatische Proteinfraction isoliert und die Proteinkonzentration mittels Bradford bestimmt (siehe 4.3.3). Gleiche Mengen an Proteinen wurden zur Bestimmung des HPr-Phosphorylierungsmusters auf ein 15 %iges natives Acrylamidgel geladen, aufgetrennt und nach dem Transfer auf eine Nitrozellulosemembran mit polyklonalem anti-HPr-Kaninchenserum immungefärbt (siehe 4.3.6 und 4.3.8). In Abb. 5.29 werden die verschiedenen HPr-Phosphorylierungszustände (HPr, HPr-Ser46~P und HPr-His15~P) von *L. monocytogenes* WT und, gewachsen in LB-Medium mit G6P oder Glukose mit und ohne XAD, gezeigt. Zur Kontrolle wurde der HPr-Phosphorylierungszustand in der $\Delta uhpT$ -Mutante bestimmt. In Abb. 5.30 wird das HPr-Phosphorylierungsmuster von *L. monocytogenes* WT, gewachsen in definiertem MM mit G6P und Glukose, dargestellt.

Wie in Abb. 5.29 und Abb. 5.30 eindeutig zu erkennen ist, wird unabhängig von der Methode, mit der ein effizientes Wachstum von *L. monocytogenes* in G6P-haltigem Medium erzielt wurde (XAD-Zugabe oder Vorzucht in Glycerin-haltigem MM), kein HPr-Ser46~P bei der G6P-Verwertung gebildet. Vergleicht man das HPr-Phosphorylierungsmuster vom WT, gewachsen in Glukose-haltigem LB-Medium mit und ohne XAD-Zugabe, so scheint XAD keinen Einfluss auf die HPr-Phosphorylierung durch Enzym I oder die HPr-Kinase zu haben.

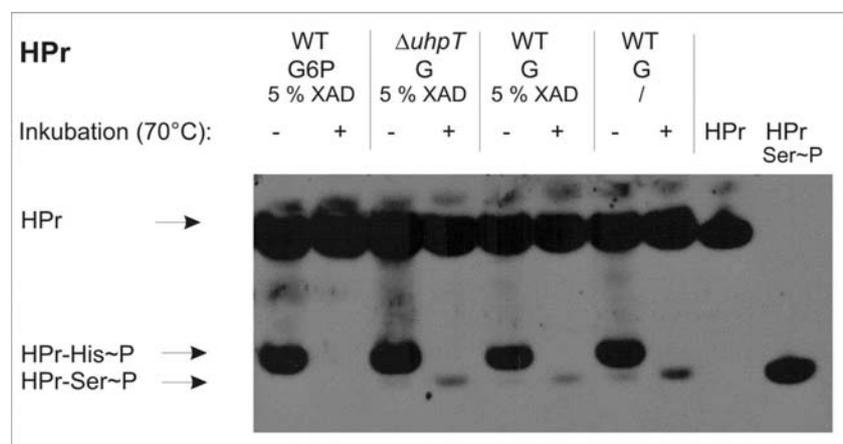


Abb. 5.29: Western Blot-Analyse zur Bestimmung der HPr-Phosphorylierung im Wildtyp EGD-e und in der $\Delta uhpT$ -Mutante in LB-Medium mit Glukose-6-Phosphat (G6P) und Glukose (G) mit und ohne XAD bei OD_{600nm} von 1.0. Der WT wurde in LB-Medium mit 50 mM Glukose (G) mit 5 % XAD, 50 mM Glukose-6-Phosphat (G6P) mit 5 % XAD und 50 mM Glukose (G) angezogen. Die $\Delta uhpT$ -Mutante wurde zur Kontrolle in LB-Medium mit 50 mM Glukose und 5 % XAD angezüchtet. Bei einer OD_{600nm} von 1.0 wurden zelluläre Proteine isoliert. 5 μ g zelluläre Proteine wurden unbehandelt (-) oder 10 min bei 70°C hitzebehandelt (+) pro Spur auf ein 15 %iges natives Acrylamidgel geladen und immungefärbt. Zur Kontrolle wurden je 50 ng gereinigtes HPr und HPr-Ser46~P aufgetragen.

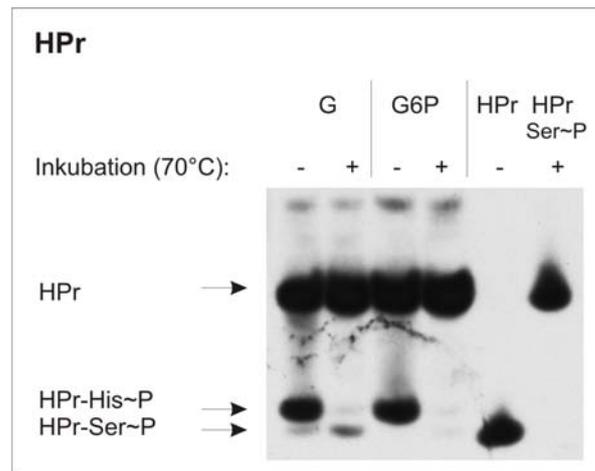


Abb. 5.30: Western Blot-Analyse zur Bestimmung der HPr-Phosphorylierung im Wildtyp EGD-e in definiertem Minimalmedium mit Glukose-6-Phosphat (G6P) und Glukose (G) bei OD_{600nm} von 1.0. Die Stämme wurden zuerst in Minimalmedium (MM) mit 50 mM Glycerin bis zu OD_{600nm} von 0.5 angezogen und dann in MM mit Glukose-6-Phosphat (G6P) bzw. Glukose (G) überführt. Dann wurde der WT in MM mit 50 mM Glukose (G) und 50 mM Glukose-6-Phosphat (G6P) angezogen. Bei OD_{600nm} von 1.0 wurden zelluläre Proteine isoliert. 5 µg zelluläre Proteine wurden unbehandelt (-) oder 10 min bei 70°C hitzebehandelt (+) pro Spur auf ein 15%iges natives Acrylamidgel geladen und immungefärbt. Zur Kontrolle wurden je 50 ng gereinigtes HPr und HPr-Ser46~P aufgetragen.

5.2.4 Herstellung der *uhpT*-Deletionsmutante ($\Delta uhpT$)

Die Herstellung der $\Delta uhpT$ erfolgt durch homologe Rekombination mit Hilfe eines Derivates des temperatur-sensitiven Mutageneseplasmids pLSV101 (siehe 4.1.10).

Die stromauf und -abwärts von *uhpT* gelegenen Genregionen wurden aus *L. monocytogenes* mit folgenden Oligonukleotidpaaren amplifiziert: Deletionsfragment D1 mit *uhpT*-2/*uhpT*-3 (566 bp) und Deletionsfragment D2 mit *uhpT*-4/*uhpT*-5 (562 bp). Das Deletionsfragment D1 wurde mit BamHI sowie Cfr9I und das Deletionsfragment D2 mit EcoRI und Cfr9I geschnitten. Die verdauten Deletionsfragmente D1 und D2 wurden über die Schnittstelle des Restriktionsenzym Cfr9I ligiert und in den mit EcoRI und BamHI verdauten pLSV101 kloniert (siehe 4.1.6 und 4.1.7). Der so entstandene Vektor pLSV101-*uhpT* wurde in kompetente *E. coli* Dh5a transformiert und mit Vektor-spezifischen Oligonukleotiden (pLSV101EcoRI und pLSV101BamHI) in der PCR überprüft (siehe 4.1.5 und 4.1.8). Aus den positiven Klonen wurde die Plasmid-DNA isoliert, mittels Sequenzierung überprüft und in kompetente Listerien elektroporiert (siehe 4.1.1 und 4.1.9). Durch zwei aufeinander folgende homologe Rekombinationsereignisse konnte es zur Generierung der $\Delta uhpT$ -Mutante kommen. Zum Nachweis der Deletion wurde in der PCR die Oligonukleotidkombination *uhpT*-7/*uhpT*-10 gewählt, die an den flankierenden Bereichen des zu deletierenden *uhpT*-Gens binden. Die Oligonukleotidkombination sollte in einer *uhpT*-Deletionsmutante ein PCR-Produkt von 1333 bp und in der wildtypischen Revertante ein Produkt von 2689 bp zeigen.

Die PCR-Produkte wurden sequenziert. Die *uhpT*-Deletion wurde zusätzlich in die Δ *glpD/dhaK*-Mutante (Δ *glpD*/0347-48/2695-96) eingeführt (siehe 5.2.4).

Die hergestellten Mutanten Δ *uhpT* und Δ *uhpT*/*glpD/dhaK* wurden auf ihre Fähigkeit, mit Glukose-6-Phosphat (G6P) als einziger Kohlenstoffquelle zu wachsen, hin untersucht. Dazu wurden der Wildtyp (WT), die Δ *uhpT*- und Δ *uhpT*/*glpD/dhaK*-Mutante in G6P-haltigem LB-Medium mit 5 % XAD bei 37°C kultiviert (siehe 4.2.2). Zur Kontrolle wurden die Stämme (WT, Δ *uhpT*, Δ *uhpT*/*glpD/dhaK*) parallel in Glukose-haltigem LB-Medium mit 5 % XAD angezogen (siehe Abb. 5.31).

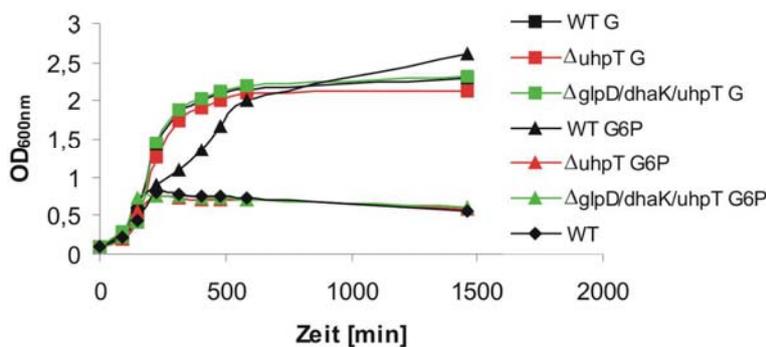


Abb. 5.31: Wachstumskurven von Wildtyp (WT) EGD-e, Δ uhpT und Δ uhpT/*glpD*/0347-48/2695-96 in LB-Medium mit 5 % XAD und 50 mM Glukose-6-Phosphat (G6P) bzw. Glukose (G). Das Wachstum wurde bei 37°C untersucht.

In Abb. 5.31 kann wie erwartet gezeigt werden, dass die Δ *uhpT*- und Δ *uhpT*/*glpD/dhaK*-Mutanten im Vergleich zum WT zu keinem Wachstum in LB-Medium mit 5 % XAD und 50 mM G6P in der Lage sind. In Glukose-haltigem LB-Medium ist kein Unterschied zwischen WT und *uhpT*-Deletionsmutanten (Δ *uhpT*, Δ *uhpT*/*glpD/dhaK*) zu erkennen.

5.2.5 Gesamtgenom-Transkriptom-Analyse von *L. monocytogenes* EGD-e, gewachsen in LB-Medium mit Glukose-6-Phosphat

Die Verwertung von Glukose-6-Phosphat (G6P) von *L. monocytogenes* zeigt im Vergleich zur Glukose-Verwertung im HPr-Phosphorylierungsmuster kein HPr-Ser46~P (siehe Abb. 5.29 und Abb. 5.30). HPr-Ser46~P spielt bei der Kohlenstoff-Katabolitrepression (KKR) in Gram-positiven Bakterien eine wichtige Rolle und dient als Korepressor von CcpA (catabolite control protein A). Die CcpA/HPr-Ser46~P-Komplexbildung ermöglicht die Bindung an eine spezifische DNA-Konsensussequenz (*cre*-Box) im Promotorbereich zahlreicher katabolitregulierter Gene und reguliert deren Transkription (Henkin, 1996, Moreno *et al.*, 2001).

Gesamtgenom-Transkriptom-Analysen des WT, gewachsen in LB-Medium mit 50 mM G6P und 5 % XAD (G6P^{XAD}) im Vergleich zum WT, gewachsen in LB-Medium mit 50 mM Glukose und 5 % XAD (G^{XAD}), sollten Aufschluss über den Status der KKR unter diesen Wachstumsbedingungen geben. Zur Untersuchung des XAD-Effekts auf das

Transkriptionsprofil wurden ebenfalls Gesamtgenom-Microarray-Analysen des WT, gewachsen in LB-Medium mit 50 mM Glukose und 5 % XAD (G^{XAD}) im Vergleich zum WT, gewachsen in LB-Medium mit 50 mM Glukose ohne XAD (G) durchgeführt. Für alle Versuchsansätze ($G6P^{XAD}$, G^{XAD} und G) wurde der WT bei 37°C bis zu einer OD_{600nm} von 1.0 kultiviert und RNA isoliert (siehe 4.1.13). Jeweils gleiche Mengen der zu vergleichenden RNA-Proben (40 μ g) wurden durch die reverse Transkription mit Fluoreszenz-markierten dCTPs (Cy3-dCTP und Cy5-dCTP; GE Healthcare) in markierte cDNA umgeschrieben. Die beiden unterschiedlich markierten cDNA-Proben wurden vereint und auf dem Microarray hybridisiert. Das Scannen und die Auswertung der Microarrays erfolgte mit dem ScanArray HT Scanner und der ScanArray Express Software (Perkin Elmer) (siehe 4.4).

Die Intensität der Genexpression wird in allen Tabellen Tab. 5.3, Tab. 5.4 und Tab. 8.4– Tab. 8.7 im Anhang als Quotient $G6P^{XAD}/G^{XAD}$ und G^{XAD}/G dargestellt, der sich aus dem normalisierten Hybridisierungssignal für den Wildtyp (WT) unter den verschiedenen Wachstumsbedingungen – $G6P^{XAD}$, G^{XAD} und G - ergibt. Dabei handelt es sich um Durchschnittswerte aus vier Microarray-Analysen zweier unabhängiger Experimente. Die Ausschlussgrenze wurde bei $\geq 2,0$ und $\leq 0,5$ gesetzt. Demzufolge liegt bei Werten $\leq 0,5$ eine signifikante Herunterregulation und analog dazu eine Hochregulation bei Werten $\geq 2,0$ in LB-Medium mit $G6P^{XAD}$ bzw. G^{XAD} vor.

In Tab. Tab. 8.4 – Tab. 8.7 (siehe Anhang) befinden sich alle Gene, deren Transkription im WT durch die $G6P^{XAD}$ - bzw. G^{XAD} -Verwertung in LB-Medium differentiell reguliert werden. Ausgewählte Gene werden im Ergebnisteil in Tab. 5.3 und Tab. 5.4 aufgelistet.

In Tab. 5.3 wird die Transkriptionsintensität des WT für die PrfA-regulierten Virulenzgene *prfA*, *plcA*, *hly*, *actA*, *mpl*, *plcB*, *inlA*, *inlB*, *uhpT* und *inlC* in $G6P^{XAD}$ - und G^{XAD} -haltigem LB-Medium gezeigt.

Gene	$G6P^{XAD} / G^{XAD}$	G^{XAD} / G	Funktion
<i>prfA</i>	nr	14,29	Positiver Regulationsfaktor A
<i>plcA</i>	4,77	45,04	Phosphatidylinositol-spez. Phospholipase C (PI-PLC)
<i>hly</i>	6,21	98,85	Listeriolysin O
<i>actA</i>	2,22	116,27	ActA
<i>mpl</i>	nr	51,03	Metalloprotease
<i>plcB</i>	2,67	270,93	Phospholipase C (PC-PLC)
<i>inlA</i>	nr	21,98	Internalin A
<i>inlB</i>	0,40	19,87	Internalin B
<i>uhpT</i>	2,37	51,78	Hexose-Phosphat-Transporter
<i>inlC</i>	3,85	54,97	Internalin C

Tab. 5.3: Tabellarische Auflistung der durch $G6P^{XAD}$ und G^{XAD} regulierten Virulenzgene. Die Intensität der Genexpression wird als Quotient ($G6P^{XAD}/G^{XAD}$; G^{XAD}/G) dargestellt, der sich aus dem normalisierten Hybridisierungssignal für den Wildtyp unter den verschiedenen Wachstumsbedingungen ergibt; nr = nicht reguliert, d.h. Quotient $\geq 0,55$ und $\leq 1,8$.

Die XAD-Zugabe im Wachstumsmedium zeigt erwartungsgemäß eine gesteigerte PrfA-abhängige Transkription der Virulenzgene. Die in Tab. 5.3 aufgeführten Virulenzgene - *prfA*, *plcA*, *hly*, *actA*, *mpl*, *plcB*, *inlA*, *inlB*, *uhpT* und *inlC* – werden alle in Glukose-haltigem

LB-Medium mit XAD (G^{XAD}) stärker transkribiert als in Glukose-haltigem LB-Medium (G) ohne XAD.

Im WT führt die Verwertung von $G6P^{XAD}$ im Vergleich zu der von G^{XAD} zu einer weiteren Transkriptionssteigerung von *plcA*, *hly*, *actA*, *plcB*, *uhpT* und *inlC*. Diese verstärkte PrfA-abhängige Virulenzgenexpression scheint demzufolge durch die $G6P$ -Verwertung unabhängig von der XAD-Zugabe zu erfolgen. Die PrfA-abhängigen Virulenzgene *mpl*, *inlA* und das *prfA*-Gen selber werden in ihrer Transkription jedoch durch die $G6P^{XAD}$ -Verwertung im Vergleich zu G^{XAD} nicht differenziell reguliert. Das *inlB*-Gen scheint in $G6P^{XAD}$ -haltigem LB-Medium herunterreguliert zu werden.

Tab. 5.4 zeigt einen Ausschnitt von Genen, die sowohl in $G6P^{XAD}$ als auch in den Kohlenstoff-Katabolitrepressions (KKR)-Mutanten *::ccpA* und *::hprK* differentiell reguliert werden ((A) = hochreguliert, (B) = runterreguliert).

(A)

Gene	$G6P^{XAD} / G^{XAD}$	G^{XAD} / G	Funktion
qoxB _b	2,39	nr	AA3-600 quinol oxidase subunit I
lmo0105 _b	18,34	nr	Unknown, highly similar to chitinase B
lmo0130 _b	49,84	nr	Unknown, similar to 5-nucleotidase, putative peptidoglycan bound protein (LPXTG motif)
lmo0299 _a	9,46	nr	Unknown, similar to PTS beta-glucoside-specific enzyme IIB component
lmo0384 _{ab}	11,21	nr	Unknown, similar to B. subtilis IolB protei
lmo0427 _{ab}	2,12	nr	Unknown, similar to PTS fructose-specific enzyme IIB component
lmo0428 _{ab}	2,63	nr	Unknown, similar to PTS fructose-specific enzyme IIC component
lmo0429 _{ab}	2,34	nr	Unknown, similar to sugar hydrolase
lmo0502 _{ab}	4,59	nr	Unknown, similar to putative sugar-phosphate isomerase
lmo0521 _a	5,48	nr	Unknown, similar to 6-phospho-beta-glucosidase
lmo0536 _b	6,50	nr	Unknown, similar to 6-phospho-beta-glucosidase
lmo0640 _{ab}	7,72	nr	Unknown, similar to oxidoreductase
lmo0782 _b	3,25	nr	Unknown, similar to mannose-specific phosphotransferase system (PTS) component IIC
lmo0915 _b	10,93	nr	Unknown, similar to phosphotransferase system enzyme IIC
<i>glpD</i> _{ab}	7,22	nr	Unknown, similar to glycerol 3 phosphate dehydrogenase
lmo1349 _{ab}	44,72	nr	Unknown, similar to glycine dehydrogenase (decarboxylating) subunit 1
lmo1350 _{ab}	40,90	nr	Unknown, similar to glycine dehydrogenase (decarboxylating) subunit 2
lmo1538 _{ab}	23,21	nr	Unknown, similar to glycerol kinase
lmo1883 _{ab}	25,09	nr	Unknown, similar to chitinases
lmo1999 _b	5,78	nr	Unknown, weakly similar to glucosamine-fructose-6-phosphate aminotransferase
lmo2125 _b	203,77	nr	Unknown, similar to maltose/maltodextrin ABC-transporter (binding protein)
lmo2159 _b	3,39	nr	Unknown, similar to oxidoreductase
lmo2584 _{ab}	120,90	nr	Unknown, similar to formate dehydrogenase associated protein
lmo2586 _{ab}	155,66	nr	Unknown, similar to B. subtilis YrhD protein
lmo2651 _{ab}	5,42	nr	Unknown, similar to mannitol-specific PTS enzyme IIA component
lmo2659 _a	12,82	nr	Unknown, similar to ribulose-phosphate 3-epimerase
lmo2660 _a	14,92	nr	Unknown, similar to transketolase
lmo2663 _a	133,48	nr	Unknown, similar to polyol dehydrogenase
lmo2664 _a	184,22	nr	Unknown, similar to sorbitol dehydrogenase
lmo2665 _a	67,21	nr	Unknown, similar to PTS system galactitol-specific enzyme IIC component
lmo2666 _{ab}	78,38	nr	Unknown, similar to PTS system galactitol-specific enzyme IIB component
lmo2667 _a	49,40	nr	Unknown, similar to PTS system galactitol-specific enzyme IIA component
lmo2685 _b	36,60	nr	Unknown, similar to cellobiose phosphotransferase enzyme IIA component
lmo2695 _b	8,69	nr	Unknown, similar to dihydroxyacetone kinase
lmo2696 _b	8,30	nr	Unknown, similar to hypothetical dihydroxyacetone kinase
lmo2764 _{ab}	9,20	nr	Unknown, similar to xylose operon regulatory protein and to glucose kinase
lmo2797 _b	3,22	nr	Unknown, similar to phosphotransferase system mannitol-specific enzyme IIA
lmo2798 _b	7,76	nr	Unknown, similar to phosphatase

(B)

Gene	G6P ^{XAD} / G ^{XAD}	G ^{XAD} / G	Funktion
lmo0519 _b	0,30	nr	Unknown, similar to multidrug resistance protein
lmo0912 _a	0,22	nr	Unknown, similar to transporters (formate)
lmo2192 _b	0,47	nr	Unknown, similar to oligopeptide ABC transporter (ATP-binding protein)
lmo2193 _b	0,41	nr	Unknown, similar to oligopeptide ABC transporter (ATP-binding protein)
lmo2194 _b	0,49	nr	Unknown, similar to oligopeptide ABC transporter (permease)

Tab. 5.4: Tabellarische Auflistung einer Auswahl an Genen, die durch G6P^{XAD} und G^{XAD} hoch- (A) bzw. herunterreguliert (B) werden. Die Intensität der Genexpression wird als Quotient (G6P^{XAD}/G^{XAD}; G^{XAD}/G) dargestellt, der sich aus dem normalisierten Hybridisierungssignal für den Wildtyp unter den verschiedenen Wachstumsbedingungen ergibt; nr = nicht differenziell reguliert, d.h. Quotient $\geq 0,55$ und $\leq 1,8$; _a = ist ebenfalls in der *::ccpA*-Mutante reguliert; _b = ist ebenfalls in der *::hprK*-Mutante reguliert

Wie in Tab. 5.4 ersichtlich ist, befinden sich unter den Genen, die in G6P^{XAD}-haltigem LB-Medium hochreguliert werden, zahlreiche Phosphoenolpyruvat-Phosphotransferase-Systeme (PTS), die ebenfalls in den KKR-Mutanten *::ccpA* (a) und *::hprK* (b) verstärkt exprimiert wurden. Auch Gene des Pentosephosphatweges (lmo502, lmo2659-60) und des Glycerin-Metabolismus (lmo1538, *glpD*, lmo2695-96), die normalerweise unter KKR stehen, zeigen in G6P^{XAD}-haltigem LB-Medium und ebenso in den KKR-Mutanten (a, b) eine erhöhte Transkription. Die in Tab. 5.4 aufgelisteten Gene werden im WT durch die G^{XAD}-Verwertung nicht differenziell reguliert (nr). Vergleicht man das Transkriptommuster G^{XAD}/G mit dem von G6P^{XAD}/G^{XAD}, so ist mit Ausnahme der Virulenzgene (*prfA*, *plcA*, *hly*, *actA*, *mpl*, *plcB*, *inlA*, *inlB*, *uhpT* und *inlC*) (siehe auch Tab. 5.3) und den Genen (durch X in den Tab. 8.6 und Tab. 8.7 im Anhang gekennzeichnet)- lmo0391, lmo0392, lmo0394, *iap*, *als*, lmo2360 und *kat* – keine weitere Schnittmenge zu erkennen.

Vergleicht man das gesamte Transkriptionsprofil des WT gewachsen in G6P^{XAD}-haltigem LB-Medium (siehe Tab. 8.6 und Tab. 8.7 im Anhang) mit dem des WT, gewachsen in Glycerin-haltigem Minimalmedium, (Joseph, 2008; submitted) so findet man eine relativ hohe Übereinstimmung mit 22,4 % bei den hochregulierten und 13,5 % bei den herunterregulierten Genen. Bei diesen Genen handelt es sich um die PrfA-abhängigen Virulenzgene, zahlreiche Phosphoenolpyruvat-Phosphotransferase-Systeme (für Fruktose, Mannose, β -Glukoside und Cellobiose) und ABC-Transporter sowie Gene, die in den Glycerin-Metabolismus (lmo0348, lmo1538-39, *glpD* und lmo2695-96) involviert sind. Gene, kodierend für den Pyruvat-Metabolismus (Pyruvat-Oxidase lmo0722, Pyruvat-Format-Lyase *pflA* und *pflB* und Laktat-Dehydrogenase *ldh*) zeigen im WT bei G6P^{XAD}-Verwertung im Gegensatz zur Glycerin-Verwertung in Minimalmedium eine verringerte Transkription.

Anhand des Genexpressionsmusters (siehe Tab. 5.4 sowie Tab. 8.6 und Tab. 8.7 im Anhang), wird deutlich, dass die Verwertung von G6P zu einer Aufhebung der KKR in *L. monocytogenes* führt.

5.3 Charakterisierung der Glukose-spezifischen Enzym IIA ($eIIA^{Glc}$)-Deletionsmutante in *L. monocytogenes*

Die Charakterisierung der HPr-Phosphorylierungszustände im Wildtyp nach Verwertung unterschiedlicher Kohlenstoffquellen (Glukose, Cellobiose und Glycerin) (siehe Abb. 5.28), schliesst HPr-Ser46~P und HPr-His15~P als direkte Modulatoren der PrfA-Aktivität aus. Die Verwertung von Glycerin bzw. Cellobiose wirkt sich bezüglich der PrfA-abhängigen Virulenzgenexpression vollkommen gegenläufig aus (Glycerin-Verwertung stimuliert, die von Cellobiose hemmt die PrfA-Aktivität), während sich das HPr-Phosphorylierungsmuster sehr ähnlich verhält und bei einer optischen Dichte von OD_{600nm} von 0.6 und 1.0 durch eine geringe Menge an HPr-Ser46~P und eine große Menge an HPr-His15~P bestimmt wird (siehe Abb. 5.21 und Abb. 5.22).

Einige Daten sprechen dafür, dass ein Zusammenhang zwischen PTS-abhängiger Zuckeraufnahme und PrfA-Aktivität bzw. PrfA-abhängiger Virulenzgenexpression besteht. Ein aktiver PTS-abhängiger Glukose-Transport führt in *L. monocytogenes* zu einer geringen PrfA-abhängigen Virulenzgenexpression, wohingegen die Verwertung PTS-unabhängiger Kohlenstoffverbindungen wie Glycerin, Glukose-1- und Glukose-6-Phosphat eine gesteigerte PrfA-Aktivität zeigen. Diese und andere Daten sprechen dafür, dass Komponenten des Phosphoenolpyruvat-Phosphotransferase-Systems (PTS), wie z.B. EIIA oder EIIB, die am PTS-abhängigen Zuckertransport beteiligt sind, eine wichtige Rolle in der Modulation der PrfA-Aktivität spielen. Aus diesem Grund wurde eine Glukose-spezifische EIIA-Deletionsmutante ($\Delta eIIA^{Glc}$ -Mutante) im Rahmen dieser Arbeit hergestellt und auf ihre PrfA-abhängige Virulenzgenexpression und ihr Wachstumsverhalten in definiertem Minimalmedium (MM) mit verschiedenen Kohlenstoffquellen untersucht.

In *B. subtilis* kodiert das *ptsG*-Gen für ein Glukose-spezifisches PTS, bestehend aus den Komponenten EIIA, B und C (Gonzy-Treboul *et al.*, 1991). Solch ein Glukose-spezifisches PTS existiert in *L. monocytogenes* nicht. *In silico*-Analysen haben gezeigt, dass *L. monocytogenes* nur eine PtsG-spezifische EIIA-Komponente, kodiert von lmo1017, aufweist.

5.3.1 Herstellung der $eIIA^{Glc}$ -Deletionsmutante ($\Delta lmo1017$)

Die Herstellung der $\Delta 1017$ ($\Delta eIIA^{Glc}$) erfolgt durch homologe Rekombination mit Hilfe eines Derivates des temperatur-sensitiven Mutageneseplasmids pLSV101 (siehe 4.1.10).

Die stromauf und -abwärts von $eIIA^{Glc}$ gelegenen Genregionen wurden aus *L. monocytogenes* mit folgenden Oligonukleotidpaaren amplifiziert: Deletionsfragment D1 mit $eIIA$ -2/ $eIIA$ -3 (533 bp) und Deletionsfragment D2 mit $eIIA$ -4/ $eIIA$ -5 (535 bp). Das Deletionsfragment D1 wurde mit EcoRI sowie mit Cfr9I und das Deletionsfragment D2 mit BamHI und Cfr9I geschnitten. Die verdauten Deletionsfragmente D1 und D2 wurden über die Schnittstelle des Restriktionsenzym Cfr9I ligiert und in den mit EcoRI und BamHI verdauten pLSV101 kloniert (siehe 4.1.6 und 4.1.7). Der so entstandene Vektor pLSV101-1017 wurde in

kompetente *E. coli* Dh5 α transformiert und mit Vektor-spezifischen Oligonukleotiden (pLSV101EcoRI und pLSV101BamHI) in der PCR überprüft (siehe 4.1.8 und 4.1.5). Aus den positiven Klonen wurde die Plasmid-DNA isoliert, mittels Sequenzierung überprüft und in kompetente Listerien elektroporiert (siehe 4.1.1 und 4.1.9). Durch zwei aufeinander folgende homologe Rekombinationsereignisse konnte es zur Generierung der *eIIA*^{Glc}-Deletionsmutante kommen. Zum Nachweis der Deletion wurde in der PCR die Oligonukleotidkombination eIIA-1/eIIA-6 gewählt, die an den flankierenden Bereichen des zu deletierenden *eIIA*-Gens binden. Die Oligonukleotidkombination eIIA-1/eIIA-6 sollte in einer *eIIA*^{Glc}-Deletionsmutante ein PCR-Produkt von 1240 bp und in der wildtypischen Revertante ein Produkt von 1702 bp zeigen. Die *eIIA*^{Glc}-Deletion wurde mittels Sequenzierung überprüft.

Die *eIIA*^{Glc}-Deletionsmutante wurde zusätzlich im Western Blot auf die fehlenden EIIA^{Glc}-Expression untersucht (siehe Abb. 5.32). Hierzu wurden die *eIIA*^{Glc}-Deletionsmutante und der isogene Wildtyp (WT) in BHI-Vollmedium bis zu einer optischen Dichte von OD_{600nm} von 1.0 angezogen und die zytoplasmatische Proteinfraction isoliert (siehe 4.3.2). Gleiche Mengen an zellulären Proteinen wurden auf ein 12 %iges SDS-PAGE-Gel geladen, elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nitrozellulose übertragen und mit polyklonalem anti-EIIA^{Glc}-Kaninchenserum immungefärbt (siehe 4.3.4 und 4.3.8).

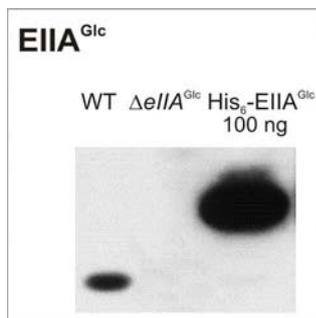


Abb. 5.32: Nachweis der *eIIA*^{Glc}-Expression im Western Blot. Der Wildtyp (WT) und die *eIIA*^{Glc}-Deletionsmutante ($\Delta eIIA$) wurden in BHI bei 37°C bis zu OD_{600nm} von 1.0 angezogen. Danach wurden die zytoplasmatischen Proteine isoliert und 5 μ g pro Spur auf ein 12 %iges SDS-PAGE-Gel geladen, aufgetrennt und mit Kaninchen-anti-EIIA^{Glc} immungefärbt. Zur Kontrolle wurde 100 ng gereinigtes His₆-EIIA^{Glc} aufgetragen.

Wie in Abb. 5.32 zu sehen, zeigt die $\Delta eIIA$ ^{Glc}-Mutante erwartungsgemäß keine EIIA^{Glc}-Expression. Somit konnte die *eIIA*^{Glc}-Deletion mittels PCR und Sequenzierung auf DNA- und über Western Blot-Analyse auf Protein-Ebene bestätigt werden. Der Größenunterschied zwischen zytoplasmatischem und gereinigtem EIIA^{Glc} im SDS-PAGE Gel wird durch den zusätzlichen His₆-Anhang, der zur erleichterten Aufreinigung des EIIA^{Glc} diente, hervorgerufen.

5.3.2 Untersuchung des Wachstums der $\Delta eIIA^{Glc}$ -Mutante mit den verschiedenen Kohlenstoffquellen: Glukose, Glycerin, Cellobiose und Mannose

Zur Überprüfung, ob das Glukose-spezifische EIIA ($EIIA^{Glc}$) am PTS-abhängigen Glukose-Transport oder am Transport anderer Kohlenstoffquellen beteiligt ist, wurde das Wachstum der $\Delta eIIA^{Glc}$ -Mutante in definiertem Minimalmedium (MM) mit PTS-abhängigen (Glukose, Cellobiose und Mannose) und -unabhängigen (Glycerin) Kohlenstoffquellen untersucht (siehe Abb. 5.33 und Abb. 5.34).

Die $\Delta eIIA^{Glc}$ -Mutante verhält sich in ihrem Wachstum, unabhängig von der angebotenen Kohlenstoffquelle, wie der Wildtyp (WT) (siehe Abb. 5.33 und Abb. 5.34). WT und $\Delta eIIA^{Glc}$ -Mutante zeigen in MM mit der PTS-unabhängigen Kohlenstoffquelle Glycerin (siehe Abb. 5.33), wie auch schon für den WT in Abb. 5.16 gezeigt, eine deutlich längere lag-Phase als in Glukose-haltigem Medium.

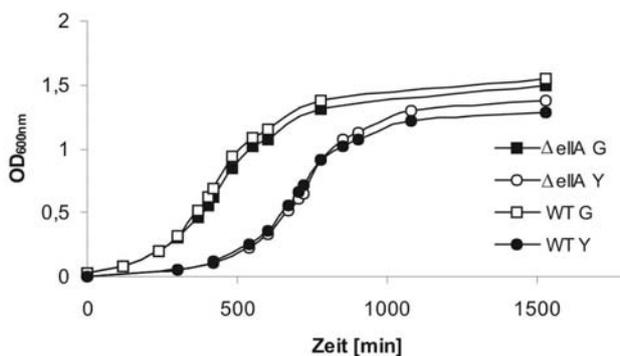


Abb. 5.33: Wachstumskurven von Wildtyp WT und der $\Delta eIIA^{Glc}$ -Mutante ($\Delta eIIA$) in definiertem Minimalmedium mit 50 mM Glukose (G) und Glycerin (Y). Das Wachstum wurde bei 37°C untersucht.

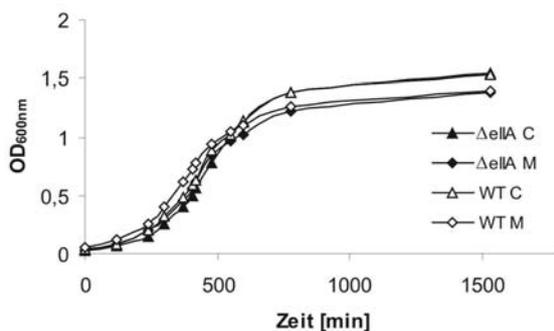


Abb. 5.34: Wachstumskurven von Wildtyp (WT) und der $\Delta eIIA^{Glc}$ -Mutante ($\Delta eIIA$) in definiertem Minimalmedium mit 50 mM Cellobiose (C) und Mannose (M). Das Wachstum wurde bei 37°C untersucht.

Der Vollständigkeit halber wurde die Glukose-Aufnahme mit [^{14}C]-markierter Glukose im Wildtyp und in der $\Delta eIIA^{Glc}$ -Mutante untersucht. Dazu wurden die Bakterienstämme in LB-Medium mit 50 mM Glukose bis zu einer OD_{600nm} von 1.0 angezogen, in einen speziellen Transportpuffer überführt und die [^{14}C]-Glukose-Aufnahme zu verschiedenen Zeitpunkten gemessen (siehe 4.2.4). Um die Glukose-Aufnahme pro Bakterienzelle berechnen zu können, wurde parallel zur Messung die Lebendzellzahl (LZZ) vor der Überführung in den Transportpuffer bestimmt.

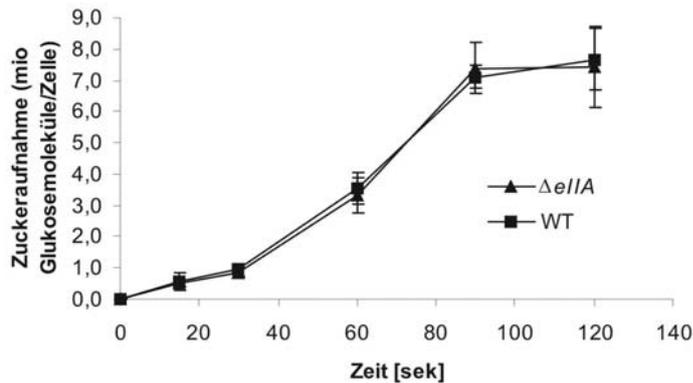


Abb. 5.35: [^{14}C]-Glucose-Aufnahmekinetik in der $\Delta eIIA^{\text{Glc}}$ -Mutante ($\Delta eIIA$) und im Wildtyp (WT). Die Stämme wurden in LB-Medium mit 50 mM Glukose bis zu einer $\text{OD}_{600\text{nm}}$ von 1.0 herangezogen, in Transportpuffer überführt und die [^{14}C]-Glukose-Aufnahme gemessen.

Der Wildtyp und $\Delta eIIA^{\text{Glc}}$ -Mutante zeigen der Erwartung entsprechend eine gleiche [^{14}C]-Glukose-Aufnahme (siehe Abb. 5.35). Da das Glukose-spezifische EIIA weder am PTS-abhängigen noch am -unabhängigen Transport von Kohlenstoffverbindungen beteiligt ist, stellt sich die Frage, welche Funktion das rudimentäre EIIA^{Glc} in *L. monocytogenes* besitzt.

5.3.3 Untersuchung der PrfA-abhängigen Virulenzgenexpression in der $\Delta eIIA^{\text{Glc}}$ -Mutante

Um zu überprüfen, ob die EIIA^{Glc}-Komponente die PrfA-Aktivität und dadurch auch die PrfA-abhängige Virulenzgenexpression steuern, wurde die $eIIA^{\text{Glc}}$ -Mutante (kodiert vom Imo1017) mittels Hämolyse-Assay und Western Blot-Analyse auf ihre PrfA-abhängige Virulenzgenexpression hin untersucht.

Anhand des Hämolyse-Assays kann die Aktivität des Listeriolysins LLO, kodiert vom PrfA-regulierten *hly*-Gen, im WT und der $\Delta eIIA^{\text{Glc}}$ -Mutante bestimmt werden. Hierzu wurden der WT und die $\Delta eIIA^{\text{Glc}}$ -Mutante in definiertem MM mit 50 mM Glukose bei 37°C angezogen. Bei einer optischen Dichte $\text{OD}_{600\text{nm}}$ von 0.6 und 1.0 wurden 25 μl Kulturüberstand abgenommen, in 1 ml Erythrozyten-Suspension eingesetzt und die hämolytische Aktivität photometrisch bei $\text{OD}_{543\text{nm}}$ gemessen (siehe 4.3.9).

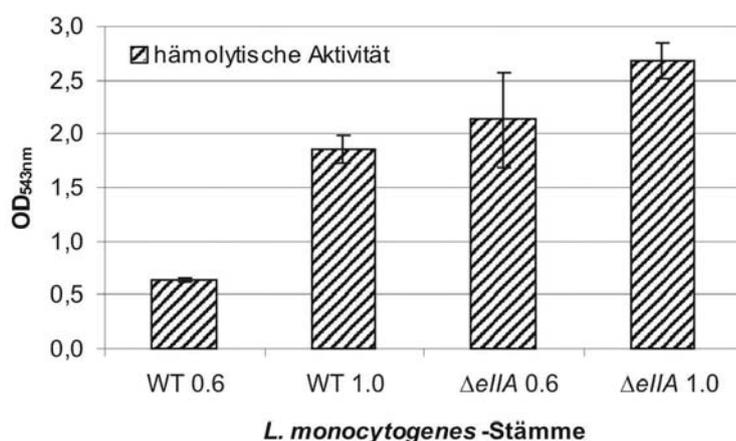


Abb. 5.36: Hämolytische Aktivität des Wildtyps und der $\Delta eIIA^{\text{Glc}}$ -Mutante ($\Delta eIIA$). Zur Bestimmung der hämolytischen Aktivität wurden der Wildtyp (WT) und die $\Delta eIIA^{\text{Glc}}$ -Mutante ($\Delta eIIA$) in definiertem Minimalmedium mit 50 mM Glukose bis zu einer $\text{OD}_{600\text{nm}}$ von 0.6 und 1.0 angezogen und 25 μl Kulturüberstand im Assay eingesetzt. Die hämolytische Aktivität wurde bei $\text{OD}_{543\text{nm}}$ gemessen.

Wie in Abb. 5.36 zu erkennen ist, zeigt die $\Delta eIIA^{Glc}$ -Mutante in der früh-logarithmischen Wachstumsphase (OD_{600nm} von 0.6) eine 4 bis 5fach stärkere LLO-Aktivität als der WT, welche sich in der spät-logarithmischen Wachstumsphase (OD_{600nm} von 1.0) nur geringfügig erhöht. Der WT zeigt in beiden Wachstumsphasen eine geringere hämolytische Aktivität als die $\Delta eIIA^{Glc}$ -Mutante. In der früh-logarithmischen Wachstumsphase bei einer OD_{600nm} von 0.6 ist der Unterschied zwischen WT und $\Delta eIIA^{Glc}$ -Mutante besonders deutlich.

Die Isolierung der zytoplasmatischen Proteinfraction aus WT und $\Delta eIIA^{Glc}$ -Mutante erfolgte parallel zur Probenentnahme für den Hämolyse-Assay bei einer optischen Dichte OD_{600nm} von 0.6 und 1.0. Zur Bestimmung der PrfA- und ActA-Expression in WT und $\Delta eIIA^{Glc}$ -Mutante wurden gleiche Mengen zytoplasmatischer Proteine auf ein 12 %iges SDS-PAGE-Gel aufgetragen, elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran übertragen und mit polyklonalem anti-PrfA- und anti-ActA-Kaninchenserum immungefärbt (siehe 4.3.4 und 4.3.8).

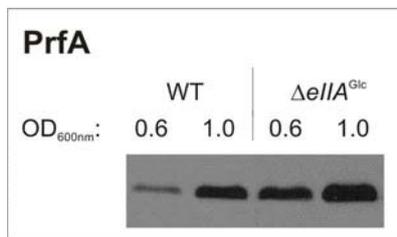
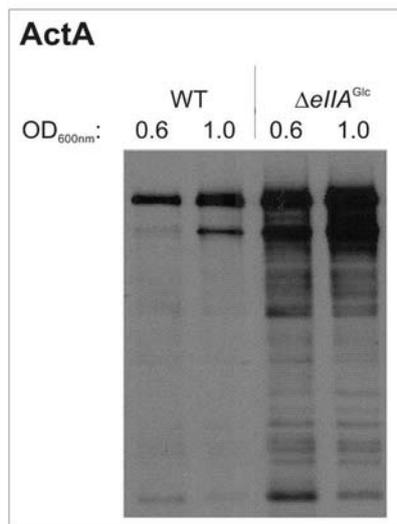


Abb. 5.37: Nachweis von PrfA und ActA im Western Blot. Der Wildtyp (WT) wurde in definiertem Minimalmedium mit jeweils 50 mM Glukose (G) und Glycerin (Y) bis zu einer OD_{600nm} von 0.6 und 1.0 angezogen; 5 μ g zytoplasmatische Proteine wurden pro Spur auf ein 12 %iges SDS-PAGE-Gel geladen und immungefärbt.



Auch in der Western Blot-Analyse, dargestellt in Abb. 5.37, zeigt die $\Delta eIIA^{Glc}$ -Mutante für die Proteine ActA und PrfA eine gesteigerte Expression. Der WT weist hier ebenfalls im Vergleich zur $\Delta eIIA^{Glc}$ -Mutante in in beiden Wachstumsphasen eine geringer ActA- und PrfA-Expression auf. Bei den zahlreichen Banden, die durch das polyklonale anti-ActA-Kaninchenserum erkannt werden, handelt es sich um Abbauprodukte des ActA-Proteins (siehe auch 5.1.3).

Bei der Reproduktion von Hämolyse- und Western Blot-Analyse traten Schwankungen in der PrfA-abhängigen Genexpression auf. Jedoch zeigte die $\Delta eIIA^{Glc}$ -Mutante tendenziell immer eine erhöhte PrfA-regulierte Virulenzgenexpression, jedoch waren die Unterschiede zwischen

WT und $\Delta eIIA^{Glc}$ -Mutante nicht immer so stark ausgeprägt, wie in Abb. 5.36 und Abb. 5.37 dargestellt.

5.4 Untersuchung des C3-Metabolismus in *L. monocytogenes*

Die Verwertung der PTS-unabhängigen C3-Quelle Glycerin führt in *L. monocytogenes* zu einer gesteigerten PrfA-Aktivität. Um den Zusammenhang der Glycerin-Verwertung und der PrfA-Regulation besser verstehen zu können, wurde der Glycerin-Metabolismus und sein Einfluss auf die Modulation der PrfA-Aktivität genauer untersucht. In *B. subtilis*, als Vertreter der Gram-positiven und in *E. coli* bzw. *K. pneumoniae*, als Vertreter der Gram-negativen Bakterien, ist der Glycerin-Metabolismus detailliert beschrieben (siehe 2.6.2).

Zusätzlich wurde das Wachstum von *L. monocytogenes* mit den C3-Quellen Glycerin-3-Phosphat, Dihydroxyaceton und Pyruvat untersucht.

5.4.1 Wachstum von *L. monocytogenes* auf verschiedenen C3-Quellen: Glycerin, Glycerin-3-Phosphat, Dihydroxyaceton und Pyruvat

Die Glycerin-Aufnahme erfolgt sowohl in Gram-positiven als auch in Gram-negativen Bakterien über das Transmembranprotein GlpF. Intrazelluläres Glycerin wird umgehend von der Glycerin-Kinase GlpK zu Glycerin-3-P phosphoryliert. Die Aktivität der Glycerin-Kinase wird in Gram-positiven (*B. subtilis*) und in Gram-negativen Bakterien (*E. coli*) unerschiedlich reguliert. In *B. subtilis* stimuliert das HPr-His15~P die Aktivität der Glycerin-Kinase, in *E. coli* ist es das EIIA^{Glc}~P (Reizer *et al.*, 1984, Saier & Roseman, 1976). Die Deletion des *crr*-Gens in *E. coli*, kodierend für das EIIA^{Glc}, führte zu einem Wachstumsverlust in Glycerin-haltigem Medium (Dorschug *et al.*, 1984, Hurley *et al.*, 1993). Da die $\Delta eIIA^{Glc}$ -Mutante von *L. monocytogenes* keinen Wachstumsdefekt in Glycerin-haltigem Minimalmedium (MM) zeigt (siehe Abb. 5.33), scheint die Glycerin-Kinase in *L. monocytogenes*, wie die von *B. subtilis*, durch HPr-His15~P aktiviert zu werden. Um dies zu zeigen, wurde das Wachstum der *::ccpA*-, *::hprK*- und *::ptsH*-Insertionsmutanten in Glycerin-haltigem definiertem Minimalmedium (MM) untersucht. WT und Insertionsmutanten wurden in BHI-Vollmedium bis zu einer optischen Dichte von OD_{600nm} 0.5 angezogen, pelletiert und in gleichem Volumen MM mit 50 mM Glycerin resuspendiert (siehe 4.2.3). Das Wachstum wurde bei 37°C bestimmt (bei den Insertionsmutanten unter Verwendung von 10 µg/ml Em) (siehe Abb. 5.38).

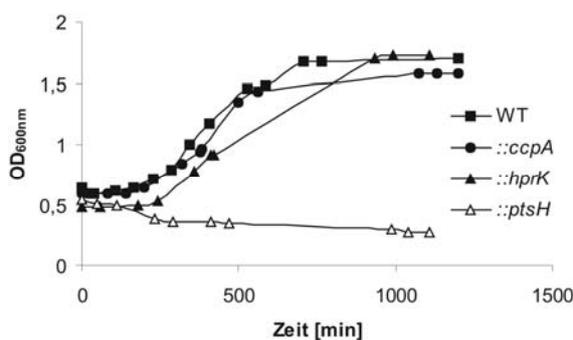


Abb. 5.38: Wachstumskurven der Insertionsmutante *::ccpA*, *::hprK* und *::ptsH* im Vergleich zum Wildtyp (WT) EGD-e in Minimalmedium mit 50 mM Glycerin bei 37°C. Die *L. monocytogenes* Stämme wurden zuerst in BHI bis zu einer OD_{600nm} von 0.5 angezogen und dann in Minimalmedium mit Glycerin überführt.

Die Insertionsmutanten $::ccpA$ (fehlendes CcpA) und $::hprK$ (fehlende HPr-Kinase/Phosphorylase) zeigen ein dem Wildtyp WT ähnliches Wachstum in Glycerin-haltigem Minimalmedium (MM). Dagegen ist die $::ptsH$ -Insertionsmutante (fehlendes HPr und somit fehlendes HPr-His15~P) nach der Überführung aus BHI-Vollmedium in Glycerin-haltiges MM zu keinem Wachstum fähig. Die Aktivität der Glycerin-Kinase und die damit verbundene Initiation des Glycerinstoffwechsels ist in *L.monocytogenes* von HPr-His15~P abhängig.

Die C3-Quelle Glycerin ermöglicht *L.monocytogenes* ein effizientes Wachstum in definiertem MM. Weitere C3-Kohlenstoffverbindungen, die *L.monocytogenes* als weitere Kohlenstoffquelle dienen könnten - Glycerin-3-P (Y3P), Dihydroxyaceton (Dha) und Pyruvat (Py) – wurden auf ihrer Verwertbarkeit von *L.monocytogenes* hin untersucht.

B. subtilis besitzt ein für Y3P spezifisches Transportsystem, kodiert vom *glpT*-Gen (Nilsson *et al.*, 1994). Ein vergleichbarer Y3P-Transporter konnte in *L.monocytogenes* nicht identifiziert werden. Möglicherweise ist der Hexose-Phosphat-Transporter UhpT (kodiert durch das PrfA-abhängige *uhpT*-Gen) in *L.monocytogenes* zum Y3P-Transport in der Lage, da ein Transport des natürlich vorkommenden wasserlöslichen Antibiotikums Fosfomycin, eine phosphorylierte C3-Verbindung, über UhpT nachgewiesen werden konnte. (Scotti *et al.*, 2006). *L.monocytogenes* Wildtyp und der Kontrollstamm *B. subtilis* (B.s.) wurden in Glycerin-haltigem MM (PrfA-aktivierendes Medium) bis zu einer OD_{600nm} von 0.5 angezogen und in frisches MM mit 50 mM Glycerin (Y) bzw. Glycerin-3-Phosphat (Y3P) überführt (siehe 4.2.3). Das Wachstum wurde bei 37°C untersucht.

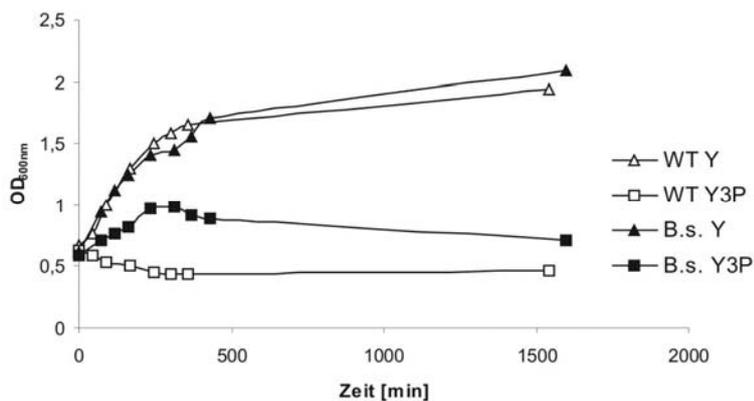


Abb. 5.39: Wachstumskurven von *L.monocytogenes* Wildtyp (WT) und *B. subtilis* (B.s.) in definiertem Minimalmedium mit 50 mM Glycerin (Y) und Glycerin-3-Phosphat (Y3P) bei 37°C. Die zwei Stämme wurden zuerst in definiertem Minimalmedium mit 50 mM Glycerin bis zu einer OD_{600nm} von 0.5 angezogen und dann in Minimalmedium mit Glycerin bzw. Glycerin-3-Phosphat überführt.

B. subtilis, der einen spezifischen Y3P-Transporter GlpT besitzt, zeigt erwartungsgemäß ein Wachstum in Y3P-haltigem MM. Jedoch ist das Wachstum von *B. subtilis* in definiertem MM mit Glycerin als Kohlenstoffquelle deutlich besser. In Y3P-haltigem Medium wird die stationäre Wachstumsphase schon bei einer optischen Dichte OD_{600nm} von 1.0 erreicht, wohingegen mit Glycerin-haltigem MM die stationäre Phase erst bei einer optischen Dichte von OD_{600nm} 2.0 erzielt wird. In Glycerin-haltigem MM zeigt *L.monocytogenes* ein ähnliches

Wachstum wie *B. subtilis*. *L. monocytogenes* ist jedoch nicht in der Lage, Glycerin-3-Phosphat (Y3P) zu verwerten.

Das Vorhandensein von zwei Dihydroxyaceton (Dha) -Kinasen, kodiert von lmo0347-48 und lmo2695-96 in *L. monocytogenes* (<http://genolist.pasteur.fr/ListiList>) und die verstärkte Expression dieser Gene in Glycerin-haltigem MM (Joseph, 2008; submitted) lassen vermuten, dass Dha von *L. monocytogenes* verwertet werden könnte. Die Dha-Kinase-Untereinheiten DhaK (kodiert von lmo0348 und lmo2695) und DhaL (kodiert von lmo0347 und lmo2696) aus *L. monocytogenes* weisen in ihrer Aminosäuresequenz zu den Untereinheiten Dha-K bzw. Dha-L aus *E. coli* eine Ähnlichkeit von 75,9 % bzw. 73,7 % auf (siehe Anhang Abb. 8.1 und Abb. 8.2).

Da die Gene, kodierend für die Dha-Kinasen, in Glycerin-haltigem MM verstärkt exprimiert werden (siehe 5.4.2), wurde der WT in Glycerin-haltigem MM vorgezchtet und bei einer optischen Dichte von OD_{600nm} 0.6 bzw. 1.0 in Dha-haltiges MM überführt und das Wachstum bei 37°C bestimmt (siehe 4.2.3). Nach der Überführung der induzierten Bakterien ist nur ein sehr eingeschränktes Wachstum des WT in Dha-haltigem MM zu erkennen (siehe Abb. 5.40). Um ausschließen zu können, dass Kohlenstoffreserven aus der Vorzucht in Glycerin-haltigem MM für das geringe Wachstum verantwortlich sein könnten, wurde der WT ebenfalls in MM ohne Kohlenstoffquelle überführt (Kontrolle).

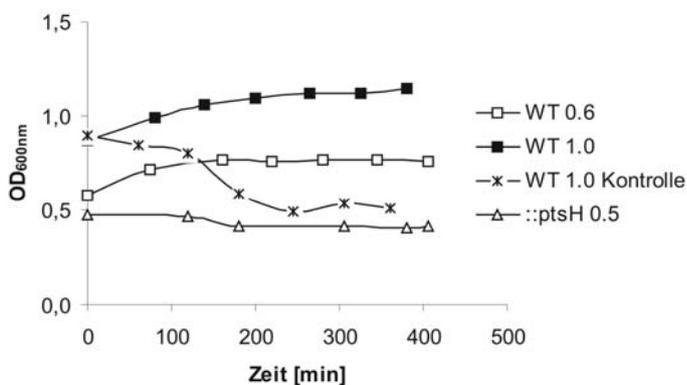


Abb. 5.40: Wachstumskurven des Wildtyps (WT) und der *::ptsH*-Mutante in definiertem Minimalmedium mit 50 mM Dihydroxyaceton bei 37°C. Der Wildtyp WT wurde zuerst in definiertem Minimalmedium (MM) mit 50 mM Glycerin bis zu einer OD_{600nm} von 0.6 bzw. 1.0 angezogen und dann in MM mit 50 mM Dihydroxyaceton überführt. Als Kontrolle wurde der WT zusätzlich in MM ohne Kohlenstoffquelle überführt. Die *::ptsH*-Mutante wurde in BHI bis OD_{600nm} von 0.5 vorgezchtet und dann ebenfalls in MM mit 50 mM Dihydroxyaceton überführt.

Die Abb. 5.40 zeigt, dass der WT nach Überführung aus definiertem MM mit 50 mM Glycerin zu einem geringen Wachstum in MM mit 50 mM Dha fähig ist. Dabei hat die Wachstumsphase (OD_{600nm} von 0.6 oder 1.0), in der die Überführung in Dha-haltiges MM erfolgte, keinen Einfluss auf die Wachstumseffizienz.

In MM ohne Kohlenstoffquelle zeigt der WT (Kontrolle) nach Überführung aus Glycerin-haltigem MM kein Wachstum. Demzufolge scheint das vorhandene Wachstum in Dha-haltigem MM auf eine Dha-Verwertung im WT zurückführbar zu sein. Die Dha-Verwertung und deren Abhängigkeit von HPr-His15~P wurde ausführlich in *E. coli* untersucht und beschrieben (Bachler *et al.*, 2005). Zur Überprüfung, ob die listeriellen Dha-Kinasen ebenfalls HPr-His15~P als Kofaktor für die Phosphorylierung von Dha verwenden, wurde die Dha-

Verwertung in der *ptsH*-Insertionsmutante (fehlendes HPr und somit fehlendes HPr-His15~P) untersucht. Dazu wurde die *ptsH*-Insertionsmutante in BHI-Vollmedium unter Verwendung von 10 µg/ml Em bis zu einer OD_{600nm} von 0.5 angezogen (zeigt kein Wachstum in Glycerin-haltigem MM, siehe Abb. 5.38) und in MM mit 50 mM Dha überführt. Es kann jedoch kein Wachstum der *ptsH*-Insertionsmutante in Dha-haltigem MM nachgewiesen werden (siehe Abb. 5.40). Eine interessante Beobachtung war, dass sich nach längerem Schütteln in Dha-haltigem MM die Bakterien am Rand des Erlenmeyerkolbens ablagerten und sich das Medium stark gelb verfärbte.

Pyruvat, eine weitere C3-Quelle, könnte *in vitro* und auch *in vivo* *L. monocytogenes* als Kohlenstoffquelle dienen. Für die obligat intrazellulären *Rickettsia* spp. gibt es Hinweise einer Pyruvat-Verwertung. Obwohl Pyruvat, das Endprodukt der Glykolyse, nicht selbst von Rickettien gebildet werden kann (glykolytische Enzyme fehlen), findet man im Genom von *Rickettsia* spp. zahlreiche Enzyme für den Pyruvat-Metabolismus. Pyruvat als auch Phosphoenolpyruvat (PEP), das durch eine Phosphat-Dikinase in Pyruvat umgewandelt werden kann, könnte in *Rickettsia* spp. intrazellulär aufgenommen werden und durch die vorhandene Pyruvat-Dehydrogenase (*pdhA*) über Acetyl-CoA in den vollständig vorhandenen Citratzyklus eingeschleust werden (Renesto *et al.*, 2005).

Zur Beantwortung der Frage, ob *L. monocytogenes* in der Lage ist, Pyruvat aufzunehmen und wie Rickettien über die Pyruvat-Dehydrogenase (*pdhA*) in den Citrat-Zyklus einschleusen zu können, wurde das Wachstum mit verschiedenen Pyruvat-Konzentrationen (10, 25 und 50 mM) in LB-Medium untersucht.

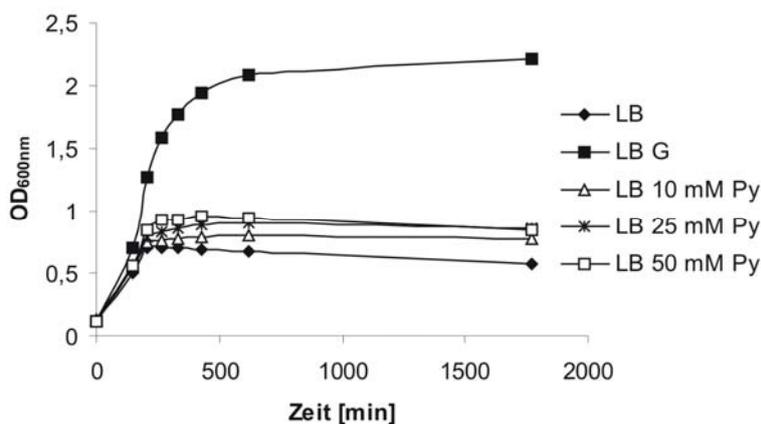


Abb. 5.41: Wachstumskurven von Wildtyp WT in LB-Medium mit 50mM Glukose (G), verschiedene Pyruvat (Py)-Konzentrationen (10 mM, 25 mM und 50 mM) und in reinem LB-Medium. Das Wachstum wurde bei 37°C untersucht.

Ähnlich wie in Dha-haltigem MM zeigt *L. monocytogenes* mit Pyruvat (Py) nur ein geringes Wachstum. Die Unterschiede zwischen LB-Medium ohne zusätzliche Kohlenstoffquelle und Dha-haltigem LB-Medium werden erst bei einer Pyruvatkonzentration von 25 bzw. 50 mM sichtbar (siehe Abb. 5.41). Mit steigender Pyruvat-Konzentration ist eine Wachstumssteigerung des WT in Pyruvat-haltigem LB-Medium zu erkennen.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass die C3-Quellen Glycerin, Dihydroxyaceton und Pyruvat (die letzten beiden allerdings mit niedriger Wachstumseffizienz) *L. monocytogenes in vitro* als Kohlenstoffquelle dienen können. Glycerin-3-P (Y3P) stellt unter den hier gewählten Wachstumsbedingungen für *L. monocytogenes* keine verwertbare Kohlenstoffquelle dar.

5.4.2 Transkriptom-Studien von *L. monocytogenes* nach dem Wachstum in Glycerin-haltigem Medium

Es wurden Gesamtgenom-Transkriptom-Studien von B. Joseph durchgeführt, in denen das Transkriptionsmuster von *L. monocytogenes* WT, gewachsen in Glycerin-haltigem Minimalmedium (MM) mit dem in Glukose oder Cellobiose gewachsenen, verglichen wurde (Joseph *et al.*, 2008; submitted). Hier konnte gezeigt werden, dass die Glycerin-Verwertung zu einer verstärkten Transkription zahlreicher Gene führt, die unter anderem am Transport und Metabolismus von Glycerin beteiligt sein könnten. Mittels Real-time RT PCR wurde die Transkription ausgewählter Gene überprüft.

Dazu wurde der WT in MM mit jeweils 50 mM Glukose, 50 mM Cellobiose und 50 mM Glycerin bis zu einer optischen Dichte OD_{600nm} von 0.6 und 1.0 kultiviert, die RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben (siehe 4.1.13 und 4.1.16). Die gewonnene cDNA wurde mit den entsprechenden Oligonukleotiden für die Gene *glpF*, *lmo1539*, *lmo1538*, *lmo1034*, *glpD*, *lmo0344*, *lmo0347*, *lmo0348*, *lmo2695*, *lmo2696* und *lmo1737* über Real-time RT-PCR amplifiziert und quantifiziert (siehe 4.1.17). Um vergleichende Aussagen über die Transkription der untersuchten Gene im WT unter den verschiedenen Wachstumsbedingungen treffen zu können, wurde *rpoB* (*rpoB* kodiert für die β -Untereinheit der RNA-Polymerase aus *L. monocytogenes*) als interner Standard verwendet. Die relative Transkription der untersuchten Gene wird in Abb. 5.43 und Abb. 5.42 dargestellt.

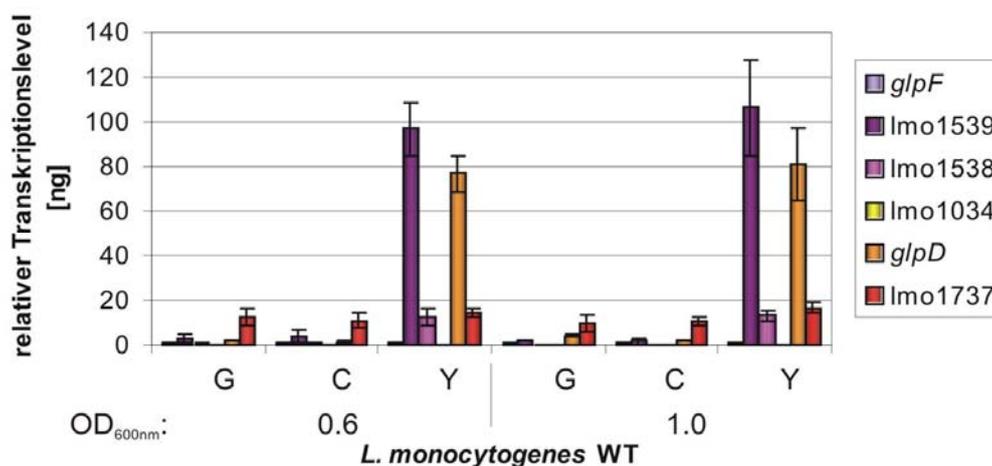


Abb. 5.42: Real-time RT-PCR zur Charakterisierung ausgewählter Gene des Glycerin-Metabolismus im Wildtyp (WT), gewachsen in Minimalmedium mit verschiedenen Kohlenstoffquellen. Der WT wurde in MM mit jeweils 50 mM Glukose (G), Cellobiose (C) und Glycerin (Y) bis zu einer OD_{600nm} von 0.6 und 1.0 angezogen. Die RNA wurde isoliert und cDNA synthetisiert. Auf der y-Achse wurde der relative Transkriptionslevel in ng aufgetragen. Die relative Expression der untersuchten Gene (*glpF*, *lmo1539*, *lmo1538*, *lmo1034*, *glpD* und *lmo1737*) wurde auf das Haushaltsgen *rpoB* normalisiert.

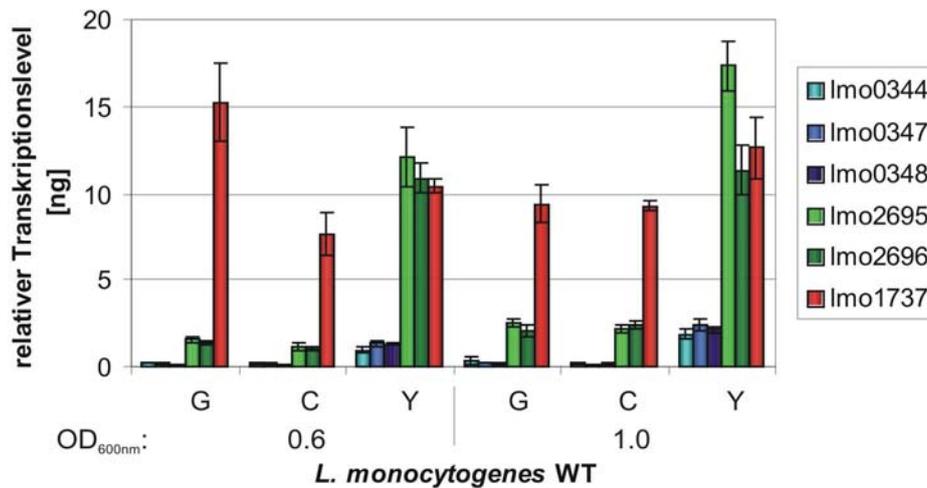


Abb. 5.43: Real-time RT-PCR zur Charakterisierung ausgewählter Gene des Glycerin-Metabolismus im Wildtyp (WT), gewachsen in Minimalmedium mit verschiedenen Kohlenstoffquellen. Der WT wurde in MM mit jeweils 50 mM Glukose (G), Cellobiose (C) und Glycerin (Y) bis zu einer OD_{600nm} von 0.6 und 1.0 herangezogen. Die RNA wurde isoliert und cDNA synthetisiert. Auf der y-Achse wurde der relative Transkriptionslevel in ng aufgetragen. Die relative Expression der untersuchten Gene (lmo0344, lmo0347, lmo0348, lmo2695, lmo2696 und lmo1737) wurde auf das Haushaltsgen *rpoB* normalisiert.

Wie in Abb. 5.42 zu sehen ist, werden die Gene, kodierend für den Glycerin-Transporter GlpF-1 (lmo1539), die Glycerin-Kinase GlpK-1 (lmo1538) und die Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase GlpD (*glpD*), in Glycerin-haltigem MM verstärkt exprimiert. Die Gene lmo1034 und *glpF*, kodierend für eine weitere Glycerin-Kinase GlpK-2 und einen zweiten Glycerin-Transporter GlpF-2, werden unabhängig von der verwendeten Kohlenstoffquelle kaum exprimiert und auch nicht durch die Glycerin-Verwertung in ihrer Transkription gesteigert.

In einigen Bakterien kann Glycerin auch direkt durch eine Glycerin-Dehydrogenase zu Dihydroxyaceton (Dha) umgewandelt werden und durch eine Dha-Kinase zu Dha-P phosphoryliert werden. Gene, kodierend für Enzyme, die Ähnlichkeiten mit einer Glycerin-Dehydrogenase (lmo0344) und Dihydroxyaceton-Kinasen (lmo0347-48 und lmo2695-96) zeigen (<http://genolist.pasteur.fr/ListiList>), werden ebenfalls in *L. monocytogenes* in Glycerin-haltigem MM vermehrt transkribiert (siehe Abb. 5.43). Das lmo1737-Gen, welches für eine weitere mögliche Glycerin-Dehydrogenase kodiert, zeigt in Glycerin-haltigem MM keine gesteigerte Transkription. Wie in Abb. 5.42 und Abb. 5.43 zu erkennen ist, liegt die relative Transkriptionsmenge von lmo1737, unabhängig welche Kohlenstoffquelle (Glukose, Cellobiose oder Glycerin) verwertet wurde, bei ca. 20 ng. Das lmo1737-Gen scheint eher konstitutiv exprimiert zu werden.

5.4.3 Herstellung von Deletionsmutanten im Glyzerin-Metabolismus in *L. monocytogenes*

Die Herstellung der Deletionsmutanten $\Delta 0344$, $\Delta 0347-48$ und $\Delta 2695-95$ erfolgt durch homologe Rekombination mit Hilfe von Derivaten der temperatur-sensitiven Mutageneseplasmide pLSV101 (siehe 4.1.10).

Die stromauf und -abwärts von lmo0344, lmo0347-48 und lmo2695-96 gelegenen Genregionen wurden aus *L. monocytogenes* mit folgenden in Tab. 5.5 aufgelisteten Oligonukleotidpaaren amplifiziert (siehe 4.1.5). Zur Generierung des jeweiligen Mutageneseplasmids wurden die Deletionsfragmente D1 und D2 mit den entsprechenden Restriktionsenzymen geschnitten (siehe Tab. 5.5).

Genregion/Fragment	Oligonukleotidpaar	PCR-Produkt [bp]	Restriktionsenzym
lmo0344/D1	0344-2 / 0344-3	479	EcoRI / Cfr9I
lmo0344/D2	0344-4 / 0344-5	577	BamHI / Cfr9I
lmo0347-48/D1	0347-11 / 0347-12	388	EcoRI / Cfr9I
lmo0347-48/D2	0348-12 / 0348-14	373	BamHI / Cfr9I
lmo2695-96/D1	2695-2 / 2695-3	515	EcoRI / Cfr9I
lmo2695-96/D2	2696-1 / 2696-2	507	BamHI / Cfr9I

Tab. 5.5: Auflistung der verwendeten Oligonukleotidpaare und Restriktionsenzyme zur Generierung der Mutageneseplasmide pLSV101-0344, -0347_48 und -2695_96.

Die verdauten Deletionsfragmente D1 und D2 wurden über die Schnittstelle des Restriktionsenzym Cfr9I ligiert und in den mit EcoRI und BamHI verdauten pLSV101 kloniert (siehe 4.1.6 und 4.1.7). Die so entstandenen Vektoren pLSV101-0344, -0347_48 und -2695_96 wurden in kompetente *E. coli* Dh5 α transformiert (siehe 4.1.8) und mit Vektor-spezifischen Oligonukleotiden (pLSV101EcoRI und pLSV101BamHI) in der PCR überprüft. Aus den positiven Klonen wurde die Plasmid-DNA isoliert, mittels Sequenzierung überprüft und in kompetente Listerien elektroporiert (siehe 4.1.1 und 4.1.9). Durch zwei aufeinander folgende homologe Rekombinationsereignisse konnte es zur Generierung der $\Delta 0344$ -, $\Delta 0347-48$ - und $\Delta 2695-95$ -Einzeldelentionsmutanten und der Mehrfachmutanten $\Delta 0344/2695-96$, $\Delta 0344/0347-48/2695-96$ ($\Delta 0344/dhaK$) und $\Delta 0347-48/2695-96$ ($\Delta dhaK$) kommen. In dieser Arbeit wurden zusätzlich in der $\Delta glpD$ -Mutante (Joseph *et al.*, 2008; submitted) die Gene lmo0347-48 und lmo2695-96 deletiert, was zu der Mutante $\Delta glpD/0347-48/2695-96$ ($\Delta glpD/dhaK$) führte.

Zum Nachweis der jeweiligen Deletion wurden in der PCR Oligonukleotidkombinationen verwendet, die an den flankierenden Bereichen des zu deletierenden Gens binden. Die Oligonukleotidpaare und die bei einer erfolgreichen Deletion zu erwartenden

PCR-Fragmentgrößen sind in Tab. 5.6 aufgeführt. Die jeweiligen Deletionen wurden durch Sequenzierung überprüft.

Deletionsmutante	Oligonukleotidpaar	PCR-Produkt [bp]
$\Delta 0344$	0344-1 / 0344-6	1287 (2025)
$\Delta 0347-48$	0347-13 / 0348-15	1009 (2398)
$\Delta 2695-95$	2695-1 / 2696-3	1208 (2786)

Tab. 5.6: Auflistung der verwendeten Oligonukleotidpaare und die zu erwartenden PCR-Fragmentgrößen zur Überprüfung der jeweiligen Deletionsmutanten $\Delta 0344$, $\Delta 0347-48$ und $\Delta 2695-96$. Die bp-Anzahl in der Klammer gibt jene Größe an, die im wildtypischen Chromosom erwartet wird.

5.4.4 Charakterisierung der Glycerin-Metabolismus-Deletionsmutanten in Bezug auf Wachstum und PrfA-Aktivität

Gesamtgenom-Transkriptom-Analysen (Joseph *et al.*, 2008; submitted) und Real-time RT-PCR Untersuchungen (siehe Abb. 5.42 und Abb. 5.43) haben gezeigt, dass *L. monocytogenes* mehrere Gene besitzt, die in Glycerin-haltigem MM verstärkt exprimiert werden und vermutlich am Glycerin- und Dha-Metabolismus beteiligt sind. Bei diesen Genen handelt es sich um Imo0344 (similar to dehydrogenase/reductase), Imo0347-48 (similar to dihydroxyacetone kinase), Imo2695-95 (similar to dihydroxyacetone kinase) und *glpD* (similar to glycerol 3 phosphate dehydrogenase). Um eine Beteiligung dieser Gene am Glycerin-Metabolismus näher charakterisieren zu können, wurde zuerst das Wachstum in Glycerin-haltigem Minimalmedium (MM) von WT, Einzel- und Mehrfachmutanten $\Delta 0344$, $\Delta 0347-48$, $\Delta 2695-95$, $\Delta dhaK$, $\Delta 0344/dhaK$ und $\Delta glpD/dhaK$ bei 37°C untersucht (siehe 4.2.1).

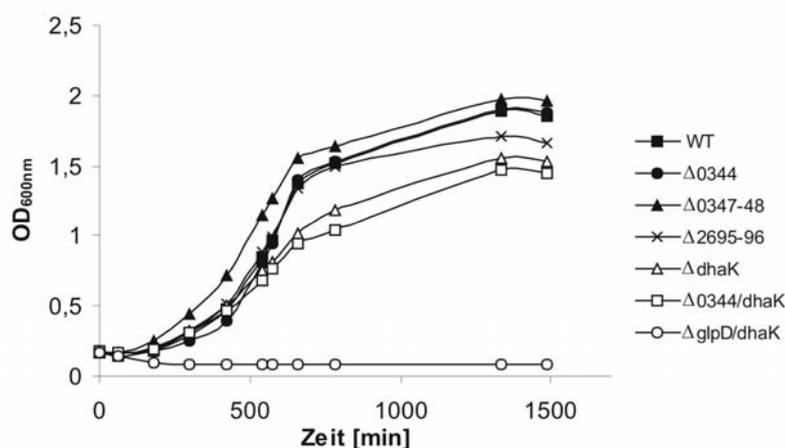


Abb. 5.44: Wachstumskurven von Wildtyp (WT) und den Deletionsmutanten $\Delta 0344$, $\Delta 0347-48$, $\Delta 2695-96$, $\Delta dhaK$ ($\Delta 0347-48/2695-96$), $\Delta 0344/dhaK$ ($\Delta 0344/0347-48/2695-96$) und $\Delta glpD/dhaK$ ($\Delta glpD/0347-48/2695-96$) in definiertem Minimalmedium mit 50 mM Glycerin. Das Wachstum wurde bei 37°C untersucht.

Wie in Abb. 5.44 dargestellt, zeigen die Einzeldelentionsmutanten $\Delta 0344$ und $\Delta 2695-95$ in Glycerin-haltigem MM im Vergleich zum WT keinen Unterschied in der Wachstumsrate. Die $\Delta 0347-48$ -Mutante weist sogar ein besseres Wachstum als der WT auf. Dies konnte auch durch wiederholte Wachstumsversuche bestätigt werden. Erst die Mehrfachmutanten $\Delta dhak$ ($\Delta 0347-48/2695-96$) und $\Delta 0344/dhak$ ($\Delta 0344/0347-48/2695-96$) zeigen in der Glycerin-Verwertung Unterschiede zum WT. Zu Beginn des Wachstums verhalten sich die Mutanten $\Delta dhak$ und $\Delta 0344/dhak$ ähnlich wie der WT, verlangsamen nach 500 min ihre Wachstumsgeschwindigkeit und gelangen schon bei einer optischen Dichte OD_{600nm} von 1.5 in die stationäre Wachstumsphase. Dagegen erreicht der WT die stationäre Wachstumsphase erst bei einer OD_{600nm} von 2.0. Die $\Delta glpD/dhak$ -Mutante ($\Delta glpD/0347-48/2695-96$) zeigt, wie erwartet, kein Wachstum in Glycerin-haltigem MM. Dieser Wachstumsverlust ist auf das fehlende *glpD*-Gen zurückzuführen, da in einer $\Delta glpD$ -Mutante in definiertem MM mit Glycerin in früheren Untersuchungen kein Wachstum zu erkennen war (Joseph *et al.*, 2008; submitted).

Wie schon in Abschnitt 5.2.2 beschrieben, wirkt sich die Glycerin-Verwertung stimulierend auf die PrfA-abhängige Virulenzgenexpression im WT aus (siehe Abb. 5.21 - Abb. 5.23). Da der Verlust eines oder mehrerer Gene (*lmo0344*, *lmo0347-48*, *lmo2695-96*), die möglicherweise für Enzyme des Glycerin-Metabolismus kodieren, zu Auffälligkeiten in der Glycerin-Verwertung führen (siehe Abb. 5.44), wurde die PrfA-regulierte Virulenzgenexpression in diesen Mutanten nach Glycerin-Verwertung näher untersucht. Dazu wurden WT, $\Delta 0344$ -, $\Delta 0347-48$ -, $\Delta 2695-96$ -, $\Delta dhak$ - und $\Delta 0344/dhak$ -Mutante in definiertem MM mit 50 mM Glycerin angezogen, die zytoplasmatische Proteinfraction bei einer optischen Dichte OD_{600nm} von 1.0 isoliert (siehe 4.3.2) und die Protein-Konzentration mittels Bradford bestimmt (siehe 4.3.3). Gleiche Mengen an Proteinen wurden auf ein 12 %iges SDS-PAGE-Gel geladen und elektrophoretisch aufgetrennt (siehe 4.3.4). Nach dem Transfer auf eine Nitrozellulosemembran erfolgte die Detektion von PrfA und ActA mit polyklonalem anti-PrfA- und anti-ActA-Kaninchenserum (siehe 4.3.8).

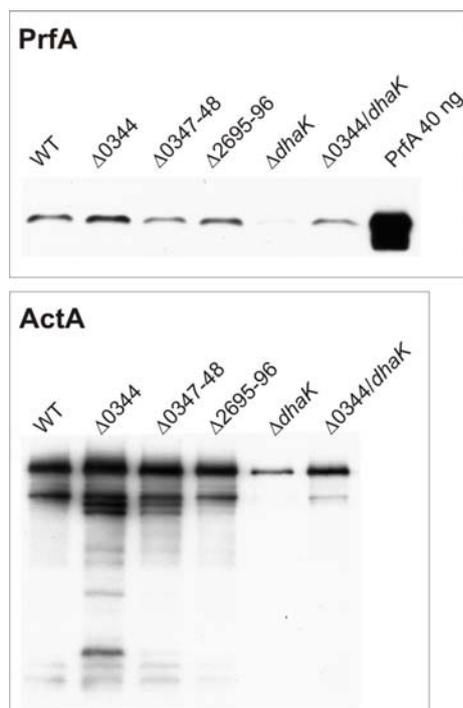


Abb. 5.45: Nachweis von PrfA und ActA im Western Blot. Der Wildtyp und die Deletionsmutanten $\Delta 0344$, $\Delta 0347-48$, $\Delta 2695-96$, $\Delta dhak$ ($\Delta 0347-48/2695-96$) und $\Delta 0344/dhak$ ($\Delta 0344/0347-48/2695-96$) wurden in definiertem Minimalmedium mit jeweils 50 mM Glycerin bis zu einer OD_{600nm} von 1.0 angezogen; 5 μ g zytoplasmatische Proteine wurden pro Spur auf ein 12 %iges SDS-PAGE-Gel geladen und immungefärbt. Zur Kontrolle wurden 40 ng gereinigtes PrfA aufgetragen.

Wie in Abb. 5.45 gezeigt, weist die $\Delta dhaK$ -Mutante (Deletion beider Dha-Kinasen) in der Western Blot-Analyse die schwächste Expression für ActA und PrfA auf. Dagegen zeigt die $\Delta 0344$ -Mutante die stärkste ActA- und PrfA-Expression. Auch die zusätzliche Deletion von Imo0344 in der $\Delta 0344/dhaK$ -Mutante führt im Vergleich zur $\Delta dhaK$ -Mutante wieder zu einer leicht gesteigerten ActA- und PrfA-Expression. Für die $\Delta 0347-48$ -Mutante zeigt sich in der Western Blot-Analyse kein eindeutiges Bild: die ActA-Expression ist geringfügig stärker, während die von PrfA deutlich schwächer ist als im WT. In der $\Delta 2695-96$ -Mutante kann eine dem WT ähnliche ActA- bzw. PrfA-Expression nachgewiesen werden.

5.4.5 Intrazelluläre Replikation der Deletionsmutanten im Glycerin-Metabolismus

Stellen Glycerin oder möglicherweise Dha Kohlenstoffquellen im Zytoplasma der Wirtszelle dar und unterstützen so Überleben und Replikation von *L. monocytogenes* im Zytoplasma der Wirtszelle? *In vitro* Wachstumsversuche in Abb. 5.38 und Abb. 5.40 haben gezeigt, dass Glycerin und Dha von *L. monocytogenes* verwertet werden können. Zudem führt die Glycerin-Verwertung zu einer gesteigerten PrfA-abhängigen Expression zahlreicher Virulenzfaktoren, welche für das intrazelluläre Überleben, die Vermehrung und die Zell-zu-Zell-Ausbreitung von *L. monocytogenes* erforderlich ist.

Die $\Delta dhaK$ - und $\Delta glpD/dhaK$ -Mutanten, die Deletionen in Genen tragen, die für Enzyme des Glycerin-Metabolismus kodieren, zeigen ein verringertes Wachstum in Glycerin-haltigem Minimalmedium (MM) (siehe Abb. 5.44). Zusätzlich konnte in der $\Delta dhaK$ -Mutante eine weitgehende Inaktivierung von PrfA festgestellt werden (siehe Abb. 5.45). Zur Beantwortung der Frage, ob die Glycerin-Verwertung bei der intrazellulären Replikation von *L. monocytogenes* eine Rolle spielt, wurde das intrazelluläre Überleben und die Vermehrung der $\Delta dhaK$ - und $\Delta glpD/dhaK$ -Mutante im Vergleich zum Wildtyp (WT) in J744 Makrophagen untersucht.

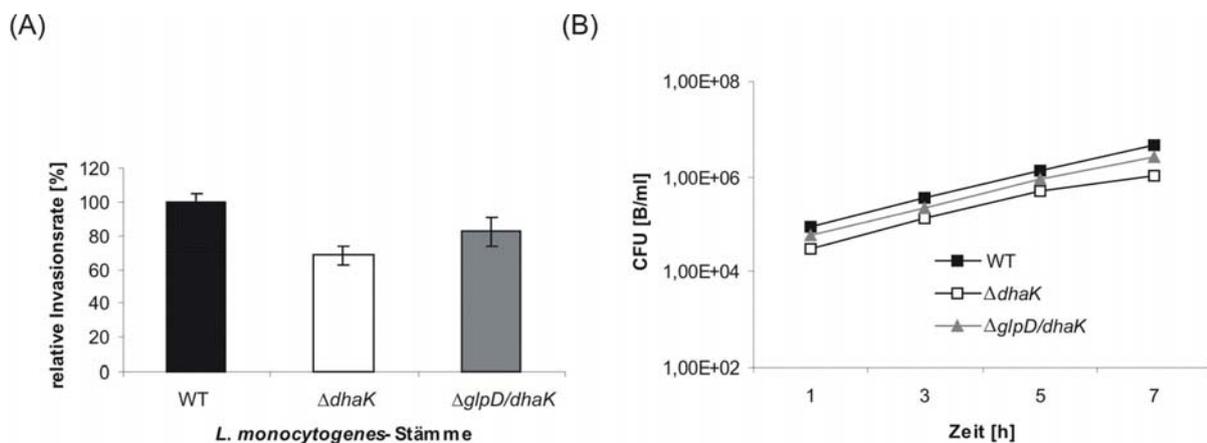


Abb. 5.46: Invasion (A) und intrazelluläre Replikation (B) des Wildtyps (WT) und der Deletionsmutanten $\Delta dhaK$ ($\Delta 0347-48/2695-96$) und $\Delta glpD/dhaK$ ($\Delta glpD/0347-48/2695-96$) in J744 Makrophagen. Die in der Graphik dargestellten Werte entsprechen den Mittelwerten aus drei Versuchsansätzen mit jeweiliger Standardabweichung eines repräsentativen Versuches.

Die Makrophagen wurden 48 h vor der Infektion in 24-Napfplatten ausgesät und mit WT und $\Delta dhaK$ - bzw. $\Delta glpD/dhaK$ -Mutante mit einer MOI von 1 infiziert. Zu verschiedenen Zeitpunkten (0 h, 1 h, 3 h, 5 h und 7 h) wurde die Infektion gestoppt, die Wirtszellen durch Ultraschall lysiert und die Anzahl an lebenden intrazellulären Bakterien durch Ausplattieren geeigneter Verdünnungsstufen bestimmt (siehe 4.5.5).

Wie in Abb. 5.46 (A) zu sehen ist, weist die $\Delta dhaK$ -Mutante im Vergleich zum WT und der $\Delta glpD/dhaK$ eine leichte Reduktion in der Internalisierung durch Makrophagen auf. Ebenfalls zeigt die $\Delta dhaK$ -Mutante in J744 Makrophagen eine geringere Replikation als der WT und die $\Delta glpD/dhaK$ -Mutante (siehe Abb. 5.46 (B)).

6 Diskussion

Listerien, einschließlich der pathogenen Art *Listeria monocytogenes*, leben hauptsächlich im Boden, der reich an zerfallenem Pflanzenmaterial ist. Bei dieser saprophytischen Lebensweise ist die Expression der Virulenzgene auch in den pathogenen *Listeria*-Arten (*L. monocytogenes* und *L. ivanovii*) nicht erforderlich. Erst nach der Infektion eines geeigneten Wirts müssen die unter der Kontrolle des Transkriptionsaktivators PrfA stehenden Virulenzgene exprimiert werden. Deren Genprodukte (Virulenzfaktoren) sind für die Aufnahme in nicht-phagozytierende Zellen (InlA, InlB und InlC), die Freisetzung aus dem primären Phagosom (LLO, PlcA und PlcB), die Vermehrung im Wirtszytosol (UhpT), die Zell-zu-Zell-Ausbreitung (ActA) und das Entkommen aus dem sekundären Phagosom (LLO und PlcB) notwendig (Dussurget *et al.*, 2004). Diese PrfA-regulierten Gene liegen teils zusammen in einem 9,6 kb-großen, chromosomalen Virulenzgencluster, der sog. *Listeria*-Pathogenitätsinsel 1 (LIPI-1), und teils auf dem listeriellen Chromosom verteilt (Kreft & Vázquez-Boland, 2001).

Eine große Anzahl der Virulenzgene werden durch den positiven Transkriptionsfaktor PrfA in ihrer Transkription reguliert. Das 27 kD-schwere PrfA-Protein gehört zur Crp/Fnr-Familie globaler Transkriptionsaktivatoren (Korner *et al.*, 2003). PrfA-abhängige Gene besitzen in ihrem Promotorbereich eine konservierte, palindromische 14 bp-große Bindestelle für PrfA (Freitag *et al.*, 1993).

Die PrfA-abhängige Expression der meisten Virulenzgene wird durch eine Vielzahl von Umweltfaktoren reguliert. Zum Beispiel ist bei Temperaturen oberhalb von 30°C eine gesteigerte PrfA-abhängige Virulenzgenexpression zu beobachten, die weitgehend auf einer erhöhten Translation des *prfA*-Transkriptes beruht (Leimeister-Wächter *et al.*, 1992, Johansson *et al.*, 2002).

Die Aktivität des vorhandenen PrfA-Proteins wird stark von dem verwendeten Medium beeinflusst. Wachstum von *L. monocytogenes* in Nährstoff-reichen Medien wie BHI- und LB-Medium, aber auch in definierten Minimalmedien in Gegenwart von PTS-Zuckern wie, Glukose, Mannose und vor allem β -Glucosiden (wie Cellobiose) führen zu einer niedrigen PrfA-Aktivität (Renzoni *et al.*, 1997, Park & Kroll, 1993, Gilbreth *et al.*, 2004). Zusatz von Aktivkohle oder Amberlite XAD-4 (absorbieren vor allem hydrophobe Substanzen) zu diesen Kulturmedien führt zu einer gesteigerten PrfA-abhängigen Virulenzgenexpression (Kreft & Vázquez-Boland, 2001). Dagegen führt die Aufnahme und Verwertung von phosphorylierter Glukose (Glukose-1 (oder 6) -Phosphat) zu einer gesteigerten PrfA-Aktivität. Der Transport dieser phosphorylierten Hexosen erfolgt unabhängig von PTS über den Hexose-Phosphat-Transporter UhpT, der von dem PrfA-unabhängigen Gen *uhpT* kodiert wird (Ripio *et al.*, 1997a). Basierend auf diesen Daten wurde postuliert, dass möglicherweise Komponenten der globalen Kohlenstoff-Katabolitrepressions Kontrolle (KKR) oder des PTS (Phosphoenolpyruvat-Phosphotransferase-System)-abhängigen Zuckertransports an der Modulation der PrfA-Aktivität beteiligt sind. In der Tat konnte bei einigen pathogenen

Bakterien eine Beteiligung der KKR und von PTS bei der Regulation von Virulenzgenen nachgewiesen werden (Smith *et al.*, 1986, Busque *et al.*, 1995).

Um die mögliche Beteiligung von Komponenten der KKR und/oder PTS an der Modulation der PrfA-Aktivität näher zu untersuchen, wurden in dieser Arbeit *::ccpA-*, *::hprK-* und *::ptsH-* Insertionsmutanten, in denen die KKR und der gemeinsame Grundweg für alle PTS-Permeasen inaktiviert ist, auf ihre PrfA-Aktivität hin untersucht. Weiterhin wurde die Konzentration von HPr-Ser46~P, der Hauptregulatorkomponente der KKR in Gram-positiven Bakterien (Chauvaux, 1996) unter verschiedenen Wachstumsbedingungen von *L. monocytogenes* bestimmt. Daraus können Rückschlüsse auf die KKR in verschiedenen Wachstumsphasen und bei der Verwertung verschiedener Kohlenstoffquellen, wie Glukose, Cellobiose und Glycerin gezogen und somit mögliche Zusammenhänge zwischen KKR (und PTS) und der PrfA-Aktivität unter verschiedenen Wachstumsbedingungen aufgedeckt werden.

Ein möglicher Einfluss von PTS auf die Modulation der PrfA-Aktivität sollte zusätzlich mit Hilfe einer *eIIA^{Glc}*-Deletionsmutante (lmo1017) nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu *B. subtilis* (und anderen Bakterien) besitzt *L. monocytogenes* kein vollständiges Glukose-spezifisches PtsG (in *B. subtilis*, bestehend aus den Komponenten EIIA, B und C; (Gonzy-Treboul *et al.*, 1991)). Vorhanden ist aber in *L. monocytogenes* eine EIIA II-Komponente, kodiert von lmo1017, die hohe Homologie zu der entsprechenden EIIA-Komponente von PtsG aus *B. subtilis* aufweist.

Der Transport von nicht-PTS-gängigen, phosphorylierten Hexosen (Glukose-1(6)-Phosphat und deren anschließende Verwertung scheint bei der intrazellulären Replikation von *L. monocytogenes* eine Rolle zu spielen (Chico-Calero *et al.*, 2002). Die Verwertung von über den UhpT aufgenommenen Glukose-1(6)-Phosphat ermöglicht das bakterielle Wachstum von *L. monocytogenes* P14, ohne jedoch dessen PrfA-abhängige Virulenzgenexpression zu reprimieren (Ripio *et al.*, 1997a). Um diesen Befund besser zu verstehen, wurde *L. monocytogenes* EGD-e in Gegenwart von Glukose-6-Phosphat kultiviert, die Wachstumskinetik, das Transkriptionsprofil und die intrazelluläre HPr-Ser46~P-Konzentration wurden im Vergleich zu dem in Gegenwart von Glukose gewachsenen Stamm bestimmt. Zusätzlich wurde die PrfA-Aktivität von *L. monocytogenes* unter diesen beiden Wachstumsbedingungen untersucht.

Da die Δ *uhpT*-Mutante trotz des Verlustes des Hexose-Phosphat-Transporters UhpT noch im Zytoplasma von J744 Makophagen, Caco-2 und HepG2 Zellen replizieren kann, müssen offensichtlich neben Glukose-1- und Glukose-6-Phosphat weitere Kohlenstoffquellen von Seiten der Wirtszelle für den intrazellulären listeriellen Metabolismus zur Verfügung stehen. Es ist daher von großem Interesse, zu bestimmen, welche anderen Kohlenstoffquellen den intrazellulären Metabolismus von *L. monocytogenes* ermöglichen. Diese Kohlenstoffverbindungen müssen offensichtlich so geartet sein, dass deren Verwertung, ähnlich wie es bei Glukose-1(6)-Phosphat der Fall ist, keinen hemmenden Effekt auf die PrfA-Aktivität ausüben (der intrazelluläre Replikationszyklus von *L. monocytogenes* ist stark von PrfA-regulierten Virulenzfaktoren abhängig). Von daher sind mögliche PTS-gängige

Zucker wie Glukose und Mannose, die einen hemmenden Einfluss auf die PrfA-Aktivität ausüben, als intrazelluläre C-Quellen eher unwahrscheinlich. Dagegen sind C3-Verbindungen, wie Glyzerin, Dihydroxyaceton oder Pyruvat, die alle über nicht-PTS-Transporter von Bakterien aufgenommen werden, mögliche Kandidaten. Daher wurde in dieser Arbeit die Verwertung von C3-Kohlenstoffverbindungen durch *L. monocytogenes* *in vitro* und *in vivo* untersucht.

6.1 Charakterisierung der *Listeria monocytogenes* **::*ccpA*-**, **::*hprK*-** und **::*ptsH*-Insertionsmutanten**

Die Insertionsmutanten **::*ccpA***, **::*hprK*** und **::*ptsH*** aus *L. monocytogenes* tragen jeweils in den an der Kohlenstoff-Katabolitrepression (KKR) beteiligten Genen *ccpA* (kodiert für das carbon control protein A CcpA), *hprK* (kodiert für die HPr-Kinase/Phosphorylase HPrK/P) und *ptsH* (kodiert für das hitzestabile Protein HPr) eine pLSV101SM1-3 (pSM1-3) Insertion. Diese spezifische Vektorinsertion in das jeweilige Gen wurde mit Vektor-spezifischen und Gen-spezifischen Oligonukleotiden über PCR nachgewiesen. Eine unspezifische Bindung der verwendeten Oligonukleotide in der PCR konnte ausgeschlossen werden, da mit wildtypischer chromosomaler DNA kein PCR-Produkt erhalten wurde. Southern Blot-Analysen bestätigen zusätzlich, dass die Insertion von pSM1-3 spezifisch in das jeweilige Gen (*ccpA*, *hprK* bzw. *ptsH*) erfolgt war.

Um sicherstellen zu können, dass die Insertionen in die Gene *ccpA*, *hprK* und *ptsH* keinen polaren Effekt auf die benachbarten Gene hervorrufen, wurde die Transkription der stromaufwärts und -abwärts lokalisierten Gene über Real-time RT-PCR in den Insertionsmutanten im Vergleich zum Wildtyp (WT) analysiert. Die Insertionen in die Gene *ccpA* und *hprK* zeigten keine signifikant veränderte Genexpression der stromaufwärts und -abwärts lokalisierten Gene: *tyrS* (*ccpA*) bzw. *lmo2480*, *lmo2481*, *lgt*, *lmo2484* (*hprK*). Dagegen führt die pSM3-Insertion in das *ptsH*-Gen erwartungsgemäß zu einem kompletten Transkriptionsverlust des stromabwärts gelegenen Gens *lmo1003* (*ptsI*), kodierend für Enzym I (EI). Schon die Untersuchung der Gene *ptsH*- und *ptsI* von *Listeria monocytogenes* ScottA, kodierend für HPr und EI, zeigte, dass diese zwei Gene eine Transkriptionseinheit bilden, deren Initiation durch Glukose, den pH-Wert oder durch Nebenprodukte des Glukose-Metabolismus reguliert werden (Christensen *et al.*, 1998). Da EI, soweit bekannt ist, nur HPr am His15 phosphoryliert (Chauvin *et al.*, 1996a), sollte der Transkriptionsverlust des *ptsI*-Gens keinen zusätzlichen Einfluss auf den Phänotyp der HPr-Deletionsmutante (**::*ptsH***-Mutante) haben.

Das Ziel der Insertionen pSM1-3 in die Gene *ccpA*, *hprK* und *ptsH* sollte zum Verlust der Genprodukte führen. Die Auswirkung der Insertion auf die CcpA-, HPrK/P- und HPr-Expression wurde in den jeweiligen Insertionsmutanten **::*ccpA***, **::*hprK*** und **::*ptsH*** mittels Western Blot-Analyse untersucht. Im Western Blot anti-CcpA und anti-HPr konnte für die **::*ccpA***- bzw. **::*ptsH***-Mutanten nur sehr wenig CcpA- bzw. HPr-Protein nachgewiesen werden. Bei den hier untersuchten KKR-Mutanten handelt es sich um Insertionsmutanten, deren pSM-Insertionen in den jeweiligen Genen bei nicht vorhandenem Selektionsdruck (Abwesenheit

von 10 µg/ml Erythromycin und Temperaturen unter 42°C) verloren gehen kann. Da die Bakterienanzucht bei 37°C erfolgte liegt eine Mischpopulation mit einem geringen Anteil an wildtypischen Bakterien vor und würde die schwache CcpA-Expression in der *::ccpA*-Mutante erklären. Die entsprechenden Revertanten *RccpA* und *RptsH* zeigten erwartungsgemäß wieder eine wildtypische *ccpA*- und *ptsH*-Genexpression.

Gegen die listerielle HPr-Kinase/Phosphorylase (kodiert vom *hprK*-Gen) stand kein Listerien-spezifischer Antikörper zur Verfügung. Aus diesem Grund konnte in der *::hprK*-Insertionsmutante der Verlust des Genproduktes nur enzymatisch über die fehlende Phosphorylierung von HPr am Ser46 nachgewiesen werden. Die HPr-K/P katalysiert in Gram-positiven Bakterien die Phosphorylierung bzw. die Dephosphorylierung des HPr-Proteins am Ser46 (Kravanja *et al.*, 1999). Im Western Blot anti-HPr konnten die verschiedenen HPr-Phosphorylierungszustände in der *::hprK*-Mutante genau bestimmt werden (Huynh *et al.*, 2000, Halbedel & Stülke, 2005) und der Verlust des Enzyms HPr-Kinase/Phosphorylase durch das Fehlen von HPr-Ser46~P bestätigt werden.

Wachstumsuntersuchungen in BHI-Vollmedium zeigten für die *::ccpA*- *::hprK*- und *::ptsH*-Mutanten ein verringertes Wachstum. Eine besonders stark ausgeprägte Wachstumshemmung konnte für die *::ptsH*-Insertionsmutante nachgewiesen werden. In definiertem Minimalmedium (MM) mit Glukose als einziger Kohlenstoffquelle zeigte die *::ptsH*-Mutante überhaupt kein Wachstum mehr. Durch das Fehlen des HPr-Proteins wird der für den Glukose-Transport erforderliche Phosphatgruppen-Transfer von PEP (Phosphoenolpyruvat) über EI und den Enzym II-Komplex auf den in die Bakterienzelle zu transportierenden Zucker, in der *::ptsH*-Mutante verhindert, was den Verlust des Wachstums mit PTS-gängiger Glukose begründet. Die Glukose-Aufnahme in *L. monocytogenes* ist noch nicht vollständig geklärt (R. Stoll, unveröffentlichte Daten). Jedoch deutet der Wachstumsverlust der *::ptsH*-Mutante in Glukose-haltigem MM auf einen PTS-abhängigen Glukose-Transport hin. Anders als in *L. monocytogenes* zeigte eine *ptsHI*-Mutante (fehlendes HPr und Enzym I) aus *Bacillus megaterium* jedoch ein Wachstum in Glukose-haltigem Medium, was für einen nicht-PTS-abhängigen Glukose-Transport, z.B. über ABC-Transporter in diesem Bakterium sprechen könnte (Wagner *et al.*, 2000). *Listeria monocytogenes* besitzt zwar ABC-Transporter, die Ähnlichkeit zu Zucker-spezifischen ABC-Transportern haben (z.B. lmo0179-81, lmo0766-68, lmo0859-61, lmo1730-32 und lmo2837-38) sowie Glukose-Aufnahme-Proteine (lmo0169, lmo0176 und lmo0424), die HPr-unabhängig Glukose in die Zelle transportieren könnten. Noch unveröffentlichte Transkriptom-Daten (R. Stoll, persönliche Mitteilung) zeigen jedoch, dass diese Gene nicht oder nur sehr schwach exprimiert werden, selbst in Mutanten, bei denen die Gene für die wichtigsten Glukose-PTS deletiert sind.

Im Gegensatz zu definiertem MM stellt BHI-Medium ein sehr komplexes Medium dar, dessen genaue Zusammensetzung nicht bekannt ist. Da die *::ptsH*-Mutante ein Wachstum in BHI-Medium zeigte, müssen offensichtlich andere nicht-PTS-abhängige Kohlenstoffverbindungen (z.B. Oligopeptide) hier das Wachstum der *::ptsH*-Mutante ermöglichen. Diese nicht-PTS-abhängigen Kohlenstoffverbindungen scheinen jedoch BHI-

spezifisch zu sein, da die *::ptsH*-Insertionsmutante auch in LB-Medium (mit und ohne Glukose) kein Wachstum zeigte (Stoll *et al.*, 2008; submitted).

Die *::ccpA*- und *::hprK*-Mutanten zeigten in Gegenwart von Glukose in definiertem MM im Vergleich zum Wildtyp ein Wachstum mit geringerer Wachstumsrate, welche in der *::hprK*-Mutante am stärksten ausgeprägt war. Zusätzlich wurde die Glukose-Aufnahmerate vom Wildtyp und den Insertionsmutanten *::ccpA* und *::hprK* mit radioaktiv markierter [¹⁴C]-Glukose untersucht. Beide Insertionsmutanten zeigten eine deutlich geringere [¹⁴C]-Glukose-Aufnahme als der Wildtyp, die in der *::hprK*-Mutante besonders stark ausgeprägt war. Eine HPr-Kinase-Mutante aus *Staphylococcus xylosus* zeigte, wie die *::hprK*-Mutante aus *L. monocytogenes*, ein verlangsamtes Wachstum in Glukose-haltigem MM (Huynh *et al.*, 2000). Dagegen konnte für eine *hprK*-Deletionsmutante von *B. subtilis* keine Wachstumsverzögerung nachgewiesen werden (Galinier *et al.*, 1998, Reizer *et al.*, 1998). Die *ccpA*-Mutante aus *B. subtilis* zeigte eine reduzierte Glukose-Aufnahme, was auf die Bildung einer geringen Menge an HPr-His15~P zurückzuführen war (Ludwig *et al.*, 2002b). In der *::ccpA*-Insertionsmutante aus *Listeria monocytogenes* konnte zwar eine verringerte Glukose-Aufnahme nachgewiesen werden, aber das HPr-Phosphorylierungsmuster entsprach dem des WT. Entgegen der Beobachtungen in anderen Gram-positiven Bakterien, wie z.B. *Enterococcus faecalis* und *B. subtilis*, zeigte die *::ccpA*-Insertionsmutante aus *L. monocytogenes* keine gesteigerte HPr-Ser46~P-Menge (Leboeuf *et al.*, 2000, Ludwig *et al.*, 2002b).

Da ein polarer Effekt der Insertion auf die benachbarten Gene von *ccpA*, *hprK* und *ptsH* ausgeschlossen werden konnte und die entsprechenden Revertanten *RccpA*, *RhprK* und *RptsH* in BHI wieder ein dem Wildtyp entsprechendes Wachstum zeigten, kann die mehr oder weniger stark ausgeprägte Wachstumshemmung der Insertionsmutanten *::ccpA*, *::hprK* und *::ptsH* auf das Fehlen der jeweiligen KKR-Komponenten (CcpA, HPr-K/P und HPr) zurückgeführt werden.

6.1.1 Gesamtgenom-Transkriptom-Analysen der *::ccpA*- und *::hprK*-Insertionsmutanten

Die Gesamtgenom-Transkriptom-Studien der *::ccpA*- und *::hprK*-Insertionsmutanten im Vergleich zum Wildtyp in BHI-Vollmedium zeigten eine große Anzahl differentiell regulierter Gene. Diese Gene wurden in drei Gruppen (Gruppe I-III) unterteilt. Gruppe Ia und b beinhaltet eine große Anzahl von Genen, die sowohl in der *::ccpA*- als auch in der *::hprK*-Mutante eine gesteigerte (a) bzw. verringerte (b) Transkription aufweisen. Die verstärkt transkribierten Gene kodieren für Zuckertransporter (PTS, ABC-Transporter), für Enzyme des Kohlenstoff-Metabolismus und einige Transkriptionsaktivatoren und stehen mit großer Wahrscheinlichkeit im WT unter der negativen Kontrolle des CcpA/HPr-Ser46~P-Komplexes, wie schon für *B. subtilis* beschrieben (Moreno *et al.*, 2001). In Gruppe Ib befindet sich nur eine geringe Gen-Anzahl, die wohl unter einer positiven Transkriptionsregulation durch den CcpA/HPr-Ser46~P-Komplex stehen. Unter anderem

findet man in Gruppe Ib die Gene *ilvN* und *leuC*, kodierend für Enzyme der Biosynthese verzweigter Aminosäuren, deren Expression ebenso in *B. subtilis* (*ilv-leu* Operons) die Anwesenheit von CcpA als positiven Transkriptionsfaktor erfordert. CcpA ist in *B. subtilis* sowohl an der Kontrolle des Kohlenstoff-Metabolismus als auch an der Regulation der Aminosäurebiosynthese beteiligt (Ludwig *et al.*, 2002a). Auch in *L. monocytogenes* scheint eine Verbindung zwischen der Regulation des Kohlenstoff- und Stickstoff-Metabolismus zu bestehen.

In Gruppe II sind jene Gene zusammengefasst, die nur in der *::ccpA*-Mutante hoch- bzw. herunterreguliert wurden. Offensichtlich erfolgt die Repression bzw. Aktivierung, der in Gruppe II regulierten, katabolen Gene, nur durch CcpA allein ohne seinen Kofaktor HPr-Ser46~P. Transkriptomstudien von *B. subtilis* zeigten vor allem in der Transkriptionsaktivierung kataboler Gene eine HPr-Ser46~P bzw. Crh-Ser46~P unabhängige Regulation durch das CcpA-Protein (Lorca *et al.*, 2005).

Weitere Gene, die nur in der *::hprK*-Mutante differentiell reguliert wurden, wurden in Gruppe III zusammengefasst. Zu den hochregulierten Genen (Gruppe IIIa) gehören alle PrfA-regulierten Virulenzgene, zahlreiche PTS und ABC-Transporter, die sich jedoch von Gruppe Ia unterscheiden. Die verstärkte Transkription PrfA-abhängiger Virulenzgene in der *::hprK*-Mutante korreliert mit der Herunterregulation einiger Gene, die in ihrer Transkription durch einen aktiven PTS-vermittelten Glukose-Transport kontrolliert werden. Es besteht die Annahme, dass die Regulation der Gene aus Gruppe III CcpA-unabhängig durch die Menge an HPr-Ser46~P bzw. das Verhältnis HPr-Ser46~P/HPr-His15~P erfolgt und somit von der Glukose-Aufnahme-Effizienz abhängig ist.

6.1.2 Virulenzgenexpression der *::ccpA*-, *::hprK*- und *::ptsH*-Insertionsmutanten

Um zu überprüfen, ob die PrfA-Aktivität und demzufolge die PrfA-abhängige Virulenzgenexpression in *L. monocytogenes* über die Kohlenstoff-Katabolitrepression (KKR) gesteuert wird, wurden in dieser Arbeit die KKR-Mutanten *::ccpA*, *::hprK* und *::ptsH* hinsichtlich ihrer PrfA-Aktivität auf Transkriptions- und Translationsebene untersucht.

Die *::ccpA*-Insertionsmutante zeigte in BHI-Medium für die in der Real-Time RT-PCR untersuchten PrfA-abhängigen Virulenzgene *actA*, *plcA*, *plcB*, *inlA*, *inlB* und *hly* eine verringerte Transkription im Vergleich zum WT. Gesamtgenom-Transkriptom-Studien der *::ccpA*-Mutante bestätigten die geringere Expression des *inlA*-Gens. Im Hämolyse-Assay verhielt sich die *::ccpA*-Mutante weniger hämolytisch als der WT und zeigte in der Western Blot-Analyse für die Proteine LLO, ActA und InlC eine geringere Expression als der WT. PrfA wurde im WT und in der *::ccpA*-Mutante in gleicher Menge exprimiert. PrfA wird demzufolge in der *::ccpA*-Insertionsmutante gebildet, liegt aber in inaktivem Zustand vor, was die geringe PrfA-regulierte Virulenzgenexpression erklärt. Auch PrfA-Aktivitäts-Studien in einer *::ccpA*-Insertionsmutante von *B. subtilis* haben in LB-Medium eine geringe PrfA-abhängige Transkription gezeigt, was für einen Einfluss der KKR Kontrolle auf die

PrfA-Aktivität sprechen könnte (Herro *et al.*, 2005). *B. subtilis* und *L. monocytogenes* weisen eine relativ enge Verwandtschaft auf, so dass ein Vergleich der PrfA-Aktivität in Abhängigkeit von CcpA bedingt möglich ist und Hinweise in Bezug auf die Regulation der PrfA-Aktivität liefern könnte. Dagegen zeigten Behari und Youngman für ihre *::ccpA*-Insertionsmutante keine verringerte PrfA-Aktivität (Behari & Youngman, 1998b). Allerdings befindet sich die Insertion, in der von Behari und Youngman hergestellten *::ccpA*-Insertionsmutante, im C-terminalen Bereich, so dass das *ccpA*-Gen erst nach 279 Codons unterbrochen wird. So könnte eine mögliche CcpA-Restaktivität bestehen, was die unveränderte PrfA-Aktivität erklären könnte.

Im Gegensatz dazu zeigte die *::hprK*-Insertionsmutante eine signifikant-hohe PrfA-abhängige Virulenzgenexpression, was auf eine gesteigerte PrfA-Aktivität schließen lässt. Dies konnte in BHI, sowohl auf Transkriptionsebene mittels Real time RT-PCR für die Virulenzgene *actA*, *plcA* und *B*, *inlA*, *B* und *C*, *hly*, *prfA*, *mpl* und *uhpT*, als auch auf Translationsebene für die Virulenzproteine PrfA, LLO, ActA und InlC nachgewiesen werden. Im Rahmen dieser Arbeit konnte auch für die *::ptsH*-Insertionsmutante auf Transkription- und Translationsebene eine erhöhte PrfA-Aktivität aufgezeigt werden. Allerdings wiesen neuere vergleichende Gesamtgenom-Transkriptom-Studien mit RNA aus der *::ptsH*-Mutante und dem isogenen Wildstamm eher eine verringerte Transkription der PrfA-abhängigen Virulenzgene auf (R. Stoll, persönliche Mitteilung). Der einzige Unterschied zwischen den Versuchsansätzen zur Bestimmung der PrfA-Aktivität in der *::ptsH*-Insertionsmutante liegt in der verwendeten BHI-Charge. Die BHI-Zusammensetzung ist nicht genau definiert und variiert von Charge zu Charge. Letztendlich könnten verschiedene Zuckerzusammensetzungen der BHI-Chargen die Unterschiede in der PrfA-Aktivität in der *::ptsH*-Mutante erklären.

Für die *::hprK*-Mutante (und für einige Virulenzfaktoren auch in der *::ptsH*-Mutante) konnte sogar eine ähnlich starke Virulenzgenexpression wie im Vergleichsstamm P14-A mit konstitutiv aktivem PrfA (PrfA*) nachgewiesen werden. Demzufolge scheint die *::hprK*-Mutante eine hohe PrfA-Aktivität zu haben. Jedoch konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Cellobiose-Aufnahme und Verwertung in der *::hprK*-Insertionsmutante dennoch zu einer Hemmung der PrfA-Aktivität führte. Demzufolge exprimiert die Insertionsmutante *::hprK* kein konstitutiv aktives PrfA. Konstitutiv aktives PrfA würde in seiner Aktivität durch verschiedene Umwelteinflüsse, wie z.B. durch Cellobiose-Verwertung, die sich normalerweise im WT hemmend auf die PrfA-Aktivität auswirkt, nicht beeinflusst werden (Kreft & Vázquez-Boland, 2001, Milenbachs *et al.*, 1997, Park & Kroll, 1993). Jedoch ist der hemmende Effekt der Cellobiose-Verwertung in der *::hprK*-Mutante nicht so stark ausgeprägt wie im WT. Geht man davon aus, dass PrfA im aktiven Zustand vorliegt und erst durch einen noch unbekanntem Faktor in seiner Aktivität gehemmt wird, so müsste dieser Faktor in der *::hprK*-Mutante bei der Cellobiose-Aufnahme und Verwertung zwar vorhanden sein aber im Vergleich zum WT in geringerer Konzentration. Der Einfluss der Cellobiose-Aufnahme und Verwertung im Hinblick auf die PrfA-Aktivität konnte in der *::ptsH*-Insertionsmutante nicht bestimmt werden, da ein PTS-abhängiger Cellobiose-Transport und somit ein Wachstum der *::ptsH*-Mutante in Cellobiose-haltigem MM (fehlendes HPr-Protein), wie erwartet, nicht möglich war.

Wie auch schon in BHI, zeigte die *::hprK*-Mutante in definiertem MM in Gegenwart von Glukose im Vergleich zum WT eine verstärkte PrfA-abhängige Virulenzgenexpression. In der früh-logarithmischen Wachstumsphase, in der ein aktiver PTS-abhängiger Glukose-Transport erfolgt, war der Expressionsunterschied zwischen WT und *::hprK*-Mutante besonders deutlich.

Die geringe PrfA-Aktivität in der *::ccpA*-Insertionsmutante und die gesteigerte in *::hprK*- und *::ptsH*-Insertionsmutanten beruht auf den Verlust der KKR-Komponenten CcpA, HPrK/P und HPr. Polare Effekte, ausgehend von der pSM1-2 Insertion auf die benachbarten Gene von *ccpA* (*tyrS*) und *hprK* (*lmo2480*, *lmo2481*, *lgt* und *lmo2484*), die sich auf die Modulation der PrfA-Aktivität auswirken könnten, konnten mittels Real-time RT-PCR ausgeschlossen werden. Obwohl die Insertion pSM-3 in das *ptsH*-Gen zum Ausfall des gesamten Operons, bestehend aus *ptsH* und *ptsI*, (*lmo1003*) führte, sollte der zusätzliche Verlust des *ptsI*-Gens, kodierend für Enzym I (EI), keinen zusätzlichen Einfluss auf den Phänotyp der *::ptsH*-Mutante haben. Da EI keine weitere bekannte Funktion besitzt, außer HPr am His15 zu phosphorylieren (Chauvin *et al.*, 1996a), sollte auch die PrfA-Aktivität nicht beeinflusst werden. Durch die Southern Blot-Analyse konnte zusätzlich ausgeschlossen werden, dass die Insertionen pSM1-3 sequenzspezifisch in das listerielle Genom erfolgten und somit zu einer veränderten PrfA-Aktivität führen könnten. Da die entsprechenden Revertanten *RccpA*, *RhprK* und *RptsH* in ihrer PrfA-abhängigen Virulenzgenexpression wieder einen wildtypischen Phänotyp zeigten, können weitere ungewollte Mutationen, die möglicherweise für den charakteristischen Phänotyp der KKR-Mutanten verantwortlich sein könnten, ebenfalls ausgeschlossen werden.

Die *::ptsH*-Insertionsmutante repliziert trotz einer gesteigerten PrfA-regulierten Virulenzgenexpression in J744 Makrophagen deutlich weniger als der WT. Obwohl Virulenzfaktoren, die für das Entkommen aus dem primären und sekundären Phagosom (LLO, PlcA und B), eine Vermehrung (UhpT) und für die Zell-zu-Zell-Ausbreitung (ActA) verantwortlich sind (Dussurget *et al.*, 2004), in der *::ptsH*-Mutante verstärkt exprimiert werden, konnte im Zytosol von J744 Makrophagen eine geringere Replikation nachgewiesen werden. Der Grund dafür könnte ein mögliches Defizit in der Kohlenstoffaufnahme sein. Das HPr-Protein (kodiert vom *ptsH*-Gen) ist am PTS-abhängigen Zuckertransport (Postma *et al.*, 1993) sowie an der Glyzerin- und Dihydroxyaceton-Verwertung (Gutknecht *et al.*, 2001, Deutscher *et al.*, 1993) beteiligt. Sollten C3-Quellen, wie Glyzerin oder Dihydroxyaceton für den intrazellulären Metabolismus von *L. monocytogenes* von Bedeutung sein, so könnte der Verlust des HPr-Proteins die verringerte Replikationsrate in der *::ptsH*-Insertionsmutante erklären. Die intrazelluläre Verwertung von PTS-gängigen Zuckern, wie Glukose und Mannose und damit abhängige von HPr, ist aufgrund der vorhandene Daten eher unwahrscheinlich (siehe auch Abschnitt 6.5.3).

6.2 Einfluss der Kohlenstoff-Katabolitrepression auf die PrfA-abhängige Virulenzgenexpression in *L. monocytogenes*

Daten aus Literatur und Daten dieser Arbeit sprechen für einen möglichen Einfluss der Kohlenstoff-Katabolitrepressions (KKR)-Kontrolle auf die PrfA-abhängigen Virulenzgenexpression in *L. monocytogenes* (Milenbachs *et al.*, 1997). Vergleichende Transkriptomstudien der PrfA- und PrfA*-überexprimierenden *L. monocytogenes*-Stämme (EGD), die eine gesteigerte Virulenzgenexpression aufweisen, zeigten unter gleichen Bedingungen eine Regulation zahlreicher Stoffwechselfgene, die in *B. subtilis* unter KKR stehen (Marr *et al.*, 2006).

Untersuchungen der PrfA-Aktivität in den KKR-Mutanten *::ccpA*, *::hprK* und *::ptsH* haben gezeigt, dass sich der Verlust von CcpA hemmend und der von HPr-Kinase/Phosphorylase (HPrK/P) sowie HPr-Protein stimulierend auf die PrfA-Aktivität und somit auf die PrfA-abhängige Virulenzgenexpression ausgewirkt haben (siehe Abschnitt 6.1.2). Betrachtet man die *::ccpA*-, *::hprK*- und *::ptsH*-Mutanten von *L. monocytogenes* hinsichtlich ihrer Fähigkeit, HPr am Ser46 oder His15 phosphorylieren zu können, so waren, wie erwartet, eindeutige Unterschiede zu erkennen. Das hitzestabile HPr kann in vier verschiedenen Zuständen vorliegen: unphosphoryliertes HPr, His15-phosphoryliertes HPr (HPr-His15~P), Ser46-phosphoryliertes HPr (HPr-Ser46~P) und His15-Ser46-doppelt-phosphoryliertes HPr (HPr-His15-Ser46~P) (Vadeboncoeur *et al.*, 1991, Waygood, 1998, Kravanja *et al.*, 1999, Casabon *et al.*, 2006). In der *::ptsH*-Insertionsmutante wird kein HPr und demzufolge auch kein HPr-His15~P und HPr-Ser46~P gebildet. Das Fehlen der HPrK/P führte in der *::hprK*-Mutante den Erwartungen entsprechend zu einem Verlust von HPr-Ser46~P. HPr-His15~P wurde jedoch gebildet. Die *::ccpA*-Mutante in *L. monocytogenes* zeigte für beide Phosphorylierungsformen, HPr-Ser46~P und HPr-His15~P, keine Unterschiede zum Wildtyp. Jedoch zeigten *ccpA*-Mutanten anderer Gram-positiver Bakterien, wie *Enterococcus faecalis* und *B. subtilis*, einen höheren Level an HPr-Ser46~P als der entsprechende WT (Leboeuf *et al.*, 2000, Ludwig *et al.*, 2002b).

Vergleicht man die PrfA-Aktivität und die Fähigkeit zur Bildung von HPr-Ser46~P in den *::hprK*- und *::ptsH*-Mutanten, so besteht eine Korrelation zwischen PrfA-Aktivität und der intrazellulären Konzentration an HPr-Ser46~P. In beiden Insertionsmutanten, die zu keiner HPr-Ser46~P-Bildung fähig waren, konnte eine erhöhte PrfA-Aktivität nachgewiesen werden. Diese Korrelation zwischen HPr-Ser~P-Konzentration und PrfA-Aktivität konnte auch in PrfA-Aktivitäts-Studien von *B. subtilis* beobachtet werden (Herro *et al.*, 2005). Jedoch steht das HPr-Phosphorylierungsmuster der *::ccpA*-Insertionsmutante im Widerspruch zu dieser Theorie, denn obwohl die *::ccpA*-Mutante von *L. monocytogenes* eine dem Wildtyp ähnliche Menge an HPr-Ser46~P aufweist, zeigte sie eine geringere PrfA-abhängige Virulenzgenexpression. Vor diesem Hintergrund stellt sich die Frage, ob HPr-Ser46~P als direkter Modulator der PrfA-Aktivität fungiert.

6.2.1 Untersuchung der HPr-Phosphorylierungsmuster und der PrfA-Aktivität in Glukose-, Cellobiose- und Glycerin-haltigem Minimalmedium

Um zu überprüfen, ob eine Korrelation zwischen PrfA-Aktivität und HPr-Ser46~P-Konzentration (eine der Hauptkomponente der KKR) in *L. monocytogenes* besteht, wurde die PrfA-Aktivität und parallel dazu die Menge an HPr-Ser46~P nach Aufnahme und Verwertung verschiedener Kohlenstoffquellen untersucht.

Es ist bekannt, dass die Aufnahme und Verwertung von PTS (Phosphoenolpyruvat-Phosphotransferase-System)-Zuckern, wie z.B. Glukose, Mannose, Fruktose und insbesondere Cellobiose, einen hemmenden Effekt auf die PrfA-Aktivität haben (Gilbreth *et al.*, 2004, Milenbachs *et al.*, 1997, Park & Kroll, 1993). Im Rahmen dieser Arbeit konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die Aufnahme und Verwertung von Glukose und insbesondere von Cellobiose zu einer geringen PrfA-Aktivität führten. Zusätzlich konnte jedoch gezeigt werden, dass der PTS-unabhängige Transport und die anschließende Verwertung der C3-Verbindung Glycerin in *L. monocytogenes* zu einer erhöhten PrfA-abhängigen Virulenzgenexpression und somit zu einer gesteigerten PrfA-Aktivität führte. Glycerin stellte ein ähnlich gutes Substrat wie Glukose und Cellobiose dar. Die Verwertung von Glukose zeigte vor allem in jenen Wachstumsphasen, in denen ein aktiver PTS-abhängiger Glukose-Transport erfolgte, eine geringere PrfA-Aktivität. Zum Ende der logarithmischen Wachstumsphase und in der früh-stationären Wachstumsphase, wo der PTS-abhängige Glukose-Transport abnimmt, konnte eine gesteigerte PrfA-abhängige Virulenzgenexpression und demzufolge eine gesteigerte PrfA-Aktivität nachgewiesen werden. Dagegen zeigte die PTS-unabhängige Aufnahme und Verwertung von Glycerin schon zu Beginn des Wachstums eine erhöhte PrfA-Aktivität. Für jede untersuchte Wachstumsphase konnte in Gegenwart von Glycerin im Wildtyp eine höhere PrfA-Aktivität als bei der von Glukose nachgewiesen werden. Die Verwertung des Disaccharids Cellobiose führte, wie erwartet, zu einer starken Hemmung der PrfA-Aktivität, die auch in der spät-logarithmischen (OD_{600nm} 1.0) oder früh-stationären (OD_{600nm} 1.5) Wachstumsphase bestehen blieb. Die Art der Kohlenstoffaufnahme – PTS-ab- oder PTS-unabhängig – sowie die PTS-abhängige Kohlenstoffaufnahme-raten in den verschiedenen Wachstumsphasen scheinen einen Einfluss auf die PrfA-Aktivität in *L. monocytogenes* zu haben.

Betrachtet man die verschiedenen HPr-Phosphorylierungsformen des in Glukose gewachsenem Wildtyps, so findet man in den früh-logarithmischen Wachstumsphasen (OD_{600nm} 0.4 und 0.6), in denen ein aktiver PTS-abhängiger Glukose-Transport erfolgt, erwartungsgemäß kaum HPr-His15~P. Bei aktivem Glukose-Transport wird das Phosphat von PEP über EI, HPr-His15~P und den EII-Komplex sofort auf die in die Bakterienzelle transportierte Glukose übertragen. Durch die Metabolisierung der Glukose entsteht in der Glykolyse unter anderem Fruktose-1,6-Bisphosphat und ATP, Metabolite, welche sich stimulierend auf die Kinase-Aktivität des Enzyms HPrK/P auswirken und somit die Generierung von HPr-Ser46~P fördern (Pompeo *et al.*, 2003). Demzufolge konnte im WT in den früh-logarithmischen Wachstumsphasen, in denen ein aktiver Glukose-Transport und

Metabolismus erfolgt, eine größere Menge an HPr-Ser46~P nachgewiesen werden. Die erhöhte Konzentration von HPr-Ser46~P (eine der Hauptregulatorkomponenten der KKR) spricht für eine aktive KKR-Kontrolle unter diesen Wachstumsbedingungen. In Gram-positiven Bakterien reguliert HPr-Ser46~P im Komplex mit CcpA die Transkription zahlreicher kataboler Gene (Moreno *et al.*, 2001, Henkin, 1996). Beim Übergang in die stationäre Wachstumsphase verringerte sich der Glukose-Transport, was erwartungsgemäß zu einem Anstieg der HPr-His15~P-Konzentration führt. Mit verringerter Glukose-Aufnahme verlangsamt sich auch der Glukose-Metabolismus, glykolytische Intermediate wie Fruktose-1,6-Bisphosphat werden kaum noch gebildet, was die Abnahme der HPr-Ser46~P-Menge erklärt. Bezieht man die PrfA-Aktivität in die Diskussion ein, so kann im Falle der Glukose-Verwertung zusammenfassend gesagt werden, dass mit verstärktem PTS-abhängigen Glukose-Transport (geringe Menge an HPr-His15~P), gesteigertem Glukose-Metabolismus und bestehender KKR-Kontrolle (erhöhte Konzentration an HPr-Ser46~P) PrfA in seiner Aktivität gehemmt wird. Je höher die Menge an HPr-Ser46~P desto geringer die PrfA-Aktivität in Glukose-haltigem Minimalmedium. Diese Resultate stehen auch im Einklang mit der Beobachtung einer gesteigerten PrfA-Aktivität in den *::hprK-* und *::ptsH-*Insertionsmutanten, welche beide zu keiner HPr-Ser46~P-Bildung in der Lage waren.

Betrachtet man jedoch das HPr-Phosphorylierungsmuster des Wildtyps in Gegenwart von Cellobiose und Glyzerin zu unterschiedlichen Wachstumsphasen, so scheint HPr-Ser46~P als direkter Modulator der PrfA-Aktivität nicht in Frage zu kommen. Die Aufnahme und Verwertung von Glyzerin- bzw. Cellobiose, welche sich gegensätzlich auf die PrfA-Aktivität auswirkten (Glyzerin-Verwertung stimulierend, Cellobiose hemmend), zeigten ein ähnliches HPr-Phosphorylierungsmuster, was durch einen geringen Anteil an HPr-Ser46~P und einen hohen Anteil an HPr-His15~P (vor allem bei OD_{600nm} 0.6 und 1.0) gekennzeichnet ist. Die hohe intrazelluläre HPr-His15~P-Konzentration in Cellobiose-haltigem MM beruht vermutlich darauf, dass für die Cellobiose-Aufnahme nur die Hälfte an HPr-His15~P verbraucht wird als für Glukose. Da die Verwertung von Cellobiose und Glyzerin ein ähnliches HPr-Phosphorylierungsmuster aufzeigte, scheinen weder HPr-Ser46~P noch HPr-His15~P als direkte Modulatoren der PrfA-Aktivität zu dienen. Letztendlich konnte auch keine Interaktion von PrfA und HPr-Ser46~P in der Biacor und im Elutions-Retardations-Assay gezeigt werden (persönliche Mitteilung S. Müller-Altrock, Gerhard Seidel und N. Marr; (Herro *et al.*, 2005). Auch in *in vitro* Transkriptions-Studien mit PrfA-abhängigen Promotoren konnte keine Inhibition durch HPr-Ser46~P und HPr-His15~P auf die PrfA-abhängige Transkription gezeigt werden (persönliche Mitteilung S. Müller-Altrock). Jedoch schließen die Daten nicht aus, dass HPr-Ser46~P und ein zusätzlicher Kofaktor, sich negativ auf die PrfA-Aktivität auswirken könnte. Dieser Faktor müsste im WT bei der Cellobiose-Verwertung jedoch in größerer Menge gebildet werden als bei der von Glyzerin. Die Vermutung eines zusätzlichen Kofaktors, der im Komplex mit HPr-Ser46~P die PrfA-Aktivität hemmt, könnte auch erklären, warum die *::ccpA*-Insertionsmutante trotz wildtypischer HPr-Ser46~P-Konzentration eine geringere PrfA-Aktivität zeigte. Demzufolge müsste dieser Kofaktor in der *::ccpA*-Mutante vermehrt gebildet werden.

Da die Art der Zuckeraufnahme von *L. monocytogenes* – PTS-ab- bzw. –unabhängig – offenbar einen Einfluss auf PrfA-Aktivität hat, könnten eventuell EIIA-Komponenten spezifischer PTS, die in Abhängigkeit des HPr-Ser46~P/HPr-His15~P-Verhältnisses im phosphorylierten bzw. unphosphoryliertem Zustand vorliegen, sich regulatorisch auf die Aktivität von PrfA auswirken.

6.3 Einfluss der Phosphoenolpyruvat-Phosphotransferase-Systeme auf die PrfA-Aktivität

Es konnte gezeigt werden, dass bei aktiver PTS-abhängiger Glukose-Aufnahme (früh-logarithmische Wachstumsphase OD_{600nm} von 0.4 und 0.6) die PrfA-abhängige Virulenzgenexpression gering und somit die PrfA-Aktivität unter diesen Bedingungen gehemmt war. Im Gegensatz dazu wies der PTS-unabhängige Transport und die Verwertung von Glycerin schon zu Beginn des Wachstums eine hohe PrfA-Aktivität auf. Zudem zeigen PrfA- bzw. PrfA*-überexprimierende *L. monocytogenes* Stämme, die eine hohe PrfA-Aktivität aufweisen, eine starke Wachstumshemmung in definiertem Minimalmedium (MM) mit Glukose, was auf eine verringerte [¹⁴C]-Glukose-Aufnahme zurückgeführt werden konnte (Marr *et al.*, 2006). Diese Resultate sprechen möglicherweise dafür, dass Komponenten des PTS-abhängigen Zuckertransports an der Modulation der PrfA-Aktivität beteiligt sind. In *E. coli* konnte eine Interaktion von Komponenten des Glukose-spezifischen PTS und einem globalen Transkriptionsregulator Mlc (*making large colonies*) nachgewiesen werden (Nam *et al.*, 2001). Ferner konnte in einigen pathogenen Bakterien eine Beteiligung von PTS an der Regulation der Virulenzgenexpression gezeigt werden (Smith *et al.*, 1986,).

Wie die Glukose-Aufnahme in *Listeria monocytogenes* erfolgt, ist noch nicht vollständig geklärt. Neue Daten zeigen, dass das Mannose-spezifische PTS^{Man}, kodiert von lmo0096-98, in *L. monocytogenes* eine Rolle in der Glukose-Aufnahme zu spielen scheint (persönliche Mitteilung R. Stoll). Zudem besitzt dieses PTS eine hohe Homologie zu dem Mannose-spezifischen PTS (kodiert von *manXYZ*) von *E. coli*, welches hier neben dem Fruktose-Transport das hauptverantwortliche PTS für die Glukose-Aufnahme ist (Kornberg & Jones-Mortimer, 1975). Ein PTS-unabhängiger Glukose-Transport mittels ABC-Transporter, wie für *B. subtilis* beschrieben (Wagner *et al.*, 2000), scheint in *L. monocytogenes* nicht zu erfolgen, da die *::ptsH*-Insertionsmutante (fehlendes HPr) kein Wachstum in definiertem MM in Gegenwart von Glukose zeigte. Im Gegensatz zu *B. subtilis* konnte in *L. monocytogenes* kein vollständiges Glukose-spezifisches PTS (PtsG) annotiert werden. In *B. subtilis* - und auch in anderen Bakterien - besteht PtsG aus den Komponenten EIIA, B und C (Gonzy-Treboul *et al.*, 1991). Allerdings haben *in silico*-Analysen gezeigt, dass in *L. monocytogenes* eine EIIA-Komponente, kodiert von lmo1017, vorhanden ist, die zu der entsprechenden EIIA-Komponente des PtsG aus *B. subtilis* eine hohe Homologie aufweist. Die Funktion dieses Glukose-spezifischen EIIA-Proteins (EIIA^{Glc}) wurde in dieser Arbeit genauer untersucht. Die *eIIA^{Glc}*-Deletionsmutante zeigte keine Auffälligkeiten im Wachstum in Gegenwart verschiedener PTS-abhängige Kohlenstoffverbindungen, wie Glukose, Mannose und Cellobiose. Die [¹⁴C]-Glukose-Aufnahmerate entsprach der des Wildtyps. Demzufolge kann

eine Beteiligung des EIIA^{Glc} am PTS-abhängigen Zuckertransport von Glukose, Mannose oder Cellobiose unter den gewählten Wachstumsbedingungen ausgeschlossen werden.

Ebenso in Glycerin-haltigem MM zeigte die *eIIA^{Glc}*-Deletionsmutante keinen Wachstumsunterschied zum WT. Somit erfordert auch die Glycerin-Verwertung von *L. monocytogenes* kein funktionales EIIA^{Glc}-Protein und ist auch nicht von dessen Phosphorylierungszustand, wie für *E. coli* beschrieben (Hurley *et al.*, 1993), abhängig. Die Regulation der Glycerin-Verwertung in *L. monocytogenes* erfolgt, wie für Gram-positive Bakterien typisch, über das HPr-Ser46~P (Reizer *et al.*, 1984). Das erklärt auch den Wachstumsverlust der *::ptsH*-Insertionsmutante (fehlendes HPr) in Glycerin-haltigem Medium.

In der *eIIA^{Glc}*-Deletionsmutante konnte eine gesteigerte PrfA-Aktivität in Glukose-haltigem MM (verstärkte LLO-Aktivität und erhöhte PrfA- bzw. ActA-Expression) gezeigt werden. Besonders in der früh-logarithmischen Wachstumsphase (OD_{600nm} von 0.6), in der ein aktiver PTS-abhängiger Glukose-Transport erfolgt, konnte ein großer Unterschied in der PrfA-Aktivität zwischen $\Delta eIIA^{Glc}$ und Wildtyp nachgewiesen werden. Die Deletion des Mannose-spezifischen PTS (PTS^{Man}, kodiert von lmo0096-98), bestehend aus den EII-Komponenten EIIA, B, C und D, führt in *L. monocytogenes* zu einer verringerten Glukose-Aufnahme und zudem zu einer gesteigerten PrfA-Aktivität (persönliche Mitteilung R. Stoll). Die erhöhte PrfA-Aktivität in $\Delta eIIA^{Glc}$ und ΔPTS^{Man} lässt vermuten, dass EIIA-Komponenten dieser und möglicherweise anderer PTS die PrfA-Aktivität steuern und damit an der Regulation der PrfA-abhängigen Virulenzgenexpression beteiligt sind.

PrfA-Aktivitäts-Studien in Gegenwart von Glukose in verschiedenen Wachstumsphasen (Unterschiede in Glukose-Aufnahmerate), lassen vermuten, dass sich der Phosphorylierungsgrad der EIIA-Komponente spezifischer PTS regulatorisch auf die PrfA-Aktivität auswirkt. In der früh-logarithmischen Wachstumsphase, in der ein aktiver PTS-abhängiger Glukose-Transport erfolgt, liegen die EIIA-Komponenten der für den Transport genutzten PTS im unphosphorylierten Zustand vor (Phosphat wird auf die in die Bakterienzelle transportierte Glukose übertragen). In dieser Wachstumsphase konnte im WT eine geringe PrfA-Aktivität nachgewiesen werden. Dagegen zeigte sich eine gesteigerte PrfA-abhängige Virulenzgenexpression in der spät-logarithmischen und früh-stationären Wachstumsphase, in denen EIIA-Komponenten exprimierter PTS in Folge der verringerten Glukose-Aufnahme im phosphorylierten Zustand verbleiben. Es scheint, dass phosphorylierte EIIA-Komponenten spezifischer PTS einen aktivierenden, dephosphorylierte EIIA-Komponenten dagegen eher einen stimulierenden Effekt auf die PrfA-Aktivität besitzen. Im unphosphorylierten Zustand könnten EIIA-Komponenten spezifischer PTS PrfA binden und dadurch dessen Aktivität hemmen. Die Phosphorylierung der EIIA-Komponente führt zur PrfA-Freisetzung, was eine Expression PrfA-abhängiger Virulenzgene zur Folge hat. Denkbar wäre natürlich auch, dass die phosphorylierte Form EIIA~P PrfA bindet und so dessen Aktivität steigert. EIIA^{Glc} von *L. monocytogenes* ist zwar selbst nicht aktiv am PTS-abhängigen GlukoseTransport beteiligt, wird aber, wie alle anderen EIIA-Komponenten, ebenfalls von HPr-His15~P phosphoryliert, kann in phosphorylierter und dephosphorylierter Form vorliegen und so an der Modulation der PrfA-Aktivität beteiligt sein.

Eine Interaktion von EIIA^{Glc} und PrfA mittels Biacor-Analyse konnte nicht eindeutig gezeigt werden. Nur mit einer großen Menge an EIIA^{Glc} (10 µM) konnte eine schwache Interaktion nachgewiesen werden, die auch nur bedingt quantifiziert werden konnte (S. Müller-Altrock und G. Seidel, persönliche Mitteilung). Auch in *in vitro* Transkriptions-Studien zeigte EIIA^{Glc} keinen eindeutigen Effekt auf die Transkriptionsinitiation bei PrfA-abhängigen Promotoren (persönliche Mitteilung, S. Müller-Altrock). Bei diesen Untersuchungen darf jedoch der Phosphorylierungszustand des gereinigten Glukose-spezifischen EIIA nicht außer Acht gelassen werden. Die Überprüfung des Phosphorylierungszustandes des EIIA^{Glc}-Proteins (Daten nicht dargestellt) hat gezeigt, dass das durch S. Müller-Altrock gereinigte EIIA^{Glc} zur Hälfte im phosphoryliertem Zustand vorliegt. Demzufolge wurden Interaktions- und Transkriptions-Studien mit einem Gemisch an phosphoryliertem bzw. unphosphorylierten EIIA^{Glc} durchgeführt, was eine Erklärung für die nicht eindeutigen Resultate der Biacor- und *in vitro* Transkriptions-Analysen sein könnte. Bei einer erneuten Aufreinigung von EIIA^{Glc}, sollte ein überexprimierender *E. coli*-Stamm mit *ptsH*-Deletion (*ptsH*-Gen kodierend für HPr, welches für die Phosphorylierung der EIIA-Komponenten verantwortlich ist) verwendet werden, um so ein vollständig dephosphoryliertes EIIA^{Glc} zu erhalten. Dieses dephosphorylierte EIIA^{Glc} könnte dann *in vitro* durch Zugabe von PEP, Enzym I und HPr phosphoryliert werden (Charrier *et al.*, 1997b, Zhu *et al.*, 1997). Interaktions- und Transkriptions-Studien könnten erneut mit reinem EIIA^{Glc} bzw. EIIA^{Glc}~P durchgeführt werden. Zusätzlich sollten weitere PTS-Komponenten, z.B. EIIB, auf die Beteiligung an der Modulation der PrfA-Aktivität hin untersucht werden.

Nicht alle EIIA-Komponenten scheinen an der Modulation der PrfA-Aktivität beteiligt zu sein. Bei der Untersuchung einer Vielzahl von PTS-Deletionsmutanten bezüglich ihrer PrfA-Aktivität führten nicht alle PTS-Deletionen zu einer gesteigerten PrfA-abhängigen Virulenzgenexpression (R. Stoll, persönliche Mitteilung). Die Deletion des Mannose-spezifischen PTS (PTS^{Man}), kodiert von lmo0096-0098, führte in *L. monocytogenes* zu einer gesteigerten PrfA-Aktivität (R. Stoll, persönliche Mitteilung). Dieses PTS^{Man} scheint an der Modulation der PrfA-Aktivität beteiligt zu sein. Die Kombination aus PTS-Expressionsmuster und dessen Phosphorylierungszustand scheinen sich regulatorisch auf die PrfA-Aktivität auszuwirken. In der *::ptsH*-Mutante ist aufgrund des fehlenden Enzym I, HPr bzw. HPr-His15~P keine Phosphorylierung der EIIA-Komponenten exprimierter PTS zu erwarten. Im Rahmen dieser Arbeit konnte für die *::ptsH*-Insertionsmutante auf Transkriptions- und Translationsebene eine erhöhte PrfA-Aktivität nachgewiesen werden. Neuere Gesamtgenom-Transkriptom-Daten der *::ptsH*-Insertionsmutante (R. Stoll, persönliche Mitteilung) zeigten jedoch eher eine Runterregulation der Transkription der PrfA-abhängigen Gene. Gleichzeitig ist auch die Transkriptmenge der für das Glucose/Mannose PTS^{Man} kodierenden Gene lmo0096-98 in der *::ptsH*-Mutante im Vergleich zum Wildstamm zwar stark reduziert, aber noch vorhanden. Jedoch kann diese geringe Menge an PTS^{Man} in der *::ptsH*-Mutante aufgrund des fehlenden HPr bzw. HPr-His15~P nicht phosphoryliert werden und erklärt damit die schwache Inhibition der PrfA-Aktivität in der *::ptsH*-Mutante. Meine dazu im Widerspruch stehenden Daten könnten auf die unterschiedlichen BHI Chargen, die in unseren Versuchen

verwendet wurden, zurückzuführen sein. Es ist bekannt, dass BHI-Chargen in ihrer Zusammensetzung, vor allem auch bezüglich des Zuckergehalts, erheblich schwanken. Die Genexpression von lmo0096-98, kodierend für das PTS^{Man}, hängt stark von der Zuckerzusammensetzung im Medium ab (Dalet *et al.*, 2001, Stoll *et al.*, 2008; submitted). Die verwendete BHI-Charge könnte aufgrund einer niedrigeren Zuckerkonzentration zu einer noch niedrigeren Expression der PTS-Gene lmo0096-98 als in den Transkriptomexperimenten von Frau Stoll führen. Eine Hemmung der PrfA-Aktivität durch Bindung von PrfA an die unphosphorylierte EIIA-Komponente des PTS^{Man} könnte dann in der *::ptsH*-Mutante nicht mehr erfolgen. Im Vergleich zum Wildstamm würde sich so eine erhöhte PrfA-Aktivität in der *::ptsH*-Insertionsmutante ergeben.

Im Gegensatz dazu wird in der *::hprK*-Insertionsmutante aufgrund der fehlenden HPr-Kinase/Phosphorylase nur HPr-His15~P gebildet, was letztlich die Phosphorylierung von EIIA aller exprimierten PTS ermöglicht. Im phosphorylierten Zustand könnten sich EIIA (vielleicht auch EIIB) spezifischer PTS stimulierend auf die PrfA-Aktivität auswirken und, wie für die *::hprK*-Mutante beschrieben, zu einer gesteigerten PrfA-abhängigen Virulenzgenexpression führen.

In Microarray-Transkriptionsstudien zeigte die *::ccpA*-Insertionsmutante im Vergleich zum WT eine verstärkte Transkription zahlreicher Gene kodierend für PTS-Komponenten. Durch den Verlust des CcpA-Proteins in der *::ccpA*-Mutante kommt es zu einer Inaktivierung der KKR-Kontrolle und zahlreiche Gene, die im WT unter diesen Bedingungen unter KKR-Kontrolle stehen, wurden verstärkt exprimiert. Obwohl für die *::ccpA*-Insertionsmutante die gleiche HPr-His15~P-Konzentration wie im WT nachgewiesen werden konnte, reicht möglicherweise die Menge an HPr-His15~P nicht aus, um eine vollständige EIIA-Phosphorylierung aller exprimierten PTS in der *::ccpA*-Mutante zu gewährleisten. Einige EIIA, die an der Regulation der PrfA-Aktivität beteiligt sind, verbleiben möglicherweise im unphosphorylierten Zustand, binden PrfA und hemmen somit dessen Aktivität. Dies könnte die geringere PrfA-Aktivität in der *::ccpA*-Insertionsmutante im Vergleich zum WT erklären.

Die unterschiedlichen PrfA-Aktivitäten in den *::ccpA*- und *::hprK*-Insertionsmutanten - *::ccpA*-Mutante geringe PrfA-Aktivität und *::hprK*-Mutante gesteigerte PrfA-Aktivität - lässt sich möglicherweise mit dem unterschiedlichen PTS-Expressionsmuster erklären. Beide Insertionsmutanten zeigten in der Gesamtgenom-Transkriptom-Analyse zum einen Übereinstimmungen (Gruppe I) aber auch Unterschiede (Gruppe II und III) im PTS-Genexpressionmuster. Diese Differenzen im PTS-Expressionsmuster führen unter Umständen zu den Unterschieden in der PrfA-Aktivität. Dies gilt es aber noch näher zu untersuchen.

Durch die veränderte Aminosäuresequenz und die damit verbundene Konformationsänderung im PrfA*-Protein (Ripio *et al.*, 1997b, Eiting *et al.*, 2005a) wird die Bindung an das die PrfA-Aktivität hemmende unphosphorylierte EIIA verhindert und führt zu einem konstitutiv aktiven PrfA-Protein (PrfA*).

6.4 Die Glukose-6-Phosphat-Verwertung in *L. monocytogenes*

6.4.1 Wachstum in Glukose-6-Phosphat-haltigem Medium

Die beiden pathogenen Listerien-Arten *L. monocytogenes* und *L. ivanovii* besitzen das *uhpT*-Gen, kodierend für den Hexose-Phosphat-Transporter UhpT, der für den Transport von Phosphat-Zuckern, wie Glukose-1-, Glukose-6-, Fruktose-6- und Mannose-6-Phosphat verantwortlich ist. Die Verwertung von Phosphat-Zuckern spielt bei der intrazellulären Vermehrung von *L. monocytogenes* eine Rolle, da der Verlust von UhpT in einer verminderten Virulenz und zu einer verringerten Replikationsrate der Listerien im eukaryotischen Zytosol der Wirtszelle führt (Chico-Calero *et al.*, 2002). Die Verwertung von Glukose-1-Phosphat (G1P) ermöglicht *in vitro* ein effizientes listerielles Wachstum, ohne jedoch die PrfA-abhängige Virulenzgenexpression zu hemmen (Ripio *et al.*, 1997a). Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Wachstum von *Listeria monocytogenes* in Gegenwart von Glukose-6-Phosphat (G6P) untersucht und die Expression der Virulenzfaktoren LLO, PrfA und ActA näher analysiert. Durch Bestimmung der intrazellulären Konzentration von HPr-Ser46~P (eine der KKR-Hauptkomponenten) und Analyse des Genexpressionsprofils wurde zusätzlich die Auswirkung der G6P-Verwertung hinsichtlich der Kohlenstoff-Katabolitrepression (KKR) untersucht.

Die G1P-Aufnahme ist strikt PrfA-abhängig, da eine Transposon-Insertion im intergenischen Bereich des *prfA-plcA*-Operons kein Wachstum in Gegenwart von G1P zeigte (Ripio *et al.*, 1997a). Im Promotorbereich des *uhpT*-Gens konnte eine PrfA-Bindungsstelle mit nur einem Mismatch identifiziert werden (Kreft & Vázquez-Boland, 2001). Eine G6P- bzw. G1P-Aufnahme in *L. monocytogenes* erfordert eine gesteigerte PrfA-Aktivität. In definiertem Minimalmedium (MM) bzw. LB-Medium konnte in Gegenwart von G6P kein Wachstum des Wildtyps nachgewiesen werden. Es scheint, dass in diesem Medium keine ausreichende Stimulierung der PrfA-Aktivität erfolgte, so dass eine UhpT-Expression nicht möglich war. Diese Beobachtung konnten auch M. T. Ripio und Kollegen in ihrer Arbeit machen. Hier war der Wildstamm P14 in LB-Medium, supplementiert mit G1P, zu keinem Wachstum fähig. Erst eine Vorbehandlung des Wachstumsmediums mit Aktivkohle (stimuliert PrfA-Aktivität, Ripio *et al.*, 1996), führte zu einem Wachstum in G1P-haltigem LB-Medium (Ripio *et al.*, 1997a). In Anlehnung an dieses Resultat und an weitere PrfA-Aktivitäts-Studien (Joseph *et al.*, 2008; submitted, Ermolaeva *et al.*, 2004), wurden in dieser Arbeit zwei Methoden entwickelt, die zu einer gesteigerten PrfA-Aktivität führten und somit ein effizientes Wachstum von *Listeria monocytogenes* in Gegenwart von G6P ermöglichten. Durch die Zugabe von Amberlite XAD-4 in G6P-haltiges LB-Medium oder Vorzucht in Glycerin-haltigem MM konnte ein effizientes Wachstum von *L. monocytogenes* in Gegenwart von G6P erzielt werden.

Amberlite XAD-4 weist eine große Ähnlichkeit zu Aktivkohle auf und führt bei Zugabe zum Wachstumsmedium zu einer gesteigerten PrfA-Aktivität (M. Rauch, persönliche Mitteilung). In der Literatur wird diskutiert, dass *L. monocytogenes* während des exponentiellen

Wachstums eine noch unbekannte, niedermolekulare, diffusionsfähige Substanz bildet, die durch Bindung an PrfA dessen Aktivität hemmt. Amberlite XAD-4 scheint in der Lage zu sein, diesen hydrophoben PrfA-Repressor zu absorbieren und somit die PrfA-Aktivität zu stimulieren (Ermolaeva *et al.*, 2004). Zusätzlich zeigte die Kristall-Struktur-Analyse von PrfA eine Tasche, die eine Bindung von kleinen, partial-hydrophoben Substanzen ermöglicht (Eiting *et al.*, 2005b). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass, je höher die XAD-4-Konzentration im Wachstumsmedium, desto effizienter das Wachstum von *L. monocytogenes* in G6P-haltigem LB-Medium. Ist eine hydrophobe, niedermolekulare Substanz für die Hemmung der PrfA-Aktivität verantwortlich, so führt eine erhöhte Konzentration von XAD-4 im Wachstumsmedium zu einer effizienteren Bindung des PrfA-Repressors. Letztendlich führt eine höhere XAD-4-Konzentration zu einer gesteigerten PrfA-Aktivität und folglich so zu einem besseren Wachstum von *L. monocytogenes* in G6P-haltigem LB-Medium.

Der WT zeigte in G6P-haltigem LB-Medium mit 5 % XAD-4 in der logarithmischen Wachstumsphase im Vergleich zu Glukose-haltigem ein leicht verringertes Wachstum. Jedoch wird in Gegenwart von G6P die stationäre Wachstumsphase erst bei einer höheren optischen Dichte erreicht (OD_{600nm} von 2.5 im Vergleich zu 2.0 mit Glukose). Diese Beobachtung konnte auch für den P14-A-Stamm in Gegenwart von G1P (konstitutiv aktives PrfA*) gemacht werden (Ripio *et al.*, 1997a). Der Phosphatanteil in G6P könnte für das gesteigerte Wachstum verantwortlich sein. Durch Zugabe von Phosphat (10 mM) erreichte der P14-A-Stamm in Glukose-haltiges LB-Medium eine dem G1P-haltigem Medium entsprechende optische Dichte in der stationären Phase (Ripio *et al.*, 1997a).

Nach Vorzucht in Glyzerin-haltigem MM unterschied sich das Wachstum von *L. monocytogenes* in definiertem G6P-haltigen MM in der logarithmischen Wachstumsphase kaum von dem in Glukose-haltigem MM. Aber auch in definiertem MM erlangt der in G6P-gewachsene WT die stationäre Phase erst bei einer höheren optischen Dichte als in Glukose-haltigem MM. Hier scheint ebenfalls der Phosphatanteil in G6P (siehe oben) für die Wachstumssteigerung verantwortlich zu sein.

Die $\Delta uhpT$ - und $\Delta prfA$ -Mutanten (fehlender Hexose-Phosphat-Transporter UhpT bzw. fehlendes PrfA-Protein) zeigten erwartungsgemäß in G6P-haltigem Medium im Vergleich zu Glukose-haltigem Medium kein Wachstum. Diese Beobachtung bestätigt die schon durch I. Chico-Calero und M.T. Ripio veröffentlichten Daten, dass das Wachstum mit G6P die PrfA-abhängige Expression des Hexose-Phosphat-Transporters UhpT erfordert (Ripio *et al.*, 1997a, Chico-Calero *et al.*, 2002). Die zusätzlich in dieser Arbeit hergestellte $\Delta glpD/dhaK/uhpT$ -Mutante (*glpD* = Glyzerin-3-Phosphat-Dehydrogenase; *dhaK* = Dihydroxyaceton-Kinasen kodiert von lmo0347-48 und lmo2695-96; *uhpT* = Hexose-Phosphat-Transporter) wies aufgrund des fehlenden Hexose-Phosphat-Transporters UhpT einen Wachstumsverlust in G6P-haltigem MM auf (siehe dazu auch Abschnitt 6.5.3).

6.4.2 Einfluss der G6P-Verwertung auf die PrfA-abhängige Virulenzgenexpression

Wie bereits in der Literatur beschrieben, zeigte die G1P-Verwertung in *L. monocytogenes*, im Gegensatz zu der von unphosphorylierten Zuckern (wie z.B. Glukose, Mannose, Fruktose und Cellobiose), eine gesteigerte PrfA-abhängige Virulenzgenexpression. Der P14-Stamm zeigte nach G1P-Aufnahme und Verwertung eine erhöhte *plcB*-Expression (Ripio *et al.*, 1997a).

In dieser Arbeit wurde der Einfluss der Glukose-6-Phosphat (G6P)-Aufnahme und Verwertung auf die PrfA-abhängige Virulenzgenexpression mittels Hämolyse-Assay und Western Blot-Analysen näher untersucht. Die Anzucht des WT in G6P-haltigem Medium erfolgte durch zwei unterschiedliche Methoden, die beide zu einer Steigerung der PrfA-Aktivität führten und so eine Expression des UhpT ermöglichten. Der WT wurde einerseits in G6P-haltigem LB-Medium mit 5 % XAD-4 und andererseits in definiertem MM mit G6P nach Vorzucht in Glycerin-haltigem MM angezogen.

Der WT zeigte in G6P-haltigem LB-Medium mit 5 % XAD ($G6P^{XAD}$) eine höhere LLO-Aktivität als in Glukose-haltigem LB-Medium mit 5 % XAD (G^{XAD}). Anhand der gesteigerten LLO-Aktivität können Rückschlüsse auf die PrfA-abhängige *hly*-Genexpression und damit auf die PrfA-Aktivität nach G6P-Verwertung gezogen werden. Die ActA- und PrfA-Expression im Western Blot liess keine eindeutigen Aussagen über die PrfA-Aktivität zu. Während die PrfA-Expression in $G6P^{XAD}$ -haltigem LB-Medium erhöht war, konnte in der ActA-Expression kein Unterschied zwischen G^{XAD} - und $G6P^{XAD}$ -Verwertung gezeigt werden. Der einzige erkennbare Unterschied zwischen G^{XAD} - und $G6P^{XAD}$ -haltigem LB-Medium liegt im ActA-Abbaumuster. Es scheint, als ob der WT in $G6P^{XAD}$ -haltigem LB-Medium eine höhere proteolytische Aktivität aufweist, die zu einem stärkeren ActA-Abbau führte.

Letztendlich zeigte der WT in Gegenwart von $G6P^{XAD}$ im Vergleich zu der von G^{XAD} eine zusätzliche Steigerung der PrfA-Aktivität, welche auf die G6P-Aufnahme und Verwertung zurückzuführen ist. Eine gesteigerte PrfA-Aktivität konnte hinsichtlich der LLO-Aktivität, der PrfA-Expression und auf Transkriptionsebene für die Virulenzgene *plcA*, *hly*, *actA*, *plcB*, *uhpT* und *inlC* gezeigt werden.

Ohne XAD-4-Zugabe konnte in Glukose-haltigem LB-Medium (G) kaum eine hämolytische Aktivität sowie ActA-Expression nachgewiesen werden. LB-Medium scheint ein für die PrfA-Aktivität hemmendes Medium darzustellen, was auch durch R. Stoll gezeigt werden konnte (Stoll *et al.*, 2008; submitted). Erst durch die XAD-4-Zugabe in Glukose-haltiges LB-Medium (G^{XAD}) ermöglichte den Nachweis einer gesteigerten PrfA-Aktivität auf Transkriptions- und Translationsebene in *L. monocytogenes*. Diese Beobachtungen stimmen mit denen von S. Ermolaeva und Kollegen überein und es wird diskutiert, dass XAD-4 in der Lage zu sein scheint, einen noch unbekanntem, niedermolekularen, diffusionsfähigen hydrophoben PrfA-Repressor zu absorbieren und somit eine gesteigerte PrfA-Aktivität hervorruft (Ermolaeva *et al.*, 2004).

Ob der PrfA-stimulierende Effekt durch XAD-4 im Wachstumsmedium und die durch die PTS-Komponente EIIA modulierte PrfA-Aktivität in Zusammenhang stehen, gilt es noch näher zu analysieren. Da im WT zwischen G- und G^{XAD} -haltigem LB-Medium sowohl im HPr-Phosphorylierungsmuster (indirekter Hinweis auf EIIA-Phosphorylierungszustand) als

auch im PTS-Expressionsmuster bei OD_{600nm} von 1.0 keine Unterschiede erkennbar waren, scheinen XAD-4-Zusatz und EIIA-Phosphorylierungszustand die PrfA-Aktivität unterschiedlich zu steuern.

Die Untersuchung der PrfA-Aktivität in G6P-haltigem Minimalmedium mit einer vorherigen Anzucht in Glycerin-haltigem MM ergab eher widersprüchliche Resultate. Der WT zeigte in definiertem MM in Gegenwart von G6P kaum LLO-Aktivität und war zudem deutlich geringer als in der von Glukose. Mögliche pH-Wert Unterschiede zwischen Glukose- bzw. G6P-haltigem MM, die sich zum einen auf die *hly*-Expression (Behari & Youngman, 1998a) oder zum anderen auf die LLO-Aktivität direkt auswirken könnten (Bavdek *et al.*, 2007), konnten durch pH-Wert-Messungen ausgeschlossen werden. Warum der WT in G6P-haltigem MM eine geringere hämolytische Aktivität aufweist als in Glukose-haltigem Medium, bleibt unklar. Dagegen zeigte die Western Blot-Analyse eine leicht gesteigerte ActA- und PrfA-Expression nach G6P-Verwertung in definiertem MM.

Beide Methoden zur effizienten Anzucht in G6P-haltigem Medium (XAD-4-Zugabe, Vorzucht in Glycerin-haltigem MM) ermöglichten die strikt PrfA-abhängige G6P-Verwertung und ließen eine Untersuchung der PrfA-Aktivität unter diesen Wachstumsbedingungen zu. Wie bereits für die G1P-Aufnahme und Verwertung in *L. monocytogenes* P14 eine gesteigerte PrfA-abhängige Virulenzgenexpression (*plcB*-Expression) gezeigt wurde (Ripio *et al.*, 1997a), so konnte auch erwartungsgemäß für die G6P-Aufnahme und Verwertung in *L. monocytogenes* EGD-e ein stimulierender Effekt auf die PrfA-Aktivität nachgewiesen werden. In Abschnitt 6.3 wurde schon diskutiert, dass EIIA bestimmter listerieller Phosphoenolpyruvat-Phosphotransferase-Systeme (PTS) an der Modulation der PrfA-Aktivität beteiligt sein könnten. Bei aktivem Glukose-Transport, wo EIIA in dephosphorylierter Form vorliegt, konnte eine geringe PrfA-Aktivität nachgewiesen werden. EIIA oder andere PTS-Komponenten (z.B. EIIB oder C) könnten in unphosphoryliertem Zustand durch eine mögliche Bindung von PrfA dessen Aktivität hemmen. Eine Phosphorylierung von EIIA oder anderen PTS-Komponenten (bei verringerter Glukose-Aufnahme) würde zur Freisetzung und damit zur Aktivierung von PrfA führen. Die Beteiligung von EIIA oder anderen PTS-Komponenten an der Steuerung der PrfA-Aktivität und somit an der Regulation der PrfA-abhängigen Virulenzgenexpression erklärt unter Umständen auch die gesteigerte PrfA-Aktivität in *L. monocytogenes* in G6P-haltigem Medium. Da G6P PTS-unabhängig mittels des Hexose-Phosphat-Transporters UhpT aufgenommen wird und der G6P-Transport somit zu keiner Dephosphorylierung der PTS-Komponenten führt, müssten alle exprimierten PTS-Komponenten im phosphoryliertem Zustand vorliegen. Die Untersuchung des HPr-Phosphorylierungsmusters in Gegenwart von G6P hat gezeigt, dass HPr-His15~P in ausreichender Menge gebildet wurde, so dass davon ausgegangen werden kann, dass EIIA-Komponenten jene PTS, die an der Regulation der PrfA-Aktivität beteiligt sind, in phosphorylierter Form vorliegen. Unter diesen Bedingungen wird PrfA nicht von EIIA gebunden, liegt so in seiner aktiven Form vor und könnte als Transkriptionsaktivator fungieren.

G1P und G6P stellen Abbauprodukte des Glykogens (Glukosespeicher in Muskel- und Leberzellen menschlicher und tierischer Organismen) dar und werden kontinuierlich ins Zytoplasma der Zelle freigesetzt (Magnusson *et al.*, 1994). Die Daten zeigten, dass *L. monocytogenes* G1P (Ripio *et al.*, 1997a) und G6P (diese Arbeit) *in vitro* als Kohlenstoff- und Energiequelle nutzen kann. Auch im intrazellulären Lebenszyklus könnten die Phosphat-Zucker eine Rolle spielen, da interessanterweise Hepatozyten, die einen hohen Prozentsatz an Glykogen aufweisen, eine wichtige Rolle in der listeriellen Pathogenese darstellen (Conlan & North, 1992). Die PTS-unabhängige Aufnahme von G1P und G6P erfolgt über den Hexose-Phosphat-Transporter UhpT, der auch nur in den pathogenen Listerien-Arten *L. monocytogenes* und *L. ivanovii* anzutreffen ist (Glaser *et al.*, 2001). Der Verlust des Hexose-Phosphat-Transporters UhpT in *L. monocytogenes* führt zu einer verminderten Virulenz und zu einer verringerten Replikationsrate im eukaryotischen Zytoplasma der Wirtszelle (Chico-Calero *et al.*, 2002). Anders als PTS-gängige Zucker, wie z.B. Glukose oder Cellobiose, führt die G1P- (Ripio *et al.*, 1997a) und G6P-Verwertung (diese Arbeit) zu einer gesteigerten PrfA-abhängigen Expression der Virulenzfaktoren, die für das Entkommen aus dem primären und sekundären Phagosom, die intrazelluläre Vermehrung und die Zell-zu-Zell-Ausbreitung von *L. monocytogenes* erforderlich sind.

6.4.3 Einfluss der Glukose-6-Phosphat-Verwertung auf die Kohlenstoff-Katabolitrepression

Ein Großteil der Daten spricht dafür, dass Komponenten der Kohlenstoff-Katabolitrepression (KKR) oder des PTS (Phosphoenolpyruvat-Phosphotransferase-System)-abhängigen Zuckertransports an der Modulation der PrfA-Aktivität und somit an der Regulation der PrfA-abhängigen Virulenzgenexpression beteiligt sind. Aus diesem Grund sollte der KKR-Status im WT nach Verwendung von Glukose-6-Phosphat (G6P) genauer untersucht werden. Dazu wurde im Western Blot das HPr-Phosphorylierungsmuster und parallel dazu mittels Gesamtgenom-Transkriptom-Studien die Genexpression unter diesen Bedingungen bestimmt.

In Gegenwart von G6P zeigte der WT im Vergleich zu der von Glukose kein HPr-Ser46~P (neben CcpA eine Hauptregulatorprotein der KKR in Gram-positiven Bakterien; Deutscher *et al.*, 2006). Diese Beobachtung konnte sowohl in definiertem MM mit G6P nach vorheriger Anzucht in Glycerin-haltigem Medium als auch in LB-Medium mit 5 % XAD-4 gemacht werden. Die XAD-4-Zugabe im Glukose-haltigen LB-Medium hat dabei keinen Einfluss auf die HPr-Ser46~P-Bildung. Unabhängig von der Ab- und Anwesenheit von XAD-4 in G6P-haltigem Medium, zeigte der WT eine vergleichbare Menge an HPr-Ser46~P und auch HPr-His15~P. Durch die Abwesenheit von HPr-Ser46~P, welches im Komplex mit CcpA die Transkription zahlreicher kataboler Gene reguliert, kann von einer inaktiven KKR-Kontrolle im WT in Gegenwart von G6P ausgegangen werden. Parallel durchgeführte Gesamtgenom-Transkriptom-Analysen unterstützen diese Annahme. Eine Vielzahl von Genen, kodierend für zahlreiche PTS-Komponenten, ABC-Transporter, Enzyme des Glycerin-Metabolismus (*glpD*, lmo1538-39), die in *B. subtilis* unter KKR stehen, wurden in G6P-haltigem Medium verstärkt transkribiert. Ferner konnte eine Übereinstimmung im

Genexpressionsmuster des in G6P-haltigem Medium gewachsenen WT und den *::ccpA-* und *::hprK-*Insertionsmutanten (Mutanten der KKR) festgestellt werden. Ein Vergleich der Gene, die durch G6P-Verwertung im WT reguliert wurden, mit in Glycerin-haltigem MM regulierten, wies eine Übereinstimmung von 22,4 % bei den hochregulierten und 13,5 % bei den herunterregulierten Genen auf. Ebenfalls zeigte die Analyse des HPr-Phosphorylierungsmusters in Glycerin-haltigem MM bei vergleichbarer optischer Dichte kein HPr-Ser46~P (Joseph *et al.*, 2008; submitted).

Die vergleichenden Gesamtgenom-Transkriptom-Analysen G / G^{XAD} zeigten, dass nur eine geringe Anzahl an Genen durch die XAD-4-Zugabe in ihrer Transkription beeinflusst wurden. Unter diesen Genen befinden sich, wie erwartet, die PrfA-abhängigen Virulenzgene (siehe Abschnitt 6.4.2) und Gene, die sich mit einigen Ausnahmen jedoch von jenen Genen unterscheiden, welche durch die G6P-Verwertung reguliert wurden. Folglich ist die Inaktivierung der KKR-Kontrolle und die erhöhte PrfA-abhängige Virulenzgenexpression auf die G6P-Verwertung im WT zurückzuführen.

Die Untersuchung des HPr-Phosphorylierungsmusters und Gesamtgenom-Transkriptom-Studien des WT ergaben, dass die G6P-Verwertung im WT zu einer inaktiven KKR-Kontrolle führte. Obwohl G6P als auch Glukose, welche durch den PTS-abhängigen Transport in G6P umgewandelt wird, in die Glykolyse eingeschleust werden, beide zur Bildung glykolytischer Zwischenprodukte, wie z.B. Fruktose-1,6-Bisphosphat, die sich regulatorisch auf die HPr-Kinase-Aktivität und somit auf die Generierung von HPr-Ser46~P auswirken (Pompeo *et al.*, 2003), beitragen, zeigte sich ein unterschiedliches HPr-Phosphorylierungs- und Genexpressionsmuster.

Die antagonistischen Aktivitäten, vereint in der HPr-Kinase/Phosphorylase (HPrK/P), werden durch die zelluläre Konzentration von Fruktose-1,6-Bisphosphat, ATP und anorganischem Phosphat P_i reguliert (Deutscher & Saier, 1983, Deutscher *et al.*, 1985, Kravanja *et al.*, 1999). Die intrazelluläre Konzentration dieser Substanzen variiert und hängt stark von der verwerteten Kohlenstoffquelle ab (Deutscher *et al.*, 2006). Die Abwesenheit von HPr-Ser46~P in G6P-haltigem Medium könnte zum einen durch eine fehlende bzw. verringerte HPr-Kinase-Aktivität oder zum anderen durch eine verstärkte HPr-Phosphorylase-Aktivität erklärt werden. Somit könnte die G6P-Verwertung in *L. monocytogenes* im Gegensatz zu der von Glukose, zu einer gesteigerten Bildung von anorganischem Phosphat P_i führen, was die Phosphorylase-Aktivität der HPr-Kinase/Phosphorylase stimulieren würde (Deutscher *et al.*, 1985) und zur Dephosphorylierung von HPr-Ser46~P führt. Bei dem Hexose-Phosphat-Transporter UhpT aus *E. coli* handelt es sich um einen Phosphat-Antiporter. Da die treibende Kraft für den G6P-Transport in die Zelle der auswärts gerichtete Transport von P_i ist, sollte der Level an intrazellulärem P_i bei aktivem G6P-Transport eher gering sein (Kadner *et al.*, 1992, Weston & Kadner, 1988, Sonna *et al.*, 1988). Handelt es sich bei dem listeriellen Hexose-Phosphat-Transporter, wie in *E. coli*, ebenso um einen Phosphat-Antiporter, so kann eine erhöhte P_i -Konzentration in Gegenwart von G6P eher ausgeschlossen werden.

Denkbar wäre natürlich auch, dass im WT bei Glukose- und G6P-Verwertung Unterschiede in der intrazellulären Menge an Fruktose-1,6-Bisphosphat auftreten. Die ATP-abhängige HPr-Phosphorylierung durch die HPr-Kinase aus *B. subtilis* zeigte bei einer 10 mM

Fruktose-1,6-Bisphosphat-Menge ihre maximale Aktivität, dagegen verschwindet diese Aktivität bei einer Fruktose-1,6-Bisphosphat-Konzentration unter 2 mM (Jault *et al.*, 2000). Fruktose-1,6-Bisphosphat könnte, anders als in Glukose, bei der G6P-Verwertung in so geringer Menge vorliegen, dass eine Aktivierung der HPr-Kinase nicht möglich ist und HPr-Ser46~P nicht gebildet werden kann. Ein unterschiedliches Fließgleichgewicht im Glukose- bzw. G6P-Metabolismus könnte zur Bildung verschiedener Fruktose-1,6-Bisphosphat-Konzentrationen in *L. monocytogenes* führen. In *E. coli* konnte gezeigt werden, dass sich das Fließgleichgewicht metabolisierter Kohlenstoffquellen im gleichen Abbauweg, je nach Art der Kohlenstoffquelle (Glukose, Glukose-6-Phosphat und Fruktose), unterscheidet. Obwohl *E. coli* in Glukose und G6P eine gleiche Wachstumsrate aufwies, wurde mehr G6P von der Bakterienzelle aufgenommen, weniger Acetat ins Medium abgegeben und stattdessen mehr Acetyl-CoA gebildet und in den Citrat-Zyklus eingeschleust. Der dafür verantwortliche Regulationsmechanismus ist jedoch noch weitgehend unklar (Holms, 1996).

In *E. coli* wird die G6P-Aufnahme genau reguliert, da ein gesteigerter G6P-Transport (*uhpT*-Gen auf Multicopy-Plasmid; Zugabe von cAMP) sich als lethal erwies. Das Absterben von *E. coli* korrelierte mit der Bildung von Methylglyoxal, einem toxischen Zwischenprodukt der Glykolyse (Kadner *et al.*, 1992, Ackerman *et al.*, 1974). Um die Bildung von Methylglyoxal zu verhindern, wird der Zuckerphosphattransport in *E. coli* auf ein Minimum reduziert und so eine Überladung des glykolytischen Abbauwegs vermieden. Möglicherweise wird in *L. monocytogenes* der G6P-Transport aus demselben Grund auf ein Minimum reduziert. Es ist anzunehmen, dass unter diesen Umständen G6P schnell über die Glykolyse metabolisiert wird und auch das glykolytische Intermediat Fruktose-1,6-Bisphosphat sofort in zwei Moleküle Glycerinaldehyd-3-Phosphat gespalten wird. Folglich ist die intrazelluläre Fruktose-1,6-Bisphosphat-Konzentration gering, so dass die HPr-Kinase in ihrer Aktivität nicht stimuliert werden kann. Letztendlich kann kein HPr-Ser46~P gebildet werden und erklärt die inaktive KKR-Kontrolle im WT in Gegenwart von G6P.

Zusätzlich stellt sich die Frage, ob neben der PrfA-abhängigen Genexpression noch weitere Regulationsmechanismen an der *uhpT*-Expression in *L. monocytogenes* beteiligt sind. *In silico*-Analysen lassen vermuten, dass die *uhpT*-Genexpression in *L. monocytogenes*, wie die von *E. coli* (Merkel *et al.*, 1995, Merkel *et al.*, 1992), unter Kontrolle der Kohlenstoff-Katabolitrepression steht. Im Promotorbereich des *uhpT*-Gens konnte neben der PrfA-Bindestelle (Vázquez-Boland *et al.*, 2001) noch *cre*-Boxen, die eine Bindung des CcpA/HPr-Ser46~P-Komplexes ermöglichen, identifiziert werden. In der Literatur werden zwei 14 bp palindromische Konsensussequenzen beschrieben, die leicht voneinander abweichen: TGWNANCGNTNWCA (Weickert & Chambliss, 1990) und WGNAASCGNWWNCA (Hueck *et al.*, 1994) (W = A oder T; N = jede Base; S = C oder G).

Wie in Abb. 6.1 gezeigt wird, konnten zwei putative *cre*-Boxen mit jeweils einem Mismatch identifiziert werden, die sich entweder 74 bp oder 1024 bp vor dem *uhpT*-Transkriptionsstart befinden. Handelt es sich bei diesen *cre*-Boxen um funktionale Bindungsstellen des CcpA/HPr-Ser46~P-Komplexes, so würde die *uhpT*-Expression von der PrfA-Aktivität und dem Status der KKR in der Bakterienzelle abhängen.

-1024 Cre-Box (1 mismatch)

gatgcgaaaccagccgagggcgttccgtgg **tgacattgcttaca**accaagtatcttttgaatatagcgatggaaaa
aatgttctaaatcatataaaatctttctattaaagccgggtgagactggtgctgttggggccaagtggggctggg
aaaacgacaatttgtaatttggtgcccagtttttacgatgtgtcagctggtgagattacgattgatggtgaaaaat
atataacgattcactttaccgctccttgccgagcacaatcgccgctgctgcagcaagatgttttctgttttctggt
acagttcgtgaaaaatcgcgctacggaaaattagacgctagcgatgaagaaatagagcatgctgtaaaacttgcc
catctttccaaagtagtagaagaaatgccagatggcctcgatacaatcattggcgagcgcgggtgtaaaactttct
ggcggggcaaaaacaacgggttagcaattgcccgaatgtttttgaagaatccgcctattttaattttggatgaagca
acgctcggcacttgatacagaaaacggagcaagtgattcaagcctcgttagaagagttagcggaaaggaagaacgact
ttaattatcgccgacagactcgcaacgattaaacatgccgatcgaattatcgttgtaaatgaaacagggcatcgca
gaaacgggaacgcatgatgagcttttagcgcgaagataatgggtgcctataagcgattatatgatgccagtttaat
Stopcodon lmo0837
acaatt **taa**tgaataaaaaactttcggatttttaggaaatatttgactaaaaggaaagcaggaattatttgggaagc

PrfA-Box **-10-Box**

Ccaagataattcctgcttttttggttttctgcatg **ataacaagtgttaa**tgacggaaagagagtatctggtt **tata**
tttttatcagcgccaaaaagggaatgatgcatttgacagcagaggtgattgcttttagaaaaattggtagactt

-74 Cre-Box (1 mismatch)

tata **gggaagcgtttgc**taacaatactcatcgtattctaaatttggaaatgaagattacacttgaaaggaaaatt
Startcodon uhpT
Ata **atg**tattattcagtttgaaaaaaaagaaccattttgttccactagaaattcaaagacaacaatggttcaaa
cactttatcgttgcatttatgtctgtattttatttggttatctaacggcttatcttctaaggaataacttt...

Abb. 6.1: *In silico*-Analyse der Promotor-Sequenz des *uhpT*-Gens in *L. monocytogenes*. Die mittels *in silico*-Analysen gefundene putativen *cre*-Boxen sind in blau dargestellt; rotgefärbte Bereiche markieren die Abweichung zur Konsensussequenz (Hueck *et al.*, 1994, Weickert & Chambliss, 1990). Die PrfA-Bindungsstelle ist grün, die -10-Box türkis hinterlegt (Vázquez-Boland *et al.*, 2001).

Jedoch reicht eine Aufhebung der KKR-Kontrolle allein nicht aus, um eine *uhpT*-Genexpression zu stimulieren. Die *::ccpA*-Insertionsmutante zeichnet sich zwar durch eine fehlende KKR-Kontrolle aus (fehlendes CcpA), was durch Gesamtgenom Transkriptions-Studien gezeigt werden konnte, wies jedoch keine gesteigerte *uhpT*-Genexpression auf. Es scheint, dass eine effiziente *uhpT*-Expression erst durch eine gesteigerte PrfA-Aktivität und zusätzlich fehlenden KKR-Kontrolle erfolgen kann. Bedingungen also, die in den KKR-Mutanten *::hprK* und *::ptsH*, nicht aber in der *::ccpA*-Insertionsmutante erfüllt werden. Beide KKR-Mutanten (*::hprK* und *::ptsH*) zeigten in der Real-time RT-PCR eine erhöhte *uhpT*-Transkription.

Welcher der Regulationsmechanismen eine übergeordnete Funktion ausübt und ob es sich im Promotorbereich von *uhpT* überhaupt um funktionale *cre*-Boxen handelt, müsste in zusätzlichen Promotorstudien untersucht werden.

6.5 C3-Metabolismus in *Listeria monocytogenes*

6.5.1 Die Verwertung verschiedener C3-Quellen

Da eine $\Delta uhpT$ -Mutante trotz Deletion des Hexose-Phosphat-Transporters zu einer intrazellulären Vermehrung fähig war (Chico-Calero *et al.*, 2002), müssen neben phosphorylierten Zuckern, wie Glukose-1- und Glukose-6-Phosphat, auch noch andere Kohlenstoffverbindungen *L. monocytogenes* als intrazelluläre Kohlenstoffquellen dienen.

Die apathogene Listerien-Art *L. innocua* ist nicht im Besitz des *uhpT*-Gens und zeigt im Zytosol von J744 Makrophagen eine ähnlich schwache Replikation wie eine $\Delta prfA$ -Mutante aus *L. monocytogenes* (Glaser *et al.*, 2001, Goetz *et al.*, 2001). Jedoch führt eine *uhpT*-Komplementation in *L. innocua* zu keiner signifikant verstärkten Replikationsrate, obwohl der Hexose-Phosphat-Transporter in ausreichender Menge exprimiert wurde. Es besteht die Annahme, dass die Aufnahme von phosphorylierter Hexose nicht das einzige physiologische Erfordernis für das listerielle Wachstum im Zytosol des Wirts ist (Slaghuis *et al.*, 2004). Aus diesem Grund wurde im Rahmen dieser Arbeit die Verwertbarkeit von C3-Verbindungen, wie Glycerin, Glycerin-3-Phosphat, Dihydroxyaceton und Pyruvat in *L. monocytogenes* näher analysiert.

Glycerin stellt *in vitro*, wie Glukose und Cellobiose, eine geeignete Kohlenstoffquelle für das listerielle Wachstum dar und führt zudem zu einer gesteigerten PrfA-abhängigen Virulenzgenexpression. Folglich könnte Glycerin, ähnlich wie Glukose-1- oder Glukose-6-Phosphat eine geeignete Kohlenstoffquelle im Zytoplasma der Wirtszelle sein. Gesamtgenom-Transkriptom-Studien haben gezeigt, dass die Glycerin-Kinase Imo1538 in intrazellulär befindlichen Listerien verstärkt exprimiert wird, was für eine Glycerin-Verwertung im Wirtszytoplasma sprechen könnte (Joseph *et al.*, 2006b).

Die Aufnahme von Glycerin erfolgt sowohl in Gram-negativen als auch in Gram-positiven Bakterien PTS-unabhängig, über das Transmembranprotein GlpF (Heller *et al.*, 1980, Lin, 1976). Die Untersuchung des Wachstums in Glycerin-haltigem definiertem Minimalmedium zeigte den Erwartungen entsprechend in der $::ptsH$ -Mutante (fehlendes HPr-Protein) keine Glycerin-Verwertung. Die Glycerin-Kinase GlpK, die intrazelluläres Glycerin in einer ATP-abhängigen Reaktion zu Glycerin-3-Phosphat phosphoryliert und damit den ausschlaggebenden Schritt im Glycerin-Metabolismus darstellt, benötigt zur Aktivierung eine Phosphorylierung durch HPr-His15~P. Die Phosphorylierung durch HPr-His15~P und die damit verbundene Aktivierung der GlpK scheint, wie für zahlreiche andere Gram-positive Bakterien beschrieben, auch in *L. monocytogenes* für die Glycerin-Verwertung erforderlich zu sein und erklärt somit den Wachstumsverlust der $::ptsH$ -Mutante (fehlendes HPr) in Gegenwart von Glycerin (Charrier *et al.*, 1997a, Wehtje *et al.*, 1995). Im Gegensatz dazu, wie auch schon die HPr-His15~P-Mengen im Western Blot anti-HPr vermuten ließen, zeigten die $::ccpA$ - und $::hprK$ -Insertionsmutanten in Glycerin-haltigem Medium keinen signifikanten Wachstumsunterschied zum WT.

B. subtilis, ein naher Verwandter von *L. monocytogenes*, zeigt die Fähigkeit, Glycerin-3-Phosphat (Y3P) als Kohlenstoffquelle nutzen zu können und exprimiert die dazu notwendige Glycerin-3-Phosphat-Permease GlpT (*glpT*-Gen) (Beijer *et al.*, 1993). Für *L. monocytogenes* konnte kein Glycerin-3-Phosphat-Transporter annotiert werden. Jedoch führt die Beobachtung, dass der Glycerin-3-Phosphat-Transporter GlpT von *E. coli* in Aminosäuresequenz und Transportmechanismus eine große Ähnlichkeit zum Hexose-Phosphat-Transporter UhpT besitzt (Eiglmeier *et al.*, 1987, Ambudkar *et al.*, 1986) zu der Vermutung, dass der listerielle Hexose-Phosphat-Transporter UhpT die Funktion des Glycerin-3-Phosphat-Transports übernehmen könnte. Der WT zeigte trotz Vorzucht in Glycerin-haltigem definiertem Minimalmedium (MM), eine Bedingung, die sich stimulierend auf die PrfA-abhängige *uhpT*-Genexpression auswirkt, kein Wachstum in Gegenwart von Y3P. Eine mögliche Erklärung dafür wäre, dass der Hexose-Phosphat-Transporter UhpT in *L. monocytogenes* nur auf den Transport von phosphorylierten C6-Zuckern spezialisiert ist. I. Chico-Calero und Kollegen konnten bereits zeigen, dass nicht nur Glukose-1- sondern auch andere C6-Zucker, wie Glukose-6-, Fruktose-6- und Mannose-6-Phosphat in Abhängigkeit der PrfA-Aktivität über den UhpT transportiert werden konnten (Chico-Calero *et al.*, 2002). Doch das erklärt nicht, warum das natürlich vorkommende wasserlösliche Antibiotikum Fosfomycin, eine phosphorylierte C3-Verbindung, ebenfalls über den Hexose-Phosphat-Transporter UhpT in die listerielle Zelle transportiert werden kann (Scorti *et al.*, 2006). Anhand dieses Resultats hätte man ein Wachstum von *Listeria monocytogenes* in einem PrfA-aktivierendem Medium mit Y3P erwarten können. Die strukturellen Unterschiede von Fosfomycin zu Y3P könnten sich jedoch auf den Transport über den Hexose-Phosphat-Transporter UhpT auswirken.

Zusätzlich wurde im Rahmen dieser Arbeit die Pyruvat-Verwertbarkeit von *L. monocytogenes* *in vitro* untersucht. Es wäre ebenso denkbar, dass Pyruvat der Wirtszelle *L. monocytogenes* als Kohlenstoffquelle dient. Für die obligat intrazellulären *Rickettsia* spp. wird vermutet, dass das Pyruvat der Wirtszelle dem intrazellulären Metabolismus von *Rickettsia* spp. zur Verfügung gestellt wird. Denn obwohl Pyruvat von *Rickettsia* spp. nicht selbst gebildet werden kann (glykolytische Enzyme nicht vorhanden), findet man im Genom zahlreiche Enzyme für den Pyruvatmetabolismus (Renesto *et al.*, 2005).

Das Wachstum von *L. monocytogenes* in Pyruvat-haltigem LB-Medium erfolgt dosisabhängig. Je mehr Pyruvat dem Medium zugefügt wurde, desto besser das Wachstum. Im Allgemeinen scheint jedoch die Pyruvat-Verwertung in *L. monocytogenes* *in vitro* gering zu sein. Für den intrazellulären Metabolismus von *L. monocytogenes* könnte das ausreichend genug sein, um das Überleben und die Vermehrung im Zytoplasma der Wirtszelle zu gewährleisten. In *E. coli* gibt es Hinweise dafür, dass Pyruvat mit einem Pyruvat-spezifischen energieabhängigen Transportsystem in die Zelle aufgenommen werden kann (Lang *et al.*, 1987). Möglicherweise existiert ein solches Transportsystem auch in *L. monocytogenes*. Letztendlich könnte das von den Listerien aufgenommene Pyruvat durch die Pyruvat-Carboxylase (kodiert von *pycA*) in Oxalacetat überführt und in den unvollständigen Citrat-Zyklus eingeschleust werden (anaplerotische Reaktion). Aufgrund der fehlenden α -Ketoglutarat-Dehydrogenase im Citrat-Zyklus von *L. monocytogenes* dient die

Carboxylierung von Pyruvat zu Oxalacetat normalerweise der Aufrechterhaltung des Zyklusses, dessen Zwischenprodukte für die Biosynthese von Aminosäuren eine wichtige Rolle spielen (Eisenreich *et al.*, 2006). Denkbar wäre auch, dass Pyruvat mittels Pyruvat-Dehydrogenase (kodiert von *pdhA*) in Acetyl-CoA umgewandelt wird, so in den Citrat-Zyklus eingeschleust wird und als Energie- und Kohlenstoffquelle dienen könnte.

Listeria monocytogenes besitzt zwei Dihydroxyaceton (Dha)-Kinasen, die durch die Gene lmo0347-48 und lmo2695-96 kodiert und in Glycerin-haltigem MM verstärkt transkribiert werden. Eine Vielzahl von Organismen besitzen Dihydroxyaceton-Kinasen, die in sechs Kategorien (A-F) eingeteilt wurden, wobei die beiden Dha-Kinasen aus *L. monocytogenes* in die Kategorie C eingruppiert wurden. (Barabote & Saier, 2005). Die Dha-Kinase aus *E. coli*, bestehend aus den Komponenten DhaM (*ycgC*), DhaL (*ycgS*) und DhaK (*ycgT*) (Gutknecht *et al.*, 2001), ermöglicht die PEP-abhängige Phosphorylierung des Dha und stellt das Schlüsselenzym des Dha-Metabolismus dar (Bachler *et al.*, 2005). Ein Vergleich der Aminosäuresequenz der Genprodukte lmo0348, lmo2695 mit der DhaK-Untereinheit von *E. coli* (*ycgT*) zeigte eine Ähnlichkeit von 75,9 %, die von lmo0347, lmo2696 mit DhaL-Untereinheit (*ycgS*) eine von 73,7 %. Aminosäurereste, die in *E. coli* an der kovalenten Bindung von Dha (DhaK-Untereinheit, His66, Asp119 und His230) bzw. an der Nukleotid-Bindung (DhaL-Untereinheit) beteiligt sind, konnten auch in den listeriellen Dha-Kinase-Untereinheiten K und L identifiziert werden (Siebold *et al.*, 2003a, Siebold *et al.*, 2003b).

Zur Klärung der Frage, ob die listeriellen Dha-Kinasen nur Dha, welches durch Oxidation von Glycerin in der Bakterienzelle gebildet wird oder auch das in die Bakterienzelle transportierte Dha, phosphorylieren, wurde das Wachstum von *L. monocytogenes* in definiertem MM mit Dha untersucht. Trotz Vorzucht in Glycerin-haltigem Medium, welche laut Transkriptom-Daten zu einer verstärkten Expression der Dha-Kinasen führt, zeigte der WT nur ein sehr geringes Wachstum in Gegenwart von Dha. Trotzdem kann davon ausgegangen werden, dass *L. monocytogenes* *in vivo* zur Dha-Verwertung in der Lage ist, da der WT nach Vorzucht in Glycerin-haltigem Medium, überführt in frisches MM ohne jede Kohlenstoffquelle, überhaupt kein Wachstum zeigte. Eine mögliche Erklärung für das minimale Wachstum von *L. monocytogenes* in Dha-haltigem MM könnte die negative Eigenschaft von Dha sein, mit Proteinen bzw. deren Aminogruppen zu reagieren. Das Keton Dha bildet mit Aminogruppen, der im definiertem Minimalmedium frei vorliegenden Aminosäuren, Schiff'sche Basen aus (Maillard-Reaktion) (Tessier *et al.*, 2003). Aminosäuren, wie Cystein, Glutamin, Isoleucin, Leucin und Valin, die für das listerielle Wachstum erforderlich sind (Seeliger, 1986), werden durch die Reaktion mit Dha dem Wachstumsmedium entzogen. Nach längerem Schütteln lagern sich die Bakterien an der Wand des Erlenmeyerkolbens ab und das Medium verfärbt sich stark gelb. Diese Gelbfärbung spricht für eine solche Maillard-Reaktion.

Außerdem scheint die Dha-Verwertung, wie für *E. coli* beschrieben (Jin & Lin, 1984), auch in *L. monocytogenes* in Abhängigkeit von HPr-His15~P zu erfolgen, da die *ptsH*-Insertionsmutante (fehlendes HPr-Protein) mit einer Vorzucht in BHI-Vollmedium zu keinem Wachstum in definiertem MM mit Dha fähig war.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass Glycerin, Pyruvat und Dha (die letzten beiden allerdings mit niedriger Wachstumseffizienz) unter den gewählten Wachstumsbedingungen *L. monocytogenes* als C3-Quellen dienen können. Dagegen ist *L. monocytogenes* nicht in der Lage, Glycerin-3-Phosphat als Kohlenstoffquelle zu nutzen. Da die *ptsH*-Insertionsmutante kein Wachstum in Glycerin- oder Dha-haltigem Medium zeigte, lässt sich vermuten, dass die listeriellen Glycerin-Kinase(n) (GlpK), ähnlich wie die von *B. subtilis*, durch HPr-His15~P aktiviert werden muss und die Dha-Kinase(n) (DhaK) von *L. monocytogenes* ebenfalls HPr-His15~P als Kofaktor für die Phosphorylierung von Dha verwendet. Möglicherweise führt die PTS-unabhängige Aufnahme und Verwertung der C3-Quellen Dha und Pyruvat, wie die von Glycerin oder auch Glukose-1- bzw. Glukose-6-Phosphat zu einer gesteigerten PrfA-Aktivität. Folglich wäre es auch denkbar, dass Pyruvat und Dha von Seiten der Wirtszelle für den intrazellulären Metabolismus von *L. monocytogenes* zur Verfügung gestellt werden. Dies gilt es jedoch noch zu untersuchen.

6.5.2 Charakterisierung des Glycerin-Metabolismus in *L. monocytogenes*

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Glycerin-Aufnahme und Verwertung in *L. monocytogenes* zu einer gesteigerten PrfA-Aktivität führte. Die Struktur-Analyse von PrfA hat ergeben, dass eine leichte Bindung von Glycerin möglich sein könnte (Thirumuruhan *et al.*, 2003). Jedoch haben *in vitro* Transkriptions-Studien mit und ohne Glycerin im Versuchsansatz keinen Unterschied in der Initiation der Transkription bei dem PrfA-abhängigen *uhpT*-Promotor gezeigt (Joseph *et al.*, 2008; submitted). Es scheint, dass Glycerin selbst die PrfA-Aktivität nicht stimuliert. Es besteht eher die Annahme, dass Komponenten des Glycerin-Metabolismus an der Regulation der PrfA-Aktivität beteiligt sein müssen. Um den Effekt der Glycerin-Verwertung auf die PrfA-Aktivität besser verstehen zu können, wurde der Glycerin-Metabolismus in *L. monocytogenes* näher untersucht.

L. monocytogenes besitzt eine Vielzahl an Genen, die in Gesamtgenom-Transkriptom-Studien in Glycerin-haltigem MM stark exprimiert wurden und dessen Genprodukte für den Glycerinmetabolismus von Bedeutung sein könnten. und (Joseph *et al.*, 2008; submitted). Die gesteigerte Transkription einiger dieser Gene in Gegenwart von Glycerin konnte mittels Real-time RT-PCR verifiziert werden. Zu diesen Genen zählen: *glpF* (Glycerin-Transporter GlpF1); lmo1539 (Glycerin-Transporter GlpF2), lmo1538 (Glycerin-Kinase GlpK1), lmo1034 (Glycerin-Kinase GlpK2) und *glpD* (Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase GlpD). Zusätzlich besitzt *L. monocytogenes*, wie *Klebsiella pneumoniae* (Forage & Lin, 1982), weitere Gene, die einen zusätzlichen Abbauweg von Glycerin ermöglichen könnten. Bei diesen Genen handelt es sich laut ListiList (<http://genolist.pasteur.fr/ListiList>) um die in einem Operon angeordneten Gene lmo0344 (Dehydrogenase/Reduktase), lmo0347 und lmo0348 (Dihydroxyaceton-Kinase DhaK-1) und die Gene lmo1737 (Glycerin-Dehydrogenase) und lmo2695-96 (Dihydroxyaceton-Kinase DhaK-2). In Microarray- und Real-time RT-PCR-Analysen wiesen auch diese Gene, mit Ausnahme von lmo1737, in Glycerin-haltigem MM eine verstärkte Transkription auf. Die verstärkte Transkription dieser zwei Gen-Gruppen lässt vermuten, dass Glycerin in *L. monocytogenes* über zwei

unterschiedliche Wege abgebaut werden kann, welche in Abb. 6.2 schematisch dargestellt sind. Zusätzlich besteht auch die Möglichkeit, dass *L. monocytogenes* Dihydroxyaceton als direkte Kohlenstoffquelle nutzt.

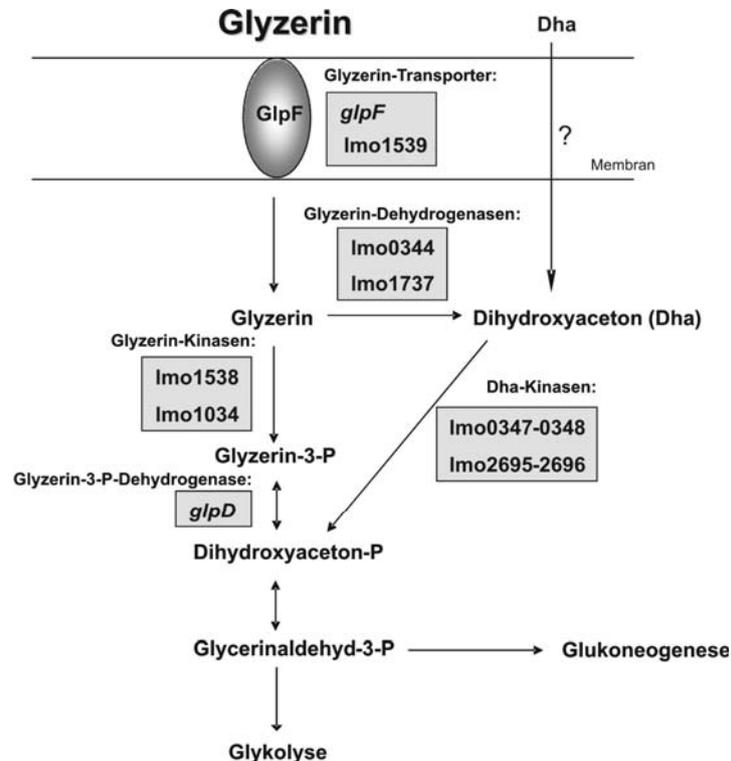


Abb. 6.2: schematische Darstellung des Dihydroxyaceton- und Glycerin-Metabolismus in *L. monocytogenes*. Glycerin wird in *L. monocytogenes* mittels freier oder erleichterter Diffusion (Glycerin-Transporter kodiert von *glpF* und Imo1539) aufgenommen, durch die Glycerin-Kinasen (kodiert von Imo1538 und Imo1034) zu Glycerin-3-Phosphat phosphoryliert und durch die Glycerin-Dehydrogenase (kodiert von *glpD*) in Dihydroxyaceton-Phosphat umgewandelt. Glycerin kann auch direkt durch die Glycerin-Dehydrogenase (kodiert von Imo0344 und Imo1737) zu Dihydroxyaceton oxidiert und durch die Dihydroxyaceton-Kinasen (kodiert von Imo0347-48 und Imo2695-96) phosphoryliert werden. Dihydroxyaceton-Phosphat wird über Glyceraldehyd-3-Phosphat in die Glykolyse bzw. Glukoneogenese eingeschleust werden. Es besteht die Annahme, dass Dihydroxyaceton direkt von *L. monocytogenes* aufgenommen und mittels der Dihydroxyaceton-Kinasen verstoffwechselt werden kann.

Wird Glycerin über die in Abb. 6.2 dargestellten Wege abgebaut werden, so scheint die Verwertung von Glycerin mittels Glycerin-Kinase und Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase zu Dha-Phosphat der bevorzugte Abbauweg in *L. monocytogenes* zu sein, da die $\Delta glpD$ - (Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase) und $\Delta 1538$ -Mutanten (Glycerin-Kinase) kein Wachstum in Glycerin-haltigem Medium zeigten (Joseph *et al.*, 2008; submitted). Folglich waren diese Mutanten zu keiner Oxidation von Glycerin zu Dha und somit zu keiner Glycerin-Verwertung in der Lage.

Die Herstellung von Einzel- und Mehrfachmutanten in Genen des Dha-Metabolismus (Imo0344, Imo0347-48 und Imo2695-96) ermöglichte die Untersuchung der Beteiligung

dieser Enzyme am Dha- bzw. Glycerin-Metabolismus in *L. monocytogenes*. Das sich im Operon mit lmo0347-48 befindliche Gen lmo0344 (kodierend für eine Dehydrogenase/Reduktase), wird zwar in Glycerin-haltigem MM verstärkt transkribiert, jedoch scheint eine Deletion von lmo0344 keinen Einfluss auf das Wachstum in Glycerin-haltigem MM zu haben. Folglich ist das Genprodukt von lmo0344 nicht oder zumindest nicht allein an der Oxidation von Glycerin zu Dha beteiligt. Eine weitere Glycerin-Dehydrogenase, kodiert von lmo1737, könnte in der Δ 0344-Mutante die Aufgabe der Glycerin-Oxidation übernehmen. Jedoch scheint es sich bei lmo1737 um ein konstitutiv exprimiertes Gen zu handeln, dessen Transkription laut Real-time RT-PCR in Gegenwart von Glycerin nicht gesteigert wird. Diese Beobachtung stellt die Funktion von lmo1737 im Glycerinmetabolismus in Frage.

Die Mutante Δ lmo0347-48/lmo2695-96 (Δ dhaK), in der beide Dha-Kinasen (DhaK-1 und DhaK-2) deletiert sind, zeigte in Glycerin-haltigem MM eine deutliche Wachstumshemmung und erreichte in der stationären Phase nur eine optische Dichte von OD_{600nm} 1.5. Die Dha-Kinasen DhaK-1 und DhaK-2, kodiert von lmo0347-48 und lmo2695-96, scheinen am Glycerin-Metabolismus von *L. monocytogenes* beteiligt zu sein. Folglich spielt die Oxidierung von Glycerin zu Dha, wie in *K. pneumoniae*, auch im Glycerin-Metabolismus von *L. monocytogenes* eine Rolle. Letztendlich könnte die Bestimmung der Dha-Kinase-Aktivität im Zellextrakt (Forage & Foster, 1982) von *L. monocytogenes* in Gegenwart von Glycerin bzw. Dha die Bedeutung der Dha-Kinasen im Glycerin- und Dha-Metabolismus klären.

Da die jeweiligen DhaK-Einzeldelentionsmutanten (Δ lmo0347-48 und Δ 2695-96) keine Wachstumsauffälligkeiten in Glycerin-haltigem Medium zeigten, besteht die Annahme, dass sich die Dha-Kinasen gegenseitig in ihrer Funktion ersetzen können. Durch die verstärkte Expression der einen Dha-Kinase könnte der Verlust der anderen Kinase ausgeglichen werden. Die Δ lmo0347-48-Mutante zeigte in Glycerin-haltigem MM sogar ein besseres Wachstum als der WT. Möglicherweise wird in der Δ lmo0347-48-Mutante die DhaK-2 (kodiert von lmo2695-96) verstärkt exprimiert. Diese DhaK weist unter Umständen eine höhere Affinität zu Dha auf, trägt so zu einer effizienteren Oxidation und somit zur besseren Glycerin-Verwertung bei und könnte das bessere Wachstum der Δ lmo0347-48-Mutante in Glycerin-haltigem MM erklären.

Die Deletion von lmo0347-48 und lmo2695-96 (Δ dhaK-Mutante) führt in Gegenwart von Glycerin, neben einer starken Wachstumshemmung, zu einer weitgehenden Inaktivierung von PrfA. Im WT zeigte die PTS-unabhängige Glycerin-Aufnahme und dessen Verwertung eine gesteigerte PrfA-Aktivität. Geht man von der Annahme aus, dass sich unphosphoryliertes EIIA spezifischer PTS (oder andere PTS-Komponenten) hemmend und phosphorylierte EIIA stimulierend auf die PrfA-Aktivität auswirken (siehe dazu Abschnitt 6.3), so sollten bei einer effizienten Glycerin-Verwertung EIIA aller exprimierten PTS in phosphoryliertem Zustand vorliegen. Letztendlich verbleibt EIIA durch den PTS-unabhängigen Glycerin-Transport im phosphorylierten Zustand. Eine mögliche Erklärung für die geringe PrfA-Aktivität in den DhaK-Einzelmутanten und die weitgehende Inaktivierung von PrfA in der DhaK-Doppelmutante wäre, dass durch die verringerte Glycerin-Verwertung weniger Phosphoenolpyruvat (PEP) gebildet wird und somit weniger für eine PEP-anhängige

Phosphorylierung der EII-Komponenten zur Verfügung steht. Die Folge ist, dass die in Glycerin-haltigem MM zahlreich exprimierten PTS-Komponenten in der Dha-Kinase-Doppelmutante im unphosphoryliertem Zustand vorliegen, PrfA binden und so dessen Aktivität hemmen könnten.

Mögliche Unterschiede in der intrazellulären HPr-His15~P-Konzentration, die den Phosphorylierungszustand der exprimierten PTS beeinflusst sowie im PTS-Expressionsmuster zwischen WT und DhaK-Einzel- und -Doppelmutante, wären eine denkbare Erklärung für die deutlich verringerte PrfA-Aktivität in den DhaK-Mutanten. Warum sich eine Deletion von Imo0344 eher aktivierend auf die PrfA-Aktivität auswirkt, bleibt unklar.

6.5.3 Verwertbare Kohlenstoffquelle im Zytoplasma der Wirtszelle

Die C3-Quelle Glycerin erfüllt jene Kriterien, die Kohlenstoffquellen für den listeriellen intrazellulären Metabolismus erfüllen sollten. Zum einen ermöglicht die Glycerin-Verwertung von *L. monocytogenes in vitro* ein effizientes Wachstum und zum anderen führt sie, im Gegensatz zu der von Glukose und anderen unphosphorylierten Zuckern, zu einer gesteigerten PrfA-Aktivität. Eine erhöhte PrfA-Aktivität und somit eine gesteigerte PrfA-abhängige Virulenzgenexpression ist für den intrazellulären Lebenszyklus (Entkommen aus dem primären und sekundären Phagosom, Replikation und Zell-zu-Zell-Ausbreitung) von *L. monocytogene* erforderlich. Die intrazelluläre Verwertung von Glycerin wird durch Transkriptom-Daten unterstützt, die für die im Wirtszytoplasma befindlichen Listerien eine verstärkte Expression der Glycerin-Kinase (kodiert durch Imo1538) nachweisen konnten (Joseph *et al.*, 2006a). Zudem zeigten die Mutanten $\Delta 1538$ und $\Delta 1034$ (Glycerin-Kinasen) in Caco-2 Zellen und die $\Delta glpD$ (Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase) sowohl in J744 Makrophagen als auch in Caco-2 Zellen eine geringere Replikationsrate als der WT (Joseph *et al.*, 2008; submitted). Als mögliche intrazelluläre Glycerinquelle könnten Phospholipide dienen. Die Zerstörung des primären Phagosoms, in dem sich die Listerien nach Aufnahme in die Wirtszelle befinden, liefert eine große Menge an Phospholipiden. Der Abbau von Phospholipiden, in Zusammenarbeit von listeriellen Phospholipase C (PlcB) und zellulären Lipasen Typ-A, könnten zur Bildung von Glycerin, Fettsäuren und Ethanolamin führen (Joseph & Goebel, 2007). Zudem ist die PrfA-abhängige Expression des *plcB*-Gens, kodierend für die listerielle Phospholipase C, im Zytoplasma sehr hoch (Joseph *et al.*, 2006a).

Eine erhöhte Expression der Gene, kodierend für den Dha-Metabolismus (siehe Abb. 2), konnte in intrazellulären Listerien nicht nachgewiesen werden (Joseph *et al.*, 2006a). Da aber die Dha-Kinase-Mutante ($\Delta dhaK$) einen Wachstumsdefekt in Gegenwart von Glycerin zeigte, wurde die Replikationsfähigkeit dieser Mutante in Zytosol von J744 Makrophagen untersucht. Die verringerte Replikation der $\Delta dhaK$ -Mutante im Zytoplasma der Makrophagen führt zu der Annahme, dass neben Glycerin auch Dha von Seiten der Wirtszelle für den intrazellulären listeriellen Metabolismus zur Verfügung gestellt werden könnte. Außerdem repliziert die *::ptsH*-Insertionsmutante von *L. monocytogenes*, die durch ein fehlendes HPr-Protein und folglich durch einen Wachstumsdefekt in Gegenwart von Glycerin und Dha gekennzeichnet ist, in J744 Makrophagen deutlich schlechter als der WT. Diese Beobachtung unterstreicht

unter anderem die Erfordernis dieser C3-Quellen im intrazellulären Metabolismus von *L. monocytogenes*. Die $\Delta glpD/dhaK$ -Mutante, die sowohl einen Defekt im Glyzerin- als auch im Dha-Metabolismus aufweist, zeigte eine geringere Replikationsrate in J744 Makrophagen als der isogene WT, aber erstaunlicherweise eine höhere als die $\Delta dhaK$ -Mutante. In der $\Delta glpD$ konnte in J744 Makrophagen und in Caco-2-Zellen eine deutlich verringerte Replikation nachgewiesen werden (Joseph *et al.*, 2008; submitted). Daher hätte man für die $\Delta glpD/dhaK$ eine schwächere oder zumindest eine der $\Delta dhaK$ -Mutante ähnliche Replikationsrate erwartet. Die bessere Replikation der $\Delta glpD/dhaK$ im Makrophagen-Zytosol könnte möglicherweise auf eine induzierte Glukose-6-Phosphat-Verwertung zurückzuführen sein. Die Untersuchung der ebenfalls im Rahmen dieser Arbeit hergestellten $\Delta glpD/dhaK/uhpT$ -Mutante auf das Replikationsverhalten in J744 Makrophagen und Caco-2 Zellen, würden zur Klärung beitragen. Die PTS-gängigen Zucker wie Glukose oder Mannose, deren Verwertung zu einer verringerten PrfA-abhängigen Virulenzgenexpression führen, können mit großer Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden. Pyruvat könnte, wie schon für die obligat intrazellulären *Rickettsia* spp. vermutet (Renesto *et al.*, 2005), auch für den intrazellulären Metabolismus von *L. monocytogenes* von großer Bedeutung sein. Die Untersuchung auxotropher *L. monocytogenes* Mutanten hat ergeben, dass die Verwertung intrazellulärer Peptide als Aminosäurenquelle dient (Marquis *et al.*, 1993). Letztendlich könnten diese Peptide auch als Kohlenstoffquelle im Zytoplasma der Wirtszelle dienen.

7 Literatur

- Ackerman, R. S., Cozzarelli, N. R., and Epstein, W. (1974) Accumulation of toxic concentrations of methylglyoxal by wild-type *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* **119**: 357-362.
- Allerberger, F. (2003) *Listeria*: growth, phenotypic differentiation and molecular microbiology. *FEMS Immunol Med Microbiol* **35**: 183-189.
- Alouf, J.E. (2000) Cholesterol-binding cytolytic protein toxins. *Int J Med Microbiol* **290**: 351-356.
- Alvarez-Dominguez, C., Vazquez-Boland, J.A., Carrasco-Marin, E., Lopez-Mato, P., and Leyva-Cobian, F. (1997) Host cell heparan sulfate proteoglycans mediate attachment and entry of *Listeria monocytogenes*, and the listerial surface protein ActA is involved in heparan sulfate receptor recognition. *Infect Immun* **65**: 78-88.
- Ambudkar, S.V., Larson, T.J., and Maloney, P.C. (1986) Reconstitution of sugar phosphate transport systems of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **261**: 9083-9086.
- Argast, M., and Boos, W. (1980) Co-regulation in *Escherichia coli* of a novel transport system for sn-glycerol-3-phosphate and outer membrane protein Ic (e, E) with alkaline phosphatase and phosphate-binding protein. *J Bacteriol* **143**: 142-150.
- Arnold, R., and Konig, W. (1998) Interleukin-8 release from human neutrophils after phagocytosis of *Listeria monocytogenes* and *Yersinia enterocolitica*. *J Med Microbiol* **47**: 55-62.
- Bachler, C., Schneider, P., Bahler, P., Lustig, A., and Erni, B. (2005) *Escherichia coli* dihydroxyacetone kinase controls gene expression by binding to transcription factor DhaR. *Embo J* **24**: 283-293.
- Baker, M.E., and Saier, M.H., Jr. (1990) A common ancestor for bovine lens fiber major intrinsic protein, soybean nodulin-26 protein, and *E. coli* glycerol facilitator. *Cell* **60**: 185-186.
- Barabote, R.D., and Saier, M.H., Jr. (2005) Comparative genomic analyses of the bacterial phosphotransferase system. *Microbiol Mol Biol Rev* **69**: 608-634.
- Bavdek, A., Gekara, N.O., Priselac, D., Gutierrez Aguirre, I., Darji, A., Chakraborty, T., Macek, P., Lakey, J.H., Weiss, S., and Anderluh, G. (2007) Sterol and pH interdependence in the binding, oligomerization, and pore formation of Listeriolysin O. *Biochemistry* **46**: 4425-4437.
- Beauregard, K.E., Lee, K.D., Collier, R.J., and Swanson, J.A. (1997) pH-dependent perforation of macrophage phagosomes by listeriolysin O from *Listeria monocytogenes*. *J Exp Med* **186**: 1159-1163.
- Begley, M., Sleator, R.D., Gahan, C.G., and Hill, C. (2005) Contribution of three bile-associated loci, *bsh*, *pva*, and *btlB*, to gastrointestinal persistence and bile tolerance of *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun* **73**: 894-904.
- Behari, J., and Youngman, P. (1998a) Regulation of *hly* expression in *Listeria monocytogenes* by carbon sources and pH occurs through separate mechanisms mediated by PrfA. *Infect Immun* **66**: 3635-3642.
- Behari, J., and Youngman, P. (1998b) A homolog of CcpA mediates catabolite control in *Listeria monocytogenes* but not carbon source regulation of virulence genes. *J Bacteriol* **180**: 6316-6324.
- Beijer, L., and Rutberg, L. (1992) Utilisation of glycerol and glycerol 3-phosphate is differently affected by the phosphotransferase system in *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol Lett* **79**: 217-220.

- Beijer, L., Nilsson, R.P., Holmberg, C., and Rutberg, L. (1993) The *glpP* and *glpF* genes of the glycerol regulon in *Bacillus subtilis*. *J Gen Microbiol* **139**: 349-359.
- Bergmann, B., Raffelsbauer, D., Kuhn, M., Goetz, M., Hom, S., and Goebel, W. (2002) InlA-but not InlB-mediated internalization of *Listeria monocytogenes* by non-phagocytic mammalian cells needs the support of other internalins. *Mol Microbiol* **43**: 557-570.
- Bielecki, J., Youngman, P., Connelly, P., and Portnoy, D.A. (1990) *Bacillus subtilis* expressing a haemolysin gene from *Listeria monocytogenes* can grow in mammalian cells. *Nature* **345**: 175-176.
- Bierne, H., Mazmanian, S.K., Trost, M., Pucciarelli, M.G., Liu, G., Dehoux, P., Jansch, L., Garcia-del Portillo, F., Schneewind, O., and Cossart, P. (2002) Inactivation of the *srtA* gene in *Listeria monocytogenes* inhibits anchoring of surface proteins and affects virulence. *Mol Microbiol* **43**: 869-881.
- Böckmann, R., Dickneite, C., Middendorf, B., Goebel, W., and Sokolovic, Z. (1996) Specific binding of the *Listeria monocytogenes* transcriptional regulator PrfA to target sequences requires additional factor(s) and is influenced by iron. *Mol Microbiol* **22**: 643-653.
- Bohne, J., Sokolovic, Z., and Goebel, W. (1994) Transcriptional regulation of *prfA* and PrfA-regulated virulence genes in *Listeria monocytogenes*. *Mol Microbiol* **11**: 1141-1150.
- Bohne, J., Kestler, H., Uebele, C., Sokolovic, Z., and Goebel, W. (1996) Differential regulation of the virulence genes of *Listeria monocytogenes* by the transcriptional activator PrfA. *Mol Microbiol* **20**: 1189-1198.
- Boos, W., Hartig-Beecken, I., and Altendorf, K. (1977) Purification and properties of a periplasmic protein related to sn-glycerol-3-phosphate transport in *Escherichia coli*. *Eur J Biochem* **72**: 571-581.
- Botsford, J.L., and Harman, J.G. (1992) Cyclic AMP in prokaryotes. *Microbiol Rev* **56**: 100-122.
- Boujemaa-Paterski, R., Gouin, E., Hansen, G., Samarin, S., Le Clainche, C., Didry, D., Dehoux, P., Cossart, P., Kocks, C., Carlier, M.F., and Pantaloni, D. (2001) *Listeria* protein ActA mimics WASp family proteins: it activates filament barbed end branching by Arp2/3 complex. *Biochemistry* **40**: 11390-11404.
- Braun, L., Dramsi, S., Dehoux, P., Bierne, H., Lindahl, G., and Cossart, P. (1997) InlB: an invasion protein of *Listeria monocytogenes* with a novel type of surface association. *Mol Microbiol* **25**: 285-294.
- Brehm, K., Haas, A., Goebel, W., and Kreft, J. (1992) A gene encoding a superoxide dismutase of the facultative intracellular bacterium *Listeria monocytogenes*. *Gene* **118**: 121-125.
- Brochu, D., and Vadeboncoeur, C. (1999) The HPr(Ser) kinase of *Streptococcus salivarius*: purification, properties, and cloning of the *hprK* gene. *J Bacteriol* **181**: 709-717.
- Brundage, R.A., Smith, G.A., Camilli, A., Theriot, J.A., and Portnoy, D.A. (1993) Expression and phosphorylation of the *Listeria monocytogenes* ActA protein in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 11890-11894.
- Bubert, A., Kohler, S., and Goebel, W. (1992a) The homologous and heterologous regions within the *iap* gene allow genus- and species-specific identification of *Listeria spp.* by polymerase chain reaction. *Appl Environ Microbiol* **58**: 2625-2632.
- Bubert, A., Kuhn, M., Goebel, W., and Kohler, S. (1992b) Structural and functional properties of the p60 proteins from different *Listeria* species. *J Bacteriol* **174**: 8166-8171.
- Busby, S., and Ebright, R.H. (1999) Transcription activation by catabolite activator protein (CAP). *J Mol Biol* **293**: 199-213.

- Busque, P., Letellier, A., Harel, J., and Dubreuil, J.D. (1995) Production of *Escherichia coli* STb enterotoxin is subject to catabolite repression. *Microbiology* **141** (Pt 7): 1621-1627.
- Cabanes, D., Dehoux, P., Dussurget, O., Frangeul, L., and Cossart, P. (2002) Surface proteins and the pathogenic potential of *Listeria monocytogenes*. *Trends Microbiol* **10**: 238-245.
- Cabanes, D., Dussurget, O., Dehoux, P., and Cossart, P. (2004) Auto, a surface associated autolysin of *Listeria monocytogenes* required for entry into eukaryotic cells and virulence. *Mol Microbiol* **51**: 1601-1614.
- Cabanes, D., Sousa, S., Cebria, A., Lecuit, M., Garcia-del Portillo, F., and Cossart, P. (2005) Gp96 is a receptor for a novel *Listeria monocytogenes* virulence factor, Vip, a surface protein. *Embo J* **24**: 2827-2838.
- Camilli, A., Goldfine, H., and Portnoy, D.A. (1991) *Listeria monocytogenes* mutants lacking phosphatidylinositol-specific phospholipase C are avirulent. *J Exp Med* **173**: 751-754.
- Casabon, I., Couture, M., Vaillancourt, K., and Vadeboncoeur, C. (2006) Synthesis of HPr(Ser-P)(His-P) by enzyme I of the phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase system of *Streptococcus salivarius*. *Biochemistry* **45**: 6692-6702.
- Chakraborty, T., and Goebel, W. (1988) Recent developments in the study of virulence in *Listeria monocytogenes*. *Curr Top Microbiol Immunol* **138**: 41-58.
- Chakraborty, T., Leimeister-Wächter, M., Domann, E., Hartl, M., Goebel, W., Nichterlein, T., and Notermans, S. (1992) Coordinate regulation of virulence genes in *Listeria monocytogenes* requires the product of the *prfA* gene. *J Bacteriol* **174**: 568-574.
- Charrier, V., Buckley, E., Parsonage, D., Galinier, A., Darbon, E., Jaquinod, M., Forest, E., Deutscher, J., and Claiborne, A. (1997a) Cloning and sequencing of two enterococcal *glpK* genes and regulation of the encoded glycerol kinases by phosphoenolpyruvate-dependent, phosphotransferase system-catalyzed phosphorylation of a single histidyl residue. *J Biol Chem* **272**: 14166-14174.
- Charrier, V., Deutscher, J., Galinier, A., and Martin-Verstraete, I. (1997b) Protein phosphorylation chain of a *Bacillus subtilis* fructose-specific phosphotransferase system and its participation in regulation of the expression of the *lev* operon. *Biochemistry* **36**: 1163-1172.
- Chauvaux, S. (1996) CcpA and HPr(ser-P): mediators of catabolite repression in *Bacillus subtilis*. *Res Microbiol* **147**: 518-522.
- Chauvaux, S., Paulsen, I.T., and Saier, M.H., Jr. (1998) CcpB, a novel transcription factor implicated in catabolite repression in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **180**: 491-497.
- Chauvin, F., Brand, L., and Roseman, S. (1994) Sugar transport by the bacterial phosphotransferase system. Characterization of the *Escherichia coli* enzyme I monomer/dimer equilibrium by fluorescence anisotropy. *J Biol Chem* **269**: 20263-20269.
- Chauvin, F., Brand, L., and Roseman, S. (1996a) Enzyme I: the first protein and potential regulator of the bacterial phosphoenolpyruvate: glycerol phosphotransferase system. *Res Microbiol* **147**: 471-479.
- Chauvin, F., Fomenkov, A., Johnson, C.R., and Roseman, S. (1996b) The N-terminal domain of *Escherichia coli* enzyme I of the phosphoenolpyruvate/glycerol phosphotransferase system: molecular cloning and characterization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 7028-7031.
- Chico-Calero, I., Suárez, M., González-Zorn, B., Scortti, M., Slaghuis, J., Goebel, W., and Vázquez-Boland, J.A. (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**: 431-436.

- Choi, I.D., Kim, K.N., Yun, C.W., and Choi, Y.J. (2006) Cloning and characterization of the HPr kinase/phosphorylase gene from *Bacillus stearothermophilus* No. 236. *Biosci Biotechnol Biochem* **70**: 1089-1101.
- Christensen, D.P., Benson, A.K., and Hutkins, R.W. (1998) Cloning and expression of the *Listeria monocytogenes* scott A *ptsH* and *ptsI* genes, coding for HPr and enzyme I, respectively, of the phosphotransferase system. *Appl Environ Microbiol* **64**: 3147-3152.
- Christensen, D.P., Benson, A.K., and Hutkins, R.W. (1999) Mutational analysis of the role of HPr in *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol* **65**: 2112-2115.
- Christiansen, I., and Hengstenberg, W. (1996) Cloning and sequencing of two genes from *Staphylococcus carnosus* coding for glucose-specific PTS and their expression in *Escherichia coli* K-12. *Mol Gen Genet* **250**: 375-379.
- Collins, M.D., Wallbanks, S., Lane, D.J., Shah, J., Nietupski, R., Smida, J., Dorsch, M., and Stackebrandt, E. (1991) Phylogenetic analysis of the genus *Listeria* based on reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA. *Int J Syst Bacteriol* **41**: 240-246.
- Conlan, J.W., and North, R.J. (1992) Early pathogenesis of infection in the liver with the facultative intracellular bacteria *Listeria monocytogenes*, *Francisella tularensis*, and *Salmonella typhimurium* involves lysis of infected hepatocytes by leukocytes. *Infect Immun* **60**: 5164-5171.
- Cossart, P., and Mengaud, J. (1989) *Listeria monocytogenes*. A model system for the molecular study of intracellular parasitism. *Mol Biol Med* **6**: 463-474.
- Cossart, P., and Lecuit, M. (1998) Interactions of *Listeria monocytogenes* with mammalian cells during entry and actin-based movement: bacterial factors, cellular ligands and signaling. *Embo J* **17**: 3797-3806.
- Cossart, P. (2007) Listeriology (1926-2007): the rise of a model pathogen. *Microbes Infect.*
- Cummins, A.J., Fielding, A.K., and McLauchlin, J. (1994) *Listeria ivanovii* infection in a patient with AIDS. *J Infect* **28**: 89-91.
- Dalet, K., Cenatiempo, Y., Cossart, P., The European *Listeria* Genome Consortium, and Hechard, Y. (2001) A σ^{45} -dependent PTS permease of the mannose family is responsible for sensitivity of *Listeria monocytogenes* to mesentericin Y105. *Microbiology* **147**: 3263-3269
- Dalton, C.B., Austin, C.C., Sobel, J., Hayes, P.S., Bibb, W.F., Graves, L.M., Swaminathan, B., Proctor, M.E., and Griffin, P.M. (1997) An outbreak of gastroenteritis and fever due to *Listeria monocytogenes* in milk. *N Engl J Med* **336**: 100-105.
- Daniel, R., Stuert, K., and Gottschalk, G. (1995) Biochemical and molecular characterization of the oxidative branch of glycerol utilization by *Citrobacter freundii*. *J Bacteriol* **177**: 4392-4401.
- de Boer, M., Broekhuizen, C.P., and Postma, P.W. (1986) Regulation of glycerol kinase by enzyme III_{Glc} of the phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase system. *J Bacteriol* **167**: 393-395.
- De Reuse, H., Roy, A., and Danchin, A. (1985) Analysis of the *ptsH-ptsI-crr* region in *Escherichia coli* K-12: nucleotide sequence of the *ptsH* gene. *Gene* **35**: 199-207.
- Dean, D.A., Reizer, J., Nikaido, H., and Saier, M.H., Jr. (1990) Regulation of the maltose transport system of *Escherichia coli* by the glucose-specific enzyme III of the phosphoenolpyruvate-sugar phosphotransferase system. Characterization of inducer exclusion-resistant mutants and reconstitution of inducer exclusion in proteoliposomes. *J Biol Chem* **265**: 21005-21010.
- Decatur, A.L., and Portnoy, D.A. (2000) A PEST-like sequence in listeriolysin O essential for *Listeria monocytogenes* pathogenicity. *Science* **290**: 992-995.

- Deutscher, J., and Saier, M.H., Jr. (1983) ATP-dependent protein kinase-catalyzed phosphorylation of a seryl residue in HPr, a phosphate carrier protein of the phosphotransferase system in *Streptococcus pyogenes*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**: 6790-6794.
- Deutscher, J., Kessler, U., and Hengstenberg, W. (1985) *Streptococcal* phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase system: purification and characterization of a phosphoprotein phosphatase which hydrolyzes the phosphoryl bond in seryl-phosphorylated histidine-containing protein. *J Bacteriol* **163**: 1203-1209.
- Deutscher, J., and Sauerwald, H. (1986) Stimulation of dihydroxyacetone and glycerol kinase activity in *Streptococcus faecalis* by phosphoenolpyruvate-dependent phosphorylation catalyzed by enzyme I and HPr of the phosphotransferase system. *J Bacteriol* **166**: 829-836.
- Deutscher, J., Bauer, B., and Sauerwald, H. (1993) Regulation of glycerol metabolism in *Enterococcus faecalis* by phosphoenolpyruvate-dependent phosphorylation of glycerol kinase catalyzed by enzyme I and HPr of the phosphotransferase system. *J Bacteriol* **175**: 3730-3733.
- Deutscher, J., Reizer, J., Fischer, C., Galinier, A., Saier, M.H., Jr., and Steinmetz, M. (1994) Loss of protein kinase-catalyzed phosphorylation of HPr, a phosphocarrier protein of the phosphotransferase system, by mutation of the *ptsH* gene confers catabolite repression resistance to several catabolic genes of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **176**: 3336-3344.
- Deutscher, J., Küster, E., Bergstedt, U., Charrier, V., and Hillen, W. (1995) Protein kinase-dependent HPr/CcpA interaction links glycolytic activity to carbon catabolite repression in gram-positive bacteria. *Mol Microbiol* **15**: 1049-1053.
- Deutscher, J., Fischer, C., Charrier, V., Galinier, A., Lindner, C., Darbon, E., and Dossonnet, V. (1997) Regulation of carbon metabolism in gram-positive bacteria by protein phosphorylation. *Folia Microbiol (Praha)* **42**: 171-178.
- Deutscher, J., Francke, C., and Postma, P.W. (2006) How phosphotransferase system-related protein phosphorylation regulates carbohydrate metabolism in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* **70**: 939-1031.
- Domann, E., Leimeister-Wachter, M., Goebel, W., and Chakraborty, T. (1991) Molecular cloning, sequencing, and identification of a metalloprotease gene from *Listeria monocytogenes* that is species specific and physically linked to the listeriolysin gene. *Infect Immun* **59**: 65-72.
- Domann, E., Wehland, J., Rohde, M., Pistor, S., Hartl, M., Goebel, W., Leimeister-Wachter, M., Wuenscher, M., and Chakraborty, T. (1992) A novel bacterial virulence gene in *Listeria monocytogenes* required for host cell microfilament interaction with homology to the proline-rich region of vinculin. *Embo J* **11**: 1981-1990.
- Domann, E., Wehland, J., Niebuhr, K., Haffner, C., Leimeister-Wächter, M., and Chakraborty, T. (1993) Detection of a *prfA*-independent promoter responsible for listeriolysin gene expression in mutant *Listeria monocytogenes* strains lacking the PrfA regulator. *Infect Immun* **61**: 3073-3075.
- Dorschug, M., Frank, R., Kalbitzer, H.R., Hengstenberg, W., and Deutscher, J. (1984) Phosphoenolpyruvate-dependent phosphorylation site in enzyme III_{glc} of the *Escherichia coli* phosphotransferase system. *Eur J Biochem* **144**: 113-119.
- Dramsi, S., Dehoux, P., Lebrun, M., Goossens, P.L., and Cossart, P. (1997) Identification of four new members of the internalin multigene family of *Listeria monocytogenes* EGD. *Infect Immun* **65**: 1615-1625.
- Dramsi, S., Levi, S., Triller, A., and Cossart, P. (1998) Entry of *Listeria monocytogenes* into neurons occurs by cell-to-cell spread: an *in vitro* study. *Infect Immun* **66**: 4461-4468.

- Dramsi, S., Bourdichon, F., Cabanes, D., Lecuit, M., Fsihi, H., and Cossart, P. (2004) FbpA, a novel multifunctional *Listeria monocytogenes* virulence factor. *Mol Microbiol* **53**: 639-649.
- Dussurget, O., Cabanes, D., Dehoux, P., Lecuit, M., Buchrieser, C., Glaser, P., and Cossart, P. (2002) *Listeria monocytogenes* bile salt hydrolase is a PrfA-regulated virulence factor involved in the intestinal and hepatic phases of listeriosis. *Mol Microbiol* **45**: 1095-1106.
- Dussurget, O., Pizarro-Cerda, J., and Cossart, P. (2004) Molecular determinants of *Listeria monocytogenes* virulence. *Annu Rev Microbiol* **58**: 587-610.
- Eiglmeier, K., Boos, W., and Cole, S.T. (1987) Nucleotide sequence and transcriptional startpoint of the *glpT* gene of *Escherichia coli*: extensive sequence homology of the glycerol-3-phosphate transport protein with components of the hexose-6-phosphate transport system. *Mol Microbiol* **1**: 251-258.
- Eisenreich, W., Slaghuis, J., Laupitz, R., Bussemer, J., Stritzker, J., Schwarz, C., Schwarz, R., Dandekar, T., Goebel, W., and Bacher, A. (2006) ¹³C isotopologue perturbation studies of *Listeria monocytogenes* carbon metabolism and its modulation by the virulence regulator PrfA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 2040-2045.
- Eisermann, R., Deutscher, J., Gonzy-Treboul, G., and Hengstenberg, W. (1988) Site-directed mutagenesis with the *ptsH* gene of *Bacillus subtilis*. Isolation and characterization of heat-stable proteins altered at the ATP-dependent regulatory phosphorylation site. *J Biol Chem* **263**: 17050-17054.
- Eiting, M., Hagelüken, G., Schubert, W.D., and Heinz, D.W. (2005) The mutation G145S in PrfA, a key virulence regulator of *Listeria monocytogenes*, increases DNA-binding affinity by stabilizing the HTH motif. *Mol Microbiol* **56**: 433-446.
- Engelbrecht, F., Chun, S.K., Ochs, C., Hess, J., Lottspeich, F., Goebel, W., and Sokolovic, Z. (1996) A new PrfA-regulated gene of *Listeria monocytogenes* encoding a small, secreted protein which belongs to the family of internalins. *Mol Microbiol* **21**: 823-837.
- Epstein, W., Rothman-Denes, L.B., and Hesse, J. (1975) Adenosine 3':5'-cyclic monophosphate as mediator of catabolite repression in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **72**: 2300-2304.
- Ermolaeva, S., Belyi, Y., and Tartakovskii, I. (1999) Characteristics of induction of virulence factor expression by activated charcoal in *Listeria monocytogenes*. *FEMS Microbiol Lett* **174**: 137-141.
- Ermolaeva, S., Novella, S., Vega, Y., Ripio, M.T., Scotti, M., and Vázquez-Boland, J.A. (2004) Negative control of *Listeria monocytogenes* virulence genes by a diffusible autorepressor. *Mol Microbiol* **52**: 601-611.
- Erni, B., Siebold, C., Christen, S., Srinivas, A., Oberholzer, A., and Baumann, U. (2006) Small substrate, big surprise: fold, function and phylogeny of dihydroxyacetone kinases. *Cell Mol Life Sci* **63**: 890-900.
- Farber, J.M., and Peterkin, P.I. (1991) *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiol Rev* **55**: 476-511.
- Feucht, B.U., and Saier, M.H., Jr. (1980) Fine control of adenylate cyclase by the phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase systems in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* **141**: 603-610.
- Forage, R.G., and Foster, M. A. (1982) Glycerol fermentation in *Klebsiella pneumoniae*: functions of the coenzyme B12-dependent glycerol and diol dehydratases. *J Bacteriol* **149** : 413-419.

- Forage, R.G., and Lin, E.C. (1982) DHA system mediating aerobic and anaerobic dissimilation of glycerol in *Klebsiella pneumoniae* NCIB 418. *J Bacteriol* **151**: 591-599.
- Freitag, N.E., Rong, L., and Portnoy, D.A. (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**: 2537-2544.
- Freitag, N.E., and Portnoy, D.A. (1994) Dual promoters of the *Listeria monocytogenes prfA* transcriptional activator appear essential *in vitro* but are redundant *in vivo*. *Mol Microbiol* **12**: 845-853.
- Fu, D., Libson, A., Miercke, L.J., Weitzman, C., Nollert, P., Krucinski, J., and Stroud, R.M. (2000) Structure of a glycerol-conducting channel and the basis for its selectivity. *Science* **290**: 481-486.
- Fu, D., Libson, A., and Stroud, R. (2002) The structure of GlpF, a glycerol conducting channel. *Novartis Found Symp* **245**: 51-61; discussion 61-55, 165-168.
- Gaillard, J.L., Berche, P., Mounier, J., Richard, S., and Sansonetti, P. (1987) *In vitro* model of penetration and intracellular growth of *Listeria monocytogenes* in the human enterocyte-like cell line Caco-2. *Infect Immun* **55**: 2822-2829.
- Gaillard, J.L., Berche, P., Frehel, C., Gouin, E., and Cossart, P. (1991) Entry of *L. monocytogenes* into cells is mediated by internalin, a repeat protein reminiscent of surface antigens from gram-positive cocci. *Cell* **65**: 1127-1141.
- Galinier, A., Haiech, J., Kilhoffer, M.C., Jaquinod, M., Stulke, J., Deutscher, J., and Martin-Verstraete, I. (1997) The *Bacillus subtilis crh* gene encodes a HPr-like protein involved in carbon catabolite repression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 8439-8444.
- Galinier, A., Kravanja, M., Engelmann, R., Hengstenberg, W., Kilhoffer, M.C., Deutscher, J., and Haiech, J. (1998) New protein kinase and protein phosphatase families mediate signal transduction in bacterial catabolite repression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 1823-1828.
- Galinier, A., Deutscher, J., and Martin-Verstraete, I. (1999) Phosphorylation of either *crh* or HPr mediates binding of CcpA to the *Bacillus subtilis xyn cre* and catabolite repression of the *xyn* operon. *J Mol Biol* **286**: 307-314.
- Galinier, A., Lavergne, J.P., Geourjon, C., Fieulaine, S., Nessler, S., and Jault, J.M. (2002) A new family of phosphotransferases with a P-loop motif. *J Biol Chem* **277**: 11362-11367.
- Gandhi, M., and Chikindas, M.L. (2007) *Listeria*: A foodborne pathogen that knows how to survive. *Int J Food Microbiol* **113**: 1-15.
- Garcia-Alles, L.F., Siebold, C., Nyffeler, T.L., Flukiger-Bruhwiller, K., Schneider, P., Burgi, H.B., Baumann, U., and Erni, B. (2004) Phosphoenolpyruvate- and ATP-dependent dihydroxyacetone kinases: covalent substrate-binding and kinetic mechanism. *Biochemistry* **43**: 13037-13045.
- Garrett, D.S., Seok, Y.J., Peterkofsky, A., Gronenborn, A.M., and Clore, G.M. (1999) Solution structure of the 40,000 Mr phosphoryl transfer complex between the N-terminal domain of enzyme I and HPr. *Nat Struct Biol* **6**: 166-173.
- Gedde, M.M., Higgins, D.E., Tilney, L.G., and Portnoy, D.A. (2000) Role of listeriolysin O in cell-to-cell spread of *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun* **68**: 999-1003.
- Geese, M., Loureiro, J.J., Bear, J.E., Wehland, J., Gertler, F.B., and Sechi, A.S. (2002) Contribution of Ena/VASP proteins to intracellular motility of listeria requires phosphorylation and proline-rich core but not F-actin binding or multimerization. *Mol Biol Cell* **13**: 2383-2396.
- Gellin, B.G., and Broome, C.V. (1989) Listeriosis. *Jama* **261**: 1313-1320.

- Geoffroy, C., Gaillard, J.L., Alouf, J.E., and Berche, P. (1987) Purification, characterization, and toxicity of the sulfhydryl-activated hemolysin listeriolysin O from *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun* **55**: 1641-1646.
- Geoffroy, C., Raveneau, J., Beretti, J.L., Lecroisey, A., Vazquez-Boland, J.A., Alouf, J.E., and Berche, P. (1991) Purification and characterization of an extracellular 29-kilodalton phospholipase C from *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun* **59**: 2382-2388.
- Giard, J.C., Riboulet, E., Verneuil, N., Sanguinetti, M., Auffray, Y., and Hartke, A. (2006) Characterization of Ers, a PrfA-like regulator of *Enterococcus faecalis*. *FEMS Immunol Med Microbiol* **46**: 410-418.
- Gilbreth, S.E., Benson, A.K., and Hutkins, R.W. (2004) Catabolite repression and virulence gene expression in *Listeria monocytogenes*. *Curr Microbiol* **49**: 95-98.
- Glaser, P., Frangeul, L., Buchrieser, C., Rusniok, C., Amend, A., Baquero, F., Berche, P., Bloecker, H., Brandt, P., Chakraborty, T., Charbit, A., Chetouani, F., Couvé, E., de Daruvar, A., Dehoux, P., Domann, E., Domínguez-Bernal, G., Duchaud, E., Durant, L., Dussurget, O., Entian, K.D., Fsihi, H., Garcia-del Portillo, F., Garrido, P., Gautier, L., Goebel, W., Gómez-López, N., Hain, T., Hauf, J., Jackson, D., Jones, L.M., Kaerst, U., Kreft, J., Kuhn, M., Kunst, F., Kurapkat, G., Madueno, E., Maitournam, A., Vicente, J.M., Ng, E., Nedjari, H., Nordsiek, G., Novella, S., de Pablos, B., Pérez-Díaz, J.C., Purcell, R., Rimmel, B., Rose, M., Schlueter, T., Simoes, N., Tierrez, A., Vázquez-Boland, J.A., Voss, H., Wehland, J., and Cossart, P. (2001) Comparative genomics of *Listeria* species. *Science* **294**: 849-852.
- Glatz, E., Persson, M., and Rutberg, B. (1998) Antiterminator protein GlpP of *Bacillus subtilis* binds to *glpD* leader mRNA. *Microbiology* **144 (Pt 2)**: 449-456.
- Glomski, I.J., Gedde, M.M., Tsang, A.W., Swanson, J.A., and Portnoy, D.A. (2002) The *Listeria monocytogenes* hemolysin has an acidic pH optimum to compartmentalize activity and prevent damage to infected host cells. *J Cell Biol* **156**: 1029-1038.
- Goetz, M., Bubert, A., Wang, G., Chico-Calero, I., Vazquez-Boland, J.A., Beck, M., Slaghuis, J., Szalay, A.A., and Goebel, W. (2001) Microinjection and growth of bacteria in the cytosol of mammalian host cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 12221-12226.
- Goldfine, H., and Knob, C. (1992) Purification and characterization of *Listeria monocytogenes* phosphatidylinositol-specific phospholipase C. *Infect Immun* **60**: 4059-4067.
- Goldfine, H., and Wadsworth, S.J. (2002) Macrophage intracellular signaling induced by *Listeria monocytogenes*. *Microbes Infect* **4**: 1335-1343.
- Gonzy-Treboul, G., de Waard, J.H., Zagorec, M., and Postma, P.W. (1991) The glucose permease of the phosphotransferase system of *Bacillus subtilis*: evidence for IIGlc and IIIGlc domains. *Mol Microbiol* **5**: 1241-1249.
- Gray, M.L., and Killinger, A.H. (1966) *Listeria monocytogenes* and listeric infections. *Bacteriol Rev* **30**: 309-382.
- Greenberg, D.B., Stulke, J., and Saier, M.H., Jr. (2002) Domain analysis of transcriptional regulators bearing PTS regulatory domains. *Res Microbiol* **153**: 519-526.
- Gregory, S.H., Sagnimeni, A.J., and Wing, E.J. (1996) Expression of the inlAB operon by *Listeria monocytogenes* is not required for entry into hepatic cells *in vivo*. *Infect Immun* **64**: 3983-3986.
- Gregory, S.H., Sagnimeni, A.J., and Wing, E.J. (1997) Internalin B promotes the replication of *Listeria monocytogenes* in mouse hepatocytes. *Infect Immun* **65**: 5137-5141.
- Greiffenberg, L., Goebel, W., Kim, K.S., Daniels, J., and Kuhn, M. (2000) Interaction of *Listeria monocytogenes* with human brain microvascular endothelial cells: an electron microscopic study. *Infect Immun* **68**: 3275-3279.

- Guth, A., Engel, R., and Tropp, B.E. (1980) Uptake of glycerol 3-phosphate and some of its analogs by the hexose phosphate transport system of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **143**: 538-539.
- Gutknecht, R., Beutler, R., Garcia-Alles, L.F., Baumann, U., and Erni, B. (2001) The dihydroxyacetone kinase of *Escherichia coli* utilizes a phosphoprotein instead of ATP as phosphoryl donor. *Embo J* **20**: 2480-2486.
- Haas, A., and Brehm, K. (1993) Superoxide dismutase and catalase - biochemistry, molecular biology and some biomedical aspects. *Genet. Eng. Biotechnol.* **13**: 243-269.
- Halbedel, S., and Stülke, J. (2005) Dual phosphorylation of *Mycoplasma pneumoniae* HPr by Enzyme I and HPr kinase suggests an extended phosphoryl group susceptibility of HPr. *FEMS Microbiol Lett* **247**: 193-198.
- Harrington-Fowler, L., Henson, P.M., and Wilder, M.S. (1981) Fate of *Listeria monocytogenes* in resident and activated macrophages. *Infect Immun* **33**: 11-16.
- Heller, K.B., Lin, E.C., and Wilson, T.H. (1980) Substrate specificity and transport properties of the glycerol facilitator of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **144**: 274-278.
- Henkin, T.M. (1996) The role of CcpA transcriptional regulator in carbon metabolism in *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol Lett* **135**: 9-15.
- Herler, M., Bubert, A., Goetz, M., Vega, Y., Vázquez-Boland, J.A., and Goebel, W. (2001) Positive selection of mutations leading to loss or reduction of transcriptional activity of PrfA, the central regulator of *Listeria monocytogenes* virulence. *J Bacteriol* **183**: 5562-5570.
- Herro, R., Poncet, S., Cossart, P., Buchrieser, C., Gouin, E., Glaser, P., and Deutscher, J. (2005) How seryl-phosphorylated HPr inhibits PrfA, a transcription activator of *Listeria monocytogenes* virulence genes. *J Mol Microbiol Biotechnol* **9**: 224-234.
- Herzberg, O., Reddy, P., Sutrina, S., Saier, M.H., Jr., Reizer, J., and Kapadia, G. (1992) Structure of the histidine-containing phosphocarrier protein HPr from *Bacillus subtilis* at 2.0-Å resolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 2499-2503.
- Hof, H., Nichterlein, T., and Kretschmar, M. (1997) Management of listeriosis. *Clin Microbiol Rev* **10**: 345-357.
- Hogema, B.M., Arents, J.C., Inada, T., Aiba, H., van Dam, K., and Postma, P.W. (1997) Catabolite repression by glucose 6-phosphate, gluconate and lactose in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **24**: 857-867.
- Hogema, B.M., Arents, J.C., Bader, R., Eijkemans, K., Yoshida, H., Takahashi, H., Aiba, H., and Postma, P.W. (1998) Inducer exclusion in *Escherichia coli* by non-PTS substrates: the role of the PEP to pyruvate ratio in determining the phosphorylation state of enzyme IIAGlc. *Mol Microbiol* **30**: 487-498.
- Holmberg, C., and Rutberg, B. (1991) Expression of the gene encoding glycerol-3-phosphate dehydrogenase (*glpD*) in *Bacillus subtilis* is controlled by antitermination. *Mol Microbiol* **5**: 2891-2900.
- Holms, H. (1996) Flux analysis and control of the central metabolic pathways in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Rev* **19**: 85-116.
- Hu, K.Y., and Saier, M.H., Jr. (2002) Phylogeny of phosphoryl transfer proteins of the phosphoenolpyruvate-dependent sugar-transporting phosphotransferase system. *Res Microbiol* **153**: 405-415.
- Hudig, H., and Hengstenberg, W. (1980) The bacterial phosphoenolpyruvate dependent phosphotransferase system (PTS): solubilisation and kinetic parameters of the glucose-specific membrane bound enzyme II component of *Streptococcus faecalis*. *FEBS Lett* **114**: 103-106.

- Hueck, C.J., Hillen, W., and Saier, M.H., Jr. (1994) Analysis of a *cis*-active sequence mediating catabolite repression in gram-positive bacteria. *Res Microbiol* **145**: 503-518.
- Hurley, J.H., Faber, H.R., Worthyake, D., Meadow, N.D., Roseman, S., Pettigrew, D.W., and Remington, S.J. (1993) Structure of the regulatory complex of *Escherichia coli* III_{Glc} with glycerol kinase. *Science* **259**: 673-677.
- Huynh, P.L., Jankovic, I., Schnell, N.F., and Brückner, R. (2000) Characterization of an HPr kinase mutant of *Staphylococcus xylosus*. *J Bacteriol* **182**: 1895-1902.
- Inada, T., Kimata, K., and Aiba, H. (1996) Mechanism responsible for glucose-lactose diauxie in *Escherichia coli*: challenge to the cAMP model. *Genes Cells* **1**: 293-301.
- Ireton, K., Payrastra, B., Chap, H., Ogawa, W., Sakaue, H., Kasuga, M., and Cossart, P. (1996) A role for phosphoinositide 3-kinase in bacterial invasion. *Science* **274**: 780-782.
- Ireton, K., Payrastra, B., and Cossart, P. (1999) The *Listeria monocytogenes* protein InlB is an agonist of mammalian phosphoinositide 3-kinase. *J Biol Chem* **274**: 17025-17032.
- Irvine, A.S., and Guest, J.R. (1993) *Lactobacillus casei* contains a member of the CRP-FNR family. *Nucleic Acids Res* **21**: 753.
- Ishizuka, H., Hanamura, A., Kunimura, T., and Aiba, H. (1993) A lowered concentration of cAMP receptor protein caused by glucose is an important determinant for catabolite repression in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **10**: 341-350.
- Jault, J.M., Fieulaine, S., Nessler, S., Gonzalo, P., Di Pietro, A., Deutscher, J., and Galinier, A. (2000) The HPr kinase from *Bacillus subtilis* is a homo-oligomeric enzyme which exhibits strong positive cooperativity for nucleotide and fructose 1,6-bisphosphate binding. *J Biol Chem* **275**: 1773-1780.
- Jensen, V.B., Harty, J.T., and Jones, B.D. (1998) Interactions of the invasive pathogens *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes*, and *Shigella flexneri* with M cells and murine Peyer's patches. *Infect Immun* **66**: 3758-3766.
- Jin, R.Z., and Lin, E.C. (1984) An inducible phosphoenolpyruvate: dihydroxyacetone phosphotransferase system in *Escherichia coli*. *J Gen Microbiol* **130**: 83-88.
- Johansson, J., Mandin, P., Renzoni, A., Chiaruttini, C., Springer, M., and Cossart, P. (2002) An RNA thermosensor controls expression of virulence genes in *Listeria monocytogenes*. *Cell* **110**: 551-561.
- Johnson, J., Jinneman, K., Stelma, G., Smith, B.G., Lye, D., Messer, J., Ulaszek, J., Evsen, L., Gendel, S., Bennett, R.W., Swaminathan, B., Pruckler, J., Steigerwalt, A., Kathariou, S., Yildirim, S., Volokhov, D., Rasooly, A., Chizhikov, V., Wiedmann, M., Fortes, E., Duvall, R.E., and Hitchins, A.D. (2004) Natural atypical *Listeria innocua* strains with *Listeria monocytogenes* pathogenicity island 1 genes. *Appl Environ Microbiol* **70**: 4256-4266.
- Jones, B.D., Paterson, H.F., Hall, A., and Falkow, S. (1993) *Salmonella typhimurium* induces membrane ruffling by a growth factor-receptor-independent mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 10390-10394.
- Jones, B.E., Dossonnet, V., Kuster, E., Hillen, W., Deutscher, J., and Klevit, R.E. (1997) Binding of the catabolite repressor protein CcpA to its DNA target is regulated by phosphorylation of its corepressor HPr. *J Biol Chem* **272**: 26530-26535.
- Jones, D. (1990) Foodborne listeriosis. *Lancet* **336**: 1171-1174.
- Joseph, B., Przybilla, K., Stühler, C., Schauer, K., Slaghuis, J., Fuchs, T.M., and Goebel, W. (2006) Identification of *Listeria monocytogenes* genes contributing to intracellular replication by expression profiling and mutant screening. *J Bacteriol* **188**: 556-568.
- Joseph, B., and Goebel, W. (2007) Life of *Listeria monocytogenes* in the host cells' cytosol. *Microbes Infect* **9**: 1188-1195.

- Joseph, B., Mertins, S., Stoll, R., Schär, J., Umesha, K. R., Luo, Q., Goebel, W., and Müller-Altrock, S. (2008) Glycerol-metabolism and PrfA activity in *Listeria monocytogenes*. *J Bacteriol*; submitted.
- Jourlin-Castelli, C., Mani, N., Nakano, M.M., and Sonenshein, A.L. (2000) CcpC, a novel regulator of the LysR family required for glucose repression of the *citB* gene in *Bacillus subtilis*. *J Mol Biol* **295**: 865-878.
- Kadner, R., Murphy, G. P., Stephens, C. M. (1992) Two mechanisms for growth inhibition by elevated transport of sugar phosphates in *Escherichia coli*. *J Gen Microbiol* **38**: 2007-2014.
- Kathariou, S., Metz, P., Hof, H., and Goebel, W. (1987) Tn916-induced mutations in the hemolysin determinant affecting virulence of *Listeria monocytogenes*. *J Bacteriol* **169**: 1291-1297.
- Kaufmann, S.H. (1988) *Listeria monocytogenes* specific T-cell lines and clones. *Infection* **16 Suppl 2**: S128-136.
- Kayal, S., and Charbit, A. (2006) Listeriolysin O: a key protein of *Listeria monocytogenes* with multiple functions. *FEMS Microbiol Rev* **30**: 514-529.
- Kazmierczak, M.J., Mithoe, S.C., Boor, K.J., and Wiedmann, M. (2003) *Listeria monocytogenes* sigma B regulates stress response and virulence functions. *J Bacteriol* **185**: 5722-5734.
- Kim, H.J., Mittal, M., and Sonenshein, A.L. (2006) CcpC-dependent regulation of *citB* and *lmo0847* in *Listeria monocytogenes*. *J Bacteriol* **188**: 179-190.
- Kim, J.H., Guvener, Z.T., Cho, J.Y., Chung, K.C., and Chambliss, G.H. (1995) Specificity of DNA binding activity of the *Bacillus subtilis* catabolite control protein CcpA. *J Bacteriol* **177**: 5129-5134.
- Kistler, W.S., and Lin, E.C. (1972) Purification and properties of the flavine-stimulated anaerobic L- α -glycerophosphate dehydrogenase of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **112**: 539-547.
- Kocks, C., Gouin, E., Tabouret, M., Berche, P., Ohayon, H., and Cossart, P. (1992) *L. monocytogenes*-induced actin assembly requires the *actA* gene product, a surface protein. *Cell* **68**: 521-531.
- Kocks, C., Marchand, J.B., Gouin, E., d'Hauteville, H., Sansonetti, P.J., Carlier, M.F., and Cossart, P. (1995) The unrelated surface proteins ActA of *Listeria monocytogenes* and IcsA of *Shigella flexneri* are sufficient to confer actin-based motility on *Listeria innocua* and *Escherichia coli* respectively. *Mol Microbiol* **18**: 413-423.
- Kolb-Maurer, A., Kammerer, U., Maurer, M., Gentschev, I., Brocker, E.B., Rieckmann, P., and Kampgen, E. (2003) Production of IL-12 and IL-18 in human dendritic cells upon infection by *Listeria monocytogenes*. *FEMS Immunol Med Microbiol* **35**: 255-262.
- Kolb, A., Spassky, A., Chapon, C., Blazy, B., and Buc, H. (1983) On the different binding affinities of CRP at the *lac*, *gal* and *malT* promoter regions. *Nucleic Acids Res* **11**: 7833-7852.
- Kolb, A., Busby, S., Buc, H., Garges, S., and Adhya, S. (1993) Transcriptional regulation by cAMP and its receptor protein. *Annu Rev Biochem* **62**: 749-795.
- Kornberg, H.L., and Jones-Mortimer, M.C. (1975) PtsX: a gene involved in the uptake of glucose and fructose by *Escherichia coli*. *FEBS Lett* **51**: 1-4.
- Korner, H., Sofia, H.J., and Zumft, W.G. (2003) Phylogeny of the bacterial superfamily of Crp-Fnr transcription regulators: exploiting the metabolic spectrum by controlling alternative gene programs. *FEMS Microbiol Rev* **27**: 559-592.

- Kravanja, M., Engelmann, R., Dossonnet, V., Bluggel, M., Meyer, H.E., Frank, R., Galinier, A., Deutscher, J., Schnell, N., and Hengstenberg, W. (1999) The *hprK* gene of *Enterococcus faecalis* encodes a novel bifunctional enzyme: the HPr kinase/phosphatase. *Mol Microbiol* **31**: 59-66.
- Kreft, J., and Vázquez-Boland, J.A. (2001) Regulation of virulence genes in *Listeria*. *Int J Med Microbiol* **291**: 145-157.
- Kreft, J., Vázquez-Boland, J.A., Altrock, S., Domínguez-Bernal, G., and Goebel, W. (2002) Pathogenicity islands and other virulence elements in *Listeria*. *Curr Top Microbiol Immunol* **264**: 109-125.
- Kuhn, M., Kathariou, S., and Goebel, W. (1988) Hemolysin supports survival but not entry of the intracellular bacterium *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun* **56**: 79-82.
- Kuhn, M., and Goebel, W. (1989) Identification of an extracellular protein of *Listeria monocytogenes* possibly involved in intracellular uptake by mammalian cells. *Infect Immun* **57**: 55-61.
- Lalic-Mülthaler, M., Bohne, J., and Goebel, W. (2001) *In vitro* transcription of PrfA-dependent and -independent genes of *Listeria monocytogenes*. *Mol Microbiol* **42**: 111-120.
- Lampidis, R., Gross, R., Sokolovic, Z., Goebel, W., and Kreft, J. (1994) The virulence regulator protein of *Listeria ivanovii* is highly homologous to PrfA from *Listeria monocytogenes* and both belong to the Crp-Fnr family of transcription regulators. *Mol Microbiol* **13**: 141-151.
- Lang, V.J., Leystra-Lantz, C., and Cook, R.A. (1987) Characterization of the specific pyruvate transport system in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* **169**: 380-385.
- Larson, T.J., Schumacher, G., and Boos, W. (1982) Identification of the *glpT*-encoded sn-glycerol-3-phosphate permease of *Escherichia coli*, an oligomeric integral membrane protein. *J Bacteriol* **152**: 1008-1021.
- Lasa, I., David, V., Gouin, E., Marchand, J.B., and Cossart, P. (1995) The amino-terminal part of ActA is critical for the actin-based motility of *Listeria monocytogenes*; the central proline-rich region acts as a stimulator. *Mol Microbiol* **18**: 425-436.
- Lasa, I., Gouin, E., Goethals, M., Vancompernelle, K., David, V., Vandekerckhove, J., and Cossart, P. (1997) Identification of two regions in the N-terminal domain of ActA involved in the actin comet tail formation by *Listeria monocytogenes*. *Embo J* **16**: 1531-1540.
- Laurent, V., Loisel, T.P., Harbeck, B., Wehman, A., Grobe, L., Jockusch, B.M., Wehland, J., Gertler, F.B., and Carlier, M.F. (1999) Role of proteins of the Ena/VASP family in actin-based motility of *Listeria monocytogenes*. *J Cell Biol* **144**: 1245-1258.
- Leblond-Francillard, M., Gaillard, J.L., and Berche, P. (1989) Loss of catalase activity in Tn1545-induced mutants does not reduce growth of *Listeria monocytogenes in vivo*. *Infect Immun* **57**: 2569-2573.
- Leboeuf, C., Leblanc, L., Auffray, Y., and Hartke, A. (2000) Characterization of the *ccpA* gene of *Enterococcus faecalis*: identification of starvation-inducible proteins regulated by *ccpA*. *J Bacteriol* **182**: 5799-5806.
- Lecuit, M., Dramsi, S., Gottardi, C., Fedor-Chaiken, M., Gumbiner, B., and Cossart, P. (1999) A single amino acid in E-cadherin responsible for host specificity towards the human pathogen *Listeria monocytogenes*. *Embo J* **18**: 3956-3963.
- Leimeister-Wachter, M., Domann, E., and Chakraborty, T. (1991) Detection of a gene encoding a phosphatidylinositol-specific phospholipase C that is co-ordinately expressed with listeriolysin in *Listeria monocytogenes*. *Mol Microbiol* **5**: 361-366.

- Leimeister-Wächter, M., Haffner, C., Domann, E., Goebel, W., and Chakraborty, T. (1990) Identification of a gene that positively regulates expression of listeriolysin, the major virulence factor of *Listeria monocytogenes*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**: 8336-8340.
- Leimeister-Wächter, M., Domann, E., and Chakraborty, T. (1992) The expression of virulence genes in *Listeria monocytogenes* is thermoregulated. *J Bacteriol* **174**: 947-952.
- Lengeler, J.W., Jahreis, K., and Wehmeier, U.F. (1994) Enzymes II of the phospho enol pyruvate-dependent phosphotransferase systems: their structure and function in carbohydrate transport. *Biochim Biophys Acta* **1188**: 1-28.
- Lety, M.A., Frehel, C., Dubail, I., Beretti, J.L., Kayal, S., Berche, P., and Charbit, A. (2001) Identification of a PEST-like motif in listeriolysin O required for phagosomal escape and for virulence in *Listeria monocytogenes*. *Mol Microbiol* **39**: 1124-1139.
- Li, Z., Dai, J., Zheng, H., Liu, B., and Caudill, M. (2002) An integrated view of the roles and mechanisms of heat shock protein gp96-peptide complex in eliciting immune response. *Front Biosci* **7**: d731-751.
- Liao, D.I., Kapadia, G., Reddy, P., Saier, M.H., Jr., Reizer, J., and Herzberg, O. (1991) Structure of the IIA domain of the glucose permease of *Bacillus subtilis* at 2.2-Å resolution. *Biochemistry* **30**: 9583-9594.
- Lin, E.C., Levin, A.P., and Magasanik, B. (1960) The effect of aerobic metabolism on the inducible glycerol dehydrogenase of *Aerobacter aerogenes*. *J Biol Chem* **235**: 1824-1829.
- Lin, E.C. (1976) Glycerol dissimilation and its regulation in bacteria. *Annu Rev Microbiol* **30**: 535-578.
- Lin, E.C. (1986) Glycerol facilitator in *Escherichia coli*. *Methods Enzymol* **125**: 467-473.
- Lindgren, V., and Rutberg, L. (1974) Glycerol metabolism in *Bacillus subtilis*: gene-enzyme relationships. *J Bacteriol* **119**: 431-442.
- Lingnau, A., Domann, E., Hudel, M., Bock, M., Nichterlein, T., Wehland, J., and Chakraborty, T. (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**: 3896-3903.
- Lis, J.T., and Schleif, R. (1973) Different cyclic AMP requirements for induction of the arabinose and lactose operons of *Escherichia coli*. *J Mol Biol* **79**: 149-162.
- Lorca, G.L., Chung, Y.J., Barabote, R.D., Weyler, W., Schilling, C.H., and Saier, M.H., Jr. (2005) Catabolite repression and activation in *Bacillus subtilis*: dependency on CcpA, HPr, and HprK. *J Bacteriol* **187**: 7826-7839.
- Lorber, B. (1997) Listeriosis. *Clin Infect Dis* **24**: 1-9; quiz 10-11.
- Ludwig, H., Meinken, C., Matin, A., and Stülke, J. (2002a) Insufficient expression of the *ilv-leu* operon encoding enzymes of branched-chain amino acid biosynthesis limits growth of a *Bacillus subtilis* *ccpA* mutant. *J Bacteriol* **184**: 5174-5178.
- Ludwig, H., Rebhan, N., Blencke, H.M., Merzbacher, M., and Stülke, J. (2002b) Control of the glycolytic *gapA* operon by the catabolite control protein A in *Bacillus subtilis*: a novel mechanism of CcpA-mediated regulation. *Mol Microbiol* **45**: 543-553.
- Luo, Q., Rauch, M., Marr, A.K., Müller-Altrock, S., and Goebel, W. (2004) *In vitro* transcription of the *Listeria monocytogenes* virulence genes *inlC* and *mpl* reveals overlapping PrfA-dependent and -independent promoters that are differentially activated by GTP. *Mol Microbiol* **52**: 39-52.
- Luo, Q., Herler, M., Müller-Altrock, S., and Goebel, W. (2005) Supportive and inhibitory elements of a putative PrfA-dependent promoter in *Listeria monocytogenes*. *Mol Microbiol* **55**: 986-997.
- Mackness, G.B. (1962) Cellular resistance to infection. *J Exp Med* **116**: 381-406.

- Magnusson, I., Rothman, D.L., Jucker, B., Cline, G.W., Shulman, R.G., and Shulman, G.I. (1994) Liver glycogen turnover in fed and fasted humans. *Am J Physiol* **266**: E796-803.
- Marco, A.J., Altimira, J., Prats, N., Lopez, S., Dominguez, L., Domingo, M., and Briones, V. (1997) Penetration of *Listeria monocytogenes* in mice infected by the oral route. *Microb Pathog* **23**: 255-263.
- Marquez, J., Reinelt, S., Koch, B., Engelmann, R., Hengstenberg, W., and Scheffzek, K. (2006) Structure of the full-length enzyme I of the phosphoenolpyruvate-dependent sugar phosphotransferase system. *J Biol Chem* **281**: 32508-32515.
- Marquis, H., Bouwer, H. G. A., Hinrichs, D. J., and Portnoy, D. (1993) Intracytoplasmic growth and virulence of *Listeria monocytogenes* auxotrophic mutants. *Infect Immun* **61**: 3756-3760.
- Marquis, H., Goldfine, H., and Portnoy, D.A. (1997) Proteolytic pathways of activation and degradation of a bacterial phospholipase C during intracellular infection by *Listeria monocytogenes*. *J Cell Biol* **137**: 1381-1392.
- Marquis, H., and Hager, E.J. (2000) pH-regulated activation and release of a bacteria-associated phospholipase C during intracellular infection by *Listeria monocytogenes*. *Mol Microbiol* **35**: 289-298.
- Marr, A.K., Joseph, B., Mertins, S., Ecke, R., Müller-Altrock, S., and Goebel, W. (2006) Overexpression of PrfA leads to growth inhibition of *Listeria monocytogenes* in glucose-containing culture media by interfering with glucose uptake. *J Bacteriol* **188**: 3887-3901.
- Massillon, D., Bollen, M., De Wulf, H., Overloop, K., Vanstapel, F., Van Hecke, P., and Stalmans, W. (1995) Demonstration of a glycogen/glucose 1-phosphate cycle in hepatocytes from fasted rats. Selective inactivation of phosphorylase by 2-deoxy-2-fluoro-alpha-D-glucopyranosyl fluoride. *J Biol Chem* **270**: 19351-19356.
- McClure, P.J., Kelly, T.M., and Roberts, T.A. (1991) The effects of temperature, pH, sodium chloride and sodium nitrite on the growth of *Listeria monocytogenes*. *Int J Food Microbiol* **14**: 77-91.
- McLaughlan, A.M., and Foster, S.J. (1998) Molecular characterization of an autolytic amidase of *Listeria monocytogenes* EGD. *Microbiology* **144 (Pt 5)**: 1359-1367.
- Meins, M., Jenö, P., Müller, D., Richter, W.J., Rosenbusch, J.P., and Erni, B. (1993) Cysteine phosphorylation of the glucose transporter of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **268**: 11604-11609.
- Mengaud, J., Dramsi, S., Gouin, E., Vázquez-Boland, J.A., Milon, G., and Cossart, P. (1991a) Pleiotropic control of *Listeria monocytogenes* virulence factors by a gene that is autoregulated. *Mol Microbiol* **5**: 2273-2283.
- Mengaud, J., Geoffroy, C., and Cossart, P. (1991b) Identification of a new operon involved in *Listeria monocytogenes* virulence: its first gene encodes a protein homologous to bacterial metalloproteases. *Infect Immun* **59**: 1043-1049.
- Mengaud, J., Ohayon, H., Gounon, P., Mege, R.M., and Cossart, P. (1996) E-cadherin is the receptor for internalin, a surface protein required for entry of *L. monocytogenes* into epithelial cells. *Cell* **84**: 923-932.
- Merkel, T.J., Nelson, D.M., Brauer, C.L., and Kadner, R.J. (1992) Promoter elements required for positive control of transcription of the *Escherichia coli* *uhpT* gene. *J Bacteriol* **174**: 2763-2770.
- Merkel, T.J., Dahl, J.L., Ebright, R.H., and Kadner, R.J. (1995) Transcription activation at the *Escherichia coli* *uhpT* promoter by the catabolite gene activator protein. *J Bacteriol* **177**: 1712-1718.

- Mijakovic, I., Poncet, S., Galinier, A., Monedero, V., Fieulaine, S., Janin, J., Nessler, S., Marquez, J.A., Scheffzek, K., Hasenbein, S., Hengstenberg, W., and Deutscher, J. (2002) Pyrophosphate-producing protein dephosphorylation by HPr kinase/phosphorylase: a relic of early life? *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 13442-13447.
- Milenbachs, A.A., Brown, D.P., Moors, M., and Youngman, P. (1997) Carbon-source regulation of virulence gene expression in *Listeria monocytogenes*. *Mol Microbiol* **23**: 1075-1085.
- Milohanic, E., Jonquieres, R., Cossart, P., Berche, P., and Gaillard, J.L. (2001) The autolysin Ami contributes to the adhesion of *Listeria monocytogenes* to eukaryotic cells via its cell wall anchor. *Mol Microbiol* **39**: 1212-1224.
- Milohanic, E., Glaser, P., Coppee, J.Y., Frangeul, L., Vega, Y., Vazquez-Boland, J.A., Kunst, F., Cossart, P., and Buchrieser, C. (2003) Transcriptome analysis of *Listeria monocytogenes* identifies three groups of genes differently regulated by PrfA. *Mol Microbiol* **47**: 1613-1625.
- Mindich, L. (1968) Pathway for oxidative dissimilation of glycerol in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **96**: 565-566.
- Molin, M., Norbeck, J., and Blomberg, A. (2003) Dihydroxyacetone kinases in *Saccharomyces cerevisiae* are involved in detoxification of dihydroxyacetone. *J Biol Chem* **278**: 1415-1423.
- Monedero, V., Poncet, S., Mijakovic, I., Fieulaine, S., Dossonnet, V., Martin-Verstraete, I., Nessler, S., and Deutscher, J. (2001) Mutations lowering the phosphatase activity of HPr kinase/phosphatase switch off carbon metabolism. *Embo J* **20**: 3928-3937.
- Moreno, M.S., Schneider, B.L., Maile, R.R., Weyler, W., and Saier, M.H., Jr. (2001) Catabolite repression mediated by the CcpA protein in *Bacillus subtilis*: novel modes of regulation revealed by whole-genome analyses. *Mol Microbiol* **39**: 1366-1381.
- Moulder, J.W. (1991) Interaction of chlamydiae and host cells *in vitro*. *Microbiol Rev* **55**: 143-190.
- Mounier, J., Ryter, A., Coquis-Rondon, M., and Sansonetti, P.J. (1990) Intracellular and cell-to-cell spread of *Listeria monocytogenes* involves interaction with F-actin in the enterocytelike cell line Caco-2. *Infect Immun* **58**: 1048-1058.
- Murray, E.G.D., R. A. Webb, and M. B. R. Swann (1926) A disease of rabbits characterized by large mononuclear leucocytosis, caused by a hitherto undescribed bacillus, *Bacterium monocytogenes* (n. sp.). *J. Pathol. Bacteriol.* **29**: 407-439.
- Nadon, C.A., Bowen, B.M., Wiedmann, M., and Boor, K.J. (2002) Sigma B contributes to PrfA-mediated virulence in *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun* **70**: 3948-3952.
- Nam, T.W., Cho, S.H., Shin, D., Kim, J.H., Jeong, J.Y., Lee, J.H., Roe, J.H., Peterkofsky, A., Kang, S.O., Ryu, S., and Seok, Y.J. (2001) The *Escherichia coli* glucose transporter enzyme IICB(Glc) recruits the global repressor Mlc. *Embo J* **20**: 491-498.
- Nelson, S.O., Scholte, B.J., and Postma, P.W. (1982) Phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system-mediated regulation of carbohydrate metabolism in *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* **150**: 604-615.
- Nelson, S.O., Wright, J.K., and Postma, P.W. (1983) The mechanism of inducer exclusion. Direct interaction between purified III of the phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system and the lactose carrier of *Escherichia coli*. *Embo J* **2**: 715-720.
- Nguyen, C.C., and Saier, M.H., Jr. (1995) Phylogenetic, structural and functional analyses of the LacI-GalR family of bacterial transcription factors. *FEBS Lett* **377**: 98-102.

- Niebuhr, K., Ebel, F., Frank, R., Reinhard, M., Domann, E., Carl, U.D., Walter, U., Gertler, F.B., Wehland, J., and Chakraborty, T. (1997) A novel proline-rich motif present in ActA of *Listeria monocytogenes* and cytoskeletal proteins is the ligand for the EVH1 domain, a protein module present in the Ena/VASP family. *Embo J* **16**: 5433-5444.
- Nilsson, R.P., Beijer, L., and Rutberg, B. (1994) The *glpT* and *glpQ* genes of the glycerol regulon in *Bacillus subtilis*. *Microbiology* **140** (Pt 4): 723-730.
- Novotny, M.J., Frederickson, W.L., Waygood, E.B., and Saier, M.H., Jr. (1985) Allosteric regulation of glycerol kinase by enzyme III_{glc} of the phosphotransferase system in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* **162**: 810-816.
- Nyfelt, A. (1929) Etiologie de la mononucleose infectieuse. *C.R. Soc. Biol.* **101**: 590-591.
- Oberholzer, A.E., Schneider, P., Baumann, U., and Erni, B. (2006) Crystal structure of the nucleotide-binding subunit DhaL of the *Escherichia coli* dihydroxyacetone kinase. *J Mol Biol* **359**: 539-545.
- Palmer, M., Harris, R., Freytag, C., Kehoe, M., Tranum-Jensen, J., and Bhakdi, S. (1998) Assembly mechanism of the oligomeric streptolysin O pore: the early membrane lesion is lined by a free edge of the lipid membrane and is extended gradually during oligomerization. *Embo J* **17**: 1598-1605.
- Pamer, E.G. (2004) Immune responses to *Listeria monocytogenes*. *Nat Rev Immunol* **4**: 812-823.
- Pao, G.M., Wu, L.F., Johnson, K.D., Hofte, H., Chrispeels, M.J., Sweet, G., Sandal, N.N., and Saier, M.H., Jr. (1991) Evolution of the MIP family of integral membrane transport proteins. *Mol Microbiol* **5**: 33-37.
- Parida, S.K., Domann, E., Rohde, M., Muller, S., Darji, A., Hain, T., Wehland, J., and Chakraborty, T. (1998) Internalin B is essential for adhesion and mediates the invasion of *Listeria monocytogenes* into human endothelial cells. *Mol Microbiol* **28**: 81-93.
- Park, S.F., and Kroll, R.G. (1993) Expression of listeriolysin and phosphatidylinositol-specific phospholipase C is repressed by the plant-derived molecule cellobiose in *Listeria monocytogenes*. *Mol Microbiol* **8**: 653-661.
- Pas, H.H., and Robillard, G.T. (1988) S-phosphocysteine and phosphohistidine are intermediates in the phosphoenolpyruvate-dependent mannitol transport catalyzed by *Escherichia coli* EIIMtl. *Biochemistry* **27**: 5835-5839.
- Patel, H.V., Vyas, K.A., Savtchenko, R., and Roseman, S. (2006) The monomer/dimer transition of enzyme I of the *Escherichia coli* phosphotransferase system. *J Biol Chem* **281**: 17570-17578.
- Paulsen, I.T., Nguyen, L., Sliwinski, M.K., Rabus, R., and Saier, M.H., Jr. (2000a) Microbial genome analyses: comparative transport capabilities in eighteen prokaryotes. *J Mol Biol* **301**: 75-100.
- Paulsen, I.T., Reizer, J., Jin, R.Z., Lin, E.C., and Saier, M.H., Jr. (2000b) Functional genomic studies of dihydroxyacetone utilization in *Escherichia coli*. *Microbiology* **146** (Pt 10): 2343-2344.
- Petersen, A.B., Wulf, H.C., Gniadecki, R., and Gajkowska, B. (2004) Dihydroxyacetone, the active tanning ingredient in sunless tanning lotions, induces DNA damage, cell-cycle block and apoptosis in cultured HaCaT keratinocytes. *Mutat Res* **560**: 173-186.
- Pettigrew, D.W., Ma, D.P., Conrad, C.A., and Johnson, J.R. (1988) *Escherichia coli* glycerol kinase. Cloning and sequencing of the *glpK* gene and the primary structure of the enzyme. *J Biol Chem* **263**: 135-139.
- Pilgrim, S., Kolb-Maurer, A., Gentschev, I., Goebel, W., and Kuhn, M. (2003) Deletion of the gene encoding p60 in *Listeria monocytogenes* leads to abnormal cell division and loss of actin-based motility. *Infect Immun* **71**: 3473-3484.
- Pirie, J.H.H. (1940) *Listeria*: Change of name for a genus of bacteria. *Nature* **145**: 264.

- Pompeo, F., Granet, Y., Lavergne, J.P., Grangeasse, C., Nessler, S., Jault, J.M., and Galinier, A. (2003) Regulation and mutational analysis of the HPr kinase/phosphorylase from *Bacillus subtilis*. *Biochemistry* **42**: 6762-6771.
- Poncet, S., Mijakovic, I., Nessler, S., Gueguen-Chaignon, V., Chaptal, V., Galinier, A., Boel, G., Maze, A., and Deutscher, J. (2004) HPr kinase/phosphorylase, a Walker motif A-containing bifunctional sensor enzyme controlling catabolite repression in Gram-positive bacteria. *Biochim Biophys Acta* **1697**: 123-135.
- Poolman, B., Knol, J., Mollet, B., Nieuwenhuis, B., and Sulter, G. (1995) Regulation of bacterial sugar-H⁺ symport by phosphoenolpyruvate-dependent enzyme I/HPr-mediated phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 778-782.
- Portnoy, D.A., Jacks, P.S., and Hinrichs, D.J. (1988) Role of hemolysin for the intracellular growth of *Listeria monocytogenes*. *J Exp Med* **167**: 1459-1471.
- Portnoy, D.A., Chakraborty, T., Goebel, W., and Cossart, P. (1992) Molecular determinants of *Listeria monocytogenes* pathogenesis. *Infect Immun* **60**: 1263-1267.
- Postma, P.W., Epstein, W., Schuitema, A.R., and Nelson, S.O. (1984) Interaction between III_{Glc} of the phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system and glycerol kinase of *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* **158**: 351-353.
- Postma, P.W., Lengeler, J.W., and Jacobson, G.R. (1993) Phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase systems of bacteria. *Microbiol Rev* **57**: 543-594.
- Powell, B.S., Court, D.L., Inada, T., Nakamura, Y., Michotey, V., Cui, X., Reizer, A., Saier, M.H., Jr., and Reizer, J. (1995) Novel proteins of the phosphotransferase system encoded within the *rpoN* operon of *Escherichia coli*. Enzyme I_{ANtr} affects growth on organic nitrogen and the conditional lethality of an *erats* mutant. *J Biol Chem* **270**: 4822-4839.
- Powers, D.A., and Roseman, S. (1984) The primary structure of *Salmonella typhimurium* HPr, a phosphocarrier protein of the phosphoenolpyruvate:glycose phosphotransferase system. A correction. *J Biol Chem* **259**: 15212-15214.
- Poyart, C., Abachin, E., Razafimanantsoa, I., and Berche, P. (1993) The zinc metalloprotease of *Listeria monocytogenes* is required for maturation of phosphatidylcholine phospholipase C: direct evidence obtained by gene complementation. *Infect Immun* **61**: 1576-1580.
- Premaratne, R.J., Lin, W.J., and Johnson, E.A. (1991) Development of an improved chemically defined minimal medium for *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol* **57**: 3046-3048.
- Presper, K.A., Wong, C.Y., Liu, L., Meadow, N.D., and Roseman, S. (1989) Site-directed mutagenesis of the phosphocarrier protein. III_{Glc}, a major signal-transducing protein in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**: 4052-4055.
- Racz, P., Tenner, K., and Mero, E. (1972) Experimental *Listeria enteritis*. I. An electron microscopic study of the epithelial phase in experimental *listeria* infection. *Lab Invest* **26**: 694-700.
- Raffelsbauer, D., Bubert, A., Engelbrecht, F., Scheinpflug, J., Simm, A., Hess, J., Kaufmann, S.H., and Goebel, W. (1998) The gene cluster *inlC2DE* of *Listeria monocytogenes* contains additional new internalin genes and is important for virulence in mice. *Mol Gen Genet* **260**: 144-158.
- Rauch, M., Luo, Q., Müller-Altrock, S., and Goebel, W. (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**: 800-804.

- Raveneau, J., Geoffroy, C., Beretti, J.L., Gaillard, J.L., Alouf, J.E., and Berche, P. (1992) Reduced virulence of a *Listeria monocytogenes* phospholipase-deficient mutant obtained by transposon insertion into the zinc metalloprotease gene. *Infect Immun* **60**: 916-921.
- Reid, S.D., Montgomery, A.G., Voyich, J.M., DeLeo, F.R., Lei, B., Ireland, R.M., Green, N.M., Liu, M., Lukomski, S., and Musser, J.M. (2003) Characterization of an extracellular virulence factor made by group A *Streptococcus* with homology to the *Listeria monocytogenes* internalin family of proteins. *Infect Immun* **71**: 7043-7052.
- Reizer, J., Novotny, M.J., Stuiver, I., and Saier, M.H., Jr. (1984) Regulation of glycerol uptake by the phosphoenolpyruvate-sugar phosphotransferase system in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **159**: 243-250.
- Reizer, J., Saier, M.H., Jr., Deutscher, J., Grenier, F., Thompson, J., and Hengstenberg, W. (1988) The phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system in gram-positive bacteria: properties, mechanism, and regulation. *Crit Rev Microbiol* **15**: 297-338.
- Reizer, J., Sutrina, S.L., Saier, M.H., Stewart, G.C., Peterkofsky, A., and Reddy, P. (1989) Mechanistic and physiological consequences of HPr(ser) phosphorylation on the activities of the phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system in gram-positive bacteria: studies with site-specific mutants of HPr. *Embo J* **8**: 2111-2120.
- Reizer, J., Sutrina, S.L., Wu, L.F., Deutscher, J., Reddy, P., and Saier, M.H., Jr. (1992) Functional interactions between proteins of the phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase systems of *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **267**: 9158-9169.
- Reizer, J., Reizer, A., and Saier, M.H., Jr. (1993) The MIP family of integral membrane channel proteins: sequence comparisons, evolutionary relationships, reconstructed pathway of evolution, and proposed functional differentiation of the two repeated halves of the proteins. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **28**: 235-257.
- Reizer, J., Hoischen, C., Titgemeyer, F., Rivolta, C., Rabus, R., Stülke, J., Karamata, D., Saier, M.H., Jr., and Hillen, W. (1998) A novel protein kinase that controls carbon catabolite repression in bacteria. *Mol Microbiol* **27**: 1157-1169.
- Renesto, P., Ogata, H., Audic, S., Claverie, J.M., and Raoult, D. (2005) Some lessons from *Rickettsia* genomics. *FEMS Microbiol Rev* **29**: 99-117.
- Renzoni, A., Klarsfeld, A., Dramsi, S., and Cossart, P. (1997) Evidence that PrfA, the pleiotropic activator of virulence genes in *Listeria monocytogenes*, can be present but inactive. *Infect Immun* **65**: 1515-1518.
- Richey, D.P., and Lin, E.C. (1972) Importance of facilitated diffusion for effective utilization of glycerol by *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **112**: 784-790.
- Ripio, M.T., Dominguez-Bernal, G., Suarez, M., Brehm, K., Berche, P., and Vazquez-Boland, J.A. (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**: 371-384.
- Ripio, M.T., Brehm, K., Lara, M., Suarez, M., and Vazquez-Boland, J.A. (1997a) Glucose-1-phosphate utilization by *Listeria monocytogenes* is PrfA dependent and coordinately expressed with virulence factors. *J Bacteriol* **179**: 7174-7180.
- Ripio, M.T., Dominguez-Bernal, G., Lara, M., Suarez, M., and Vazquez-Boland, J.A. (1997b) A Gly145Ser substitution in the transcriptional activator PrfA causes constitutive overexpression of virulence factors in *Listeria monocytogenes*. *J Bacteriol* **179**: 1533-1540.
- Robbins, J.R., Barth, A.I., Marquis, H., de Hostos, E.L., Nelson, W.J., and Theriot, J.A. (1999) *Listeria monocytogenes* exploits normal host cell processes to spread from cell to cell. *J Cell Biol* **146**: 1333-1350.

- Robert-Koch-Institut (2006) Listeriose: Situationsbericht nach den Meldedaten für 2001 bis 2005. *Epidemiologisches Bulletin* **49**.
- Roberts, A.J., and Wiedmann, M. (2003) Pathogen, host and environmental factors contributing to the pathogenesis of listeriosis. *Cell Mol Life Sci* **60**: 904-918.
- Robillard, G.T., and Broos, J. (1999) Structure/function studies on the bacterial carbohydrate transporters, enzymes II, of the phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system. *Biochim Biophys Acta* **1422**: 73-104.
- Rocourt, J., Hof, H., Schrettenbrunner, A., Malinverni, R., and Bille, J. (1986) [Acute purulent *Listeria seelingeri* meningitis in an immunocompetent adult]. *Schweiz Med Wochenschr* **116**: 248-251.
- Rocourt, J., and Bille, J. (1997) Foodborne listeriosis. *World Health Stat Q* **50**: 67-73.
- Romano, A.H., Saier, M.H., Jr., Harriott, O.T., and Reizer, J. (1990) Physiological studies on regulation of glycerol utilization by the phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system in *Enterococcus faecalis*. *J Bacteriol* **172**: 6741-6748.
- Rosu, V., Chadfield, M.S., Santona, A., Christensen, J.P., Thomsen, L.E., Rubino, S., and Olsen, J.E. (2007) Effects of *crp* deletion in *Salmonella enterica* serotype Gallinarum. *Acta Vet Scand* **49**: 14.
- Ruch, F.E., Lengeler, J., and Lin, E.C. (1974) Regulation of glycerol catabolism in *Klebsiella aerogenes*. *J Bacteriol* **119**: 50-56.
- Russell, R.B., Marquez, J.A., Hengstenberg, W., and Scheffzek, K. (2002) Evolutionary relationship between the bacterial HPr kinase and the ubiquitous PEP-carboxykinase: expanding the P-loop nucleotidyl transferase superfamily. *FEBS Lett* **517**: 1-6.
- Rutberg, B. (1997) Antitermination of transcription of catabolic operons. *Mol Microbiol* **23**: 413-421.
- Saier, M.H., Jr., and Roseman, S. (1976) Sugar transport. Inducer exclusion and regulation of the melibiose, maltose, glycerol, and lactose transport systems by the phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system. *J Biol Chem* **251**: 6606-6615.
- Saier, M.H., Jr., and Reizer, J. (1992) Proposed uniform nomenclature for the proteins and protein domains of the bacterial phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase system. *J Bacteriol* **174**: 1433-1438.
- Sallen, B., Rajoharison, A., Desvarenne, S., Quinn, F., and Mabilat, C. (1996) Comparative analysis of 16S and 23S rRNA sequences of *Listeria* species. *Int J Syst Bacteriol* **46**: 669-674.
- Samarin, S., Romero, S., Kocks, C., Didry, D., Pantaloni, D., and Carlier, M.F. (2003) How VASP enhances actin-based motility. *J Cell Biol* **163**: 131-142.
- Sanger, J.M., Sanger, J.W., and Southwick, F.S. (1992) Host cell actin assembly is necessary and likely to provide the propulsive force for intracellular movement of *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun* **60**: 3609-3619.
- Sansonetti, P.J., Ryter, A., Clerc, P., Maurelli, A.T., and Mounier, J. (1986) Multiplication of *Shigella flexneri* within HeLa cells: lysis of the phagocytic vacuole and plasmid-mediated contact hemolysis. *Infect Immun* **51**: 461-469.
- Schlech, W.F., 3rd (2000) Foodborne listeriosis. *Clin Infect Dis* **31**: 770-775.
- Schnupf, P., Portnoy, D.A., and Decatur, A.L. (2006) Phosphorylation, ubiquitination and degradation of listeriolysin O in mammalian cells: role of the PEST-like sequence. *Cell Microbiol* **8**: 353-364.
- Schuchat, A., Swaminathan, B., and Broome, C.V. (1991) Epidemiology of human listeriosis. *Clin Microbiol Rev* **4**: 169-183.
- Schweizer, H., Boos, W., and Larson, T.J. (1985) Repressor for the sn-glycerol-3-phosphate regulon of *Escherichia coli* K-12: cloning of the *glpR* gene and identification of its product. *J Bacteriol* **161**: 563-566.

- Schweizer, H., and Larson, T.J. (1987) Cloning and characterization of the aerobic sn-glycerol-3-phosphate dehydrogenase structural gene *glpD* of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* **169**: 507-513.
- Scotti, M., Lacharme-Lora, L., Wagner, M., Chico-Calero, I., Losito, P., and Vazquez-Boland, J.A. (2006) Coexpression of virulence and fosfomycin susceptibility in *Listeria*: molecular basis of an antimicrobial *in vitro-in vivo* paradox. *Nat Med* **12**: 515-517.
- Seeliger, H.P., and Jones, D. (1986) Genus *Listeria*. In: M. Sneath, Sarpe and Holt (Eds.) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Williams and Wilkins. Baltimore, MD. 1235-1245
- Seeliger, H.P., and Langer, B. (1989) Serological analysis of the genus *Listeria*. Its values and limitations. *Int J Food Microbiol* **8**: 245-248.
- Sheehan, B., Kocks, C., Dramsi, S., Gouin, E., Klarsfeld, A.D., Mengaud, J., and Cossart, P. (1994) Molecular and genetic determinants of the *Listeria monocytogenes* infectious process. *Curr Top Microbiol Immunol* **192**: 187-216.
- Sheehan, B., Klarsfeld, A., Msadek, T., and Cossart, P. (1995) Differential activation of virulence gene expression by PrfA, the *Listeria monocytogenes* virulence regulator. *J Bacteriol* **177**: 6469-6476.
- Sheehan, B., Klarsfeld, A., Ebricht, R., and Cossart, P. (1996) A single substitution in the putative helix-turn-helix motif of the pleiotropic activator PrfA attenuates *Listeria monocytogenes* virulence. *Mol Microbiol* **20**: 785-797.
- Shen, Y., Naujokas, M., Park, M., and Ireton, K. (2000) InIB-dependent internalization of *Listeria* is mediated by the Met receptor tyrosine kinase. *Cell* **103**: 501-510.
- Shetron-Rama, L.M., Mueller, K., Bravo, J.M., Bouwer, H.G., Way, S.S., and Freitag, N.E. (2003) Isolation of *Listeria monocytogenes* mutants with high-level *in vitro* expression of host cytosol-induced gene products. *Mol Microbiol* **48**: 1537-1551.
- Siebold, C., Flukiger, K., Beutler, R., and Erni, B. (2001) Carbohydrate transporters of the bacterial phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase system (PTS). *FEBS Lett* **504**: 104-111.
- Siebold, C., Arnold, I., Garcia-Alles, L.F., Baumann, U., and Erni, B. (2003a) Crystal structure of the *Citrobacter freundii* dihydroxyacetone kinase reveals an eight-stranded alpha-helical barrel ATP-binding domain. *J Biol Chem* **278**: 48236-48244.
- Siebold, C., Garcia-Alles, L.F., Erni, B., and Baumann, U. (2003b) A mechanism of covalent substrate binding in the x-ray structure of subunit K of the *Escherichia coli* dihydroxyacetone kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 8188-8192.
- Silverman, D.J., and Bond, S.B. (1984) Infection of human vascular endothelial cells by *Rickettsia rickettsii*. *J Infect Dis* **149**: 201-206.
- Skoble, J., Portnoy, D.A., and Welch, M.D. (2000) Three regions within ActA promote Arp2/3 complex-mediated actin nucleation and *Listeria monocytogenes* motility. *J Cell Biol* **150**: 527-538.
- Slaghuis, J., Goetz, M., Engelbrecht, F., and Goebel, W. (2004) Inefficient replication of *Listeria innocua* in the cytosol of mammalian cells. *J Infect Dis* **189**: 393-401.
- Smith, G.A., Marquis, H., Jones, S., Johnston, N.C., Portnoy, D.A., and Goldfine, H. (1995) The two distinct phospholipases C of *Listeria monocytogenes* have overlapping roles in escape from a vacuole and cell-to-cell spread. *Infect Immun* **63**: 4231-4237.
- Smith, J.L., Bencivengo, M.M., Buchanan, R.L., and Kunsch, C.A. (1986) Enterotoxin A production in *Staphylococcus aureus*: inhibition by glucose. *Arch Microbiol* **144**: 131-136.
- Sonna, L. A., Ambudkar, S. V., and Maloney, P. C. (1988) The mechanism of glucose-6-phosphate transport by *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **263**: 6625-6630.

- Springer, V. (2007) *The Prokaryotes (3.Auflage)*.
- St Martin, E.J., Freedberg, W.B., and Lin, E.C. (1977) Kinase replacement by a dehydrogenase for *Escherichia coli* glycerol utilization. *J Bacteriol* **131**: 1026-1028.
- Stoll, R., Mertins, R., Müller-Altrock, S., and Goebel, W. (2008) Modulation of PrfA activity in *Listeria monocytogenes* upon growth in different culture media. *Mol Microbiol*; submitted.
- Stülke, J., Arnaud, M., Rapoport, G., and Martin-Verstraete, I. (1998) PRD--a protein domain involved in PTS-dependent induction and carbon catabolite repression of catabolic operons in bacteria. *Mol Microbiol* **28**: 865-874.
- Stülke, J., and Hillen, W. (1999) Carbon catabolite repression in bacteria. *Curr Opin Microbiol* **2**: 195-201.
- Stülke, J., and Hillen, W. (2000) Regulation of carbon catabolism in *Bacillus* species. *Annu Rev Microbiol* **54**: 849-880.
- Suarez, M., Gonzalez-Zorn, B., Vega, Y., Chico-Calero, I., and Vazquez-Boland, J.A. (2001) A role for ActA in epithelial cell invasion by *Listeria monocytogenes*. *Cell Microbiol* **3**: 853-864.
- Sue, D., Boor, K.J., and Wiedmann, M. (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**: 3247-3256.
- Sun, J., van den Heuvel, J., Soucaille, P., Qu, Y., and Zeng, A.P. (2003) Comparative genomic analysis of dha regulon and related genes for anaerobic glycerol metabolism in bacteria. *Biotechnol Prog* **19**: 263-272.
- Swartz, M.A., Welch, D.F., Narayanan, R.P., and Greenfield, R.A. (1991) Catalase-negative *Listeria monocytogenes* causing meningitis in an adult. Clinical and laboratory features. *Am J Clin Pathol* **96**: 130-133.
- Sweet, G., Gandor, C., Voegelé, R., Wittekindt, N., Beuerle, J., Truniger, V., Lin, E.C., and Boos, W. (1990) Glycerol facilitator of *Escherichia coli*: cloning of glpF and identification of the glpF product. *J Bacteriol* **172**: 424-430.
- Teplitski, M., Goodier, R.I., and Ahmer, B.M. (2006) Catabolite repression of the SirA regulatory cascade in *Salmonella enterica*. *Int J Med Microbiol* **296**: 449-466.
- Tepljakov, A., Lim, K., Zhu, P.P., Kapadia, G., Chen, C.C., Schwartz, J., Howard, A., Reddy, P.T., Peterkofsky, A., and Herzberg, O. (2006) Structure of phosphorylated enzyme I, the phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system sugar translocation signal protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 16218-16223.
- Tessier, F.J., Monnier, V.M., Sayre, L.M., and Kornfield, J.A. (2003) Triosidines: novel Maillard reaction products and cross-links from the reaction of triose sugars with lysine and arginine residues. *Biochem J* **369**: 705-719.
- Theriot, J.A., Mitchison, T.J., Tilney, L.G., and Portnoy, D.A. (1992) The rate of actin-based motility of intracellular *Listeria monocytogenes* equals the rate of actin polymerization. *Nature* **357**: 257-260.
- Thevenot, T., Brochu, D., Vadeboncoeur, C., and Hamilton, I.R. (1995) Regulation of ATP-dependent P-(Ser)-HPr formation in *Streptococcus mutans* and *Streptococcus salivarius*. *J Bacteriol* **177**: 2751-2759.
- Thirumuruhan, R., Rajashankar, K., Fedorov, A. A., Dodatko, T., Chance, M. R., Cossart, P., Almo, S. C., N. Y. S. G. R. C. (NYSGRC), and Burley, S. K. (2003) Crystal structure of PrfA, the transcriptional regulator in *Listeria monocytogenes*.
- Tilney, L.G., and Portnoy, D.A. (1989) Actin filaments and the growth, movement, and spread of the intracellular bacterial parasite, *Listeria monocytogenes*. *J Cell Biol* **109**: 1597-1608.

- Titgemeyer, F., Eisermann, R., Hengstenberg, W., and Lengeler, J.W. (1990) The nucleotide sequence of *ptsH* gene from *Klebsiella pneumoniae*. *Nucleic Acids Res* **18**: 1898.
- Tobisch, S., Zuhlke, D., Bernhardt, J., Stülke, J., and Hecker, M. (1999) Role of CcpA in regulation of the central pathways of carbon catabolism in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **181**: 6996-7004.
- Troxler, R., von Graevenitz, A., Funke, G., Wiedemann, B., and Stock, I. (2000) Natural antibiotic susceptibility of *Listeria* species: *L. grayi*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. monocytogenes*, *L. seeligeri* and *L. welshimeri* strains. *Clin Microbiol Infect* **6**: 525-535.
- Tsai, H.N., and Hodgson, D.A. (2003) Development of a synthetic minimal medium for *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol* **69**: 6943-6945.
- Ullmann, A., and Danchin, A. (1983) Role of cyclic AMP in bacteria. *Adv Cycl Nucl Res* **15**: 1-53.
- Vadeboncoeur, C., Brochu, D., and Reizer, J. (1991) Quantitative determination of the intracellular concentration of the various forms of HPr, a phosphocarrier protein of the phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase system in growing cells of oral streptococci. *Anal Biochem* **196**: 24-30.
- Vazquez-Boland, J.A., Kocks, C., Dramsi, S., Ohayon, H., Geoffroy, C., Mengaud, J., and Cossart, P. (1992) Nucleotide sequence of the lecithinase operon of *Listeria monocytogenes* and possible role of lecithinase in cell-to-cell spread. *Infect Immun* **60**: 219-230.
- Vázquez-Boland, J.A., Kuhn, M., Berche, P., Chakraborty, T., Domínguez-Bernal, G., Goebel, W., González-Zorn, B., Wehland, J., and Kreft, J. (2001) *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clin Microbiol Rev* **14**: 584-640.
- Vega, Y., Dickneite, C., Ripio, M.T., Böckmann, R., Gonzalez-Zorn, B., Novella, S., Domínguez-Bernal, G., Goebel, W., and Vázquez-Boland, J.A. (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**: 6655-6660.
- Vega, Y., Rauch, M., Banfield, M.J., Ermolaeva, S., Scotti, M., Goebel, W., and Vazquez-Boland, J.A. (2004) New *Listeria monocytogenes* *prfA** mutants, transcriptional properties of PrfA* proteins and structure-function of the virulence regulator PrfA. *Mol Microbiol* **52**: 1553-1565.
- Wagner, A., Kuster-Schock, E., and Hillen, W. (2000) Sugar uptake and carbon catabolite repression in *Bacillus megaterium* strains with inactivated *ptsHI*. *J Mol Microbiol Biotechnol* **2**: 587-592.
- Warner, J.B., and Lolkema, J.S. (2003a) CcpA-dependent carbon catabolite repression in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* **67**: 475-490.
- Warner, J.B., and Lolkema, J.S. (2003b) A Crh-specific function in carbon catabolite repression in *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol Lett* **220**: 277-280.
- Way, S.S., Thompson, L.J., Lopes, J.E., Hajjar, A.M., Kollmann, T.R., Freitag, N.E., and Wilson, C.B. (2004) Characterization of flagellin expression and its role in *Listeria monocytogenes* infection and immunity. *Cell Microbiol* **6**: 235-242.
- Waygood, E.B. (1998) The structure and function of HPr. *Biochem Cell Biol* **76**: 359-367.
- Wehtje, C., Beijer, L., Nilsson, R.P., and Rutberg, B. (1995) Mutations in the glycerol kinase gene restore the ability of a *ptsGHI* mutant of *Bacillus subtilis* to grow on glycerol. *Microbiology* **141** (Pt 5): 1193-1198.
- Weickert, M.J., and Chambliss, G.H. (1990) Site-directed mutagenesis of a catabolite repression operator sequence in *Bacillus subtilis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**: 6238-6242.

- Welch, M.D., Iwamatsu, A., and Mitchison, T.J. (1997) Actin polymerization is induced by Arp2/3 protein complex at the surface of *Listeria monocytogenes*. *Nature* **385**: 265-269.
- Welch, M.D., Rosenblatt, J., Skoble, J., Portnoy, D.A., and Mitchison, T.J. (1998) Interaction of human Arp2/3 complex and the *Listeria monocytogenes* ActA protein in actin filament nucleation. *Science* **281**: 105-108.
- Weston, L. A., and Kadner, R. J. (1988) Role of uhp genes in expression of the *Escherichia coli* sugar-phosphate transport system. *J Bacteriol* **170**: 3375-3383.
- Wiame, J.M., Bourgeois, S., and Lambion, R. (1954) Oxidative dissimilation of glycerol studied with variants of *Bacillus subtilis*. *Nature* **174**: 37-38.
- Wing, E.J., and Gregory, S.H. (2002) *Listeria monocytogenes*: clinical and experimental update. *J Infect Dis* **185 Suppl 1**: S18-24.
- Wong, K.K., and Freitag, N.E. (2004) A novel mutation within the central *Listeria monocytogenes* regulator PrfA that results in constitutive expression of virulence gene products. *J Bacteriol* **186**: 6265-6276.
- Worthylake, D., Meadow, N.D., Roseman, S., Liao, D.I., Herzberg, O., and Remington, S.J. (1991) Three-dimensional structure of the *Escherichia coli* phosphocarrier protein IIIglc. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 10382-10386.
- Wuenschel, M.D., Köhler, S., Goebel, W., and Chakraborty, T. (1991) Gene disruption by plasmid integration in *Listeria monocytogenes*: insertional inactivation of the listeriolysin determinant *lisA*. *Mol Gen Genet* **228**: 177-182.
- Ye, J.J., and Saier, M.H., Jr. (1995) Allosteric regulation of the glucose:H⁺ symporter of *Lactobacillus brevis*: cooperative binding of glucose and HPr(ser-P). *J Bacteriol* **177**: 1900-1902.
- Zhu, P.P., Nosworthy, N., Ginsburg, A., Miyata, M., Seok, Y.J., and Peterkofsky, A. (1997) Expression, purification, and characterization of enzyme IIA(glc) of the phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system of *Mycoplasma capricolum*. *Biochemistry* **36**: 6947-6953.

8 Anhang

8.1 Gesamtgenom-Transkriptom-Daten

Tab. 8.1: Auflistung aller Gene, die in der *::ccpA*- und in der *::hprK*-Mutante im Vergleich zum Wildtyp (WT) hoch- (Ia) bzw. herunterreguliert (Ib) sind. Die in grau unterlegten Gene befinden sich in einer Operonstruktur, dessen Orientierungsrichtung durch den schwarzen Pfeil angedeutet wird.

Gruppe Ia:

Operon	Gen	<i>::hprK</i> /WT	<i>::ccpA</i> /WT	Funktion
	lmo0106	9,73	4,22	unknown, similar to transcription regulator
	lmo0109	5,33	4,35	unknown, similar to transcriptional regulatory proteins, AraC family
	lmo0133	2,81	1,85	unknown, similar to E. coli YjdI protein
	lmo0297	2,00	1,98	unknown, similar to transcriptional antiterminator (BglG family)
	lmo0349	1,92	2,27	unknown
	lmo0384	2,17	2,11	unknown, similar to B. subtilis lolB protein
↓	lmo0391	2,27	2,11	unknown
↓	lmo0392	2,28	2,04	unknown, highly similar to B. subtilis YqfA protein
↓	lmo0393	1,94	1,96	unknown
	lmo0422	3,17	1,88	unknown, similar to unknown protein
↓	lmo0425	4,41	3,21	unknown, similar to transcription antiterminator BglG family
↓	lmo0426	2,94	3,48	unknown, similar to PTS fructose-specific enzyme IIA component
↓	lmo0427	3,21	3,26	unknown, similar to PTS fructose-specific enzyme IIB component
↓	lmo0428	3,85	3,02	unknown, similar to PTS fructose-specific enzyme IIC component
↓	lmo0429	3,87	3,81	unknown, similar to sugar hydrolase
↓	lmo0502	1,84	2,94	unknown, similar to putative sugar-phosphate isomerase
↓	lmo0504	1,95	2,16	unknown
↓	lmo0507	1,85	5,05	unknown, similar to PTS system, Galactitol-specific IIB component
	lmo0557	2,52	2,54	unknown, similar to phosphoglycerate mutase
	lmo0640	2,32	2,08	unknown, similar to oxidoreductase
	lmo0643	2,50	4,48	unknown, similar to putative transaldolase
↓	lmo1042	3,70	3,32	unknown, similar to molybdopterin biosynthesis protein moeA
↓	lmo1044	4,16	3,55	unknown, similar to molybdopterin converting factor, subunit 2
↓	lmo1045	4,72	4,31	unknown, similar to molybdopterin converting factor (subunit 1)
↓	lmo1046	5,24	5,28	unknown, similar to molybdenum cofactor biosynthesis protein C
	lmo1050	2,34	1,83	unknown, similar to B. subtilis YdE protein
	lmo1098	3,16	2,28	unknown, highly similar to TN916 ORF8
	lmo1173	4,87	2,56	unknown, similar to two-component sensor histidine kinase
	glpD	3,26	5,40	similar to glycerol 3 phosphate dehydrogenase
↓	lmo1348	4,74	3,09	unknown, similar to aminomethyltransferase
↓	lmo1349	4,81	5,80	unknown, similar to glycine dehydrogenase (decarboxylating) subunit 1
↓	lmo1350	4,50	4,90	unknown, similar to glycine dehydrogenase (decarboxylating) subunit 2
	cspL	2,85	3,12	similar to cold shock protein
↑	lmo1538	5,07	3,22	unknown, similar to glycerol kinase
↑	lmo1539	11,27	5,18	unknown, similar to glycerol uptake facilitator
	lmo1867	2,43	2,60	unknown, similar to pyruvate phosphate dikinase
	cspD	4,99	3,30	similar to cold shock protein
	lmo1883	1,85	1,88	unknown, similar to chitinases
	pflA	2,89	5,49	similar to pyruvate formate-lyase
	lmo1955	2,87	2,52	unknown, similar to integrase/recombinase
	lmo2001	3,29	1,89	unknown, similar to PTS mannose-specific enzyme IIC component
	lmo2121	3,18	1,89	unknown, similar to maltosephosphorylase
	lmo2138	2,17	2,94	unknown, similar to transcription regulator
	lmo2175	2,90	1,84	unknown, similar to dehydrogenase
↑	lmo2582	1,95	1,84	unknown, similar to two-component sensor histidine kinase
↑	lmo2584	4,41	1,83	unknown, similar to formate dehydrogenase associated protein
↑	lmo2585	7,76	3,33	unknown, similar to B. subtilis YrhD protein
↑	lmo2586	8,18	5,72	unknown, similar to formate dehydrogenase alpha chain
	lmo2590	2,31	2,21	unknown, similar to ATP binding proteins
	lmo2637	2,27	1,84	unknown, conserved lipoprotein
↑	lmo2646	4,34	5,45	unknown
↑	lmo2651	6,09	3,28	unknown, similar to mannitol-specific PTS enzyme IIA component
	lmo2666	1,83	7,05	unknown, similar to PTS system galactitol-specific enzyme IIB component
	lmo2732	2,42	2,35	unknown
	lmo2741	1,90	2,24	unknown, similar to drug-efflux transporters

Operon	Gen	:: <i>hprK</i> /WT	:: <i>ccpA</i> /WT	Funktion
↓ ↑	lmo2761	1,85	11,22	unknown, similar to beta-glucosidase
	lmo2763	2,19	3,43	unknown, similar to PTS cellobiose-specific enzyme IIC
	lmo2764	2,44	11,23	unknown, similar to xylose operon regulatory protein and to glucose kinase
	lmo2771	86,23	5,00	unknown, similar to beta-glucosidase
	lmo2772	129,24	6,92	unknown, similar to beta-glucoside-specific enzyme IABC
	lmo2774	82,23	6,10	unknown, similar to ABC transporter, ATP-binding protein
	bvrA	2,08	2,02	transcription antiterminator
	lmo2799	2,53	3,99	unknown, similar to phosphotransferase system mannitol-specific enzyme IIBC
	lmo2838	2,53	2,09	unknown, similar to sugar ABC transporter permease protein
	lmo2853	2,62	2,14	unknown, highly similar to <i>B. subtilis</i> Jag protein

Gruppe Ib:

Operon	Gene	:: <i>hprK</i> /WT	:: <i>ccpA</i> /WT	Funktion
	lmo0233	0,33	0,29	unknown, similar to DNA repair protein Sms
	gbuC	0,29	0,44	highly similar to glycine betaine ABC transporters (glycine betaine-binding protein)
	pykA	0,55	0,49	highly similar to pyruvate kinases
	ilvN	0,51	0,52	similar to acetolactate synthase (acetohydroxy-acid synthase) (small subunit)
	leuC	0,34	0,41	similar to 3-isopropylmalate dehydratase (large subunit)

Tab. 8.2: Auflistung aller Gene, die in der ::*ccpA*-Mutante im Vergleich zum Wildtyp (WT) hoch- (IIa) und herunterreguliert (IIb) sind. Die in grau unterlegten Gene befinden sich in einer Operonstruktur, dessen Orientierungsrichtung durch den schwarzen Pfeil angedeutet wird.

Gruppe IIa:

Operon	Gen	:: <i>ccpA</i> /WT	Funktion
↓ ↑	dnaN	2,68	DNA polymerase III, beta chain
	lmo0034	2,45	unknown, similar to PTS system, cellobiose-specific IIC component
	lmo0119	1,95	unknown
	lmo0121	1,85	unknown, similar to bacteriophage minor tail proteins
	lmo0141	2,28	unknown
	lmo0182	1,84	unknown, similar to alpha-xylosidase and alpha-glucosidase
	lmo0299	1,87	unknown, similar to PTS beta-glucoside-specific enzyme IIB component
	lmo0307	1,83	unknown
	lmo0383	1,88	unknown, highly similar to <i>B. subtilis</i> methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase IolA
	lmo0488	1,80	unknown, similar to transcriptional regulator (LysR family)
	lmo0521	1,86	unknown, similar to 6-phospho-beta-glucosidase
	lmo0695	2,96	unknown
	dltA	2,10	D-alanine-activating enzyme (dae), D-alanine-D-alanyl carrier protein ligase (dcl)
	lmo1188	1,93	unknown
	lmo1597	6,13	unknown
	lmo1645	5,20	unknown, similar to ATP-dependent dsDNA exonuclease SbcC
	lmo1647	5,01	unknown, similar to 1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferases
	tsf	2,13	translation elongation factor
	lmo1728	2,03	unknown, some similarities to cellobiose-phosphorylase
	lmo2226	2,45	unknown, similar to unknown proteins
	lmo2426	2,01	unknown, conserved hypothetical proteins
	lmo2492	2,13	unknown
	lmo2659	2,37	unknown, similar to ribulose-phosphate 3-epimerase
	lmo2660	5,21	unknown, similar to transketolase
	lmo2661	3,76	unknown, similar to ribulose-5-phosphate 3-epimerase
	lmo2662	9,72	unknown, similar to ribose 5-phosphate epimerase
	lmo2663	17,05	unknown, similar to polyol dehydrogenase
	lmo2664	6,30	unknown, similar to sorbitol dehydrogenase
	lmo2665	7,56	unknown, similar to PTS system galactitol-specific enzyme IIC component
	lmo2667	4,46	unknown, similar to PTS system galactitol-specific enzyme IIA component
	lmo2668	13,88	unknown, similar to transcriptional antiterminator (BglG family)
	lmo2749	3,34	unknown, similar to glutamine amidotransferase
	lmo2762	4,80	unknown, similar to PTS cellobiose-specific enzyme IIB
lmo2781	1,84	unknown, similar to beta-glucosidase	
lmo2789	1,87	unknown	

Gruppe IIb:

Operon	Gen	:: <i>ccpA</i> /WT	Funktion
	Imo0148	0,50	unknown
	Imo0170	0,49	unknown
	Imo0174	0,55	unknown, similar to transposase
↓	inlA	0,23	internalin A
	inlB	0,15	internalin B
	Imo0539	0,24	unknown, similar to tagatose-1,6-diphosphate aldolase
↓	Imo0554	0,25	unknown, similar to NADH-dependent butanol dehydrogenase
	Imo0555	0,21	unknown, similar to di-tripeptide transporter
	Imo0590	0,33	unknown, similar to a fusion of two types of conserved hypothetical proteinconserved hypothetical
	Imo0596	0,11	unknown, similar to unknown proteins
	Imo0628	0,27	unknown
	Imo0647	0,45	unknown
↓	Imo0669	0,16	unknown, similar to oxidoreductase
	Imo0670	0,37	unknown
	Imo0722	0,14	unknown, similar to pyruvate oxidase
	Imo0723	0,43	unknown, similar to methyl-accepting chemotaxis protein
	Imo0724	0,31	unknown, similar to B. subtilis YvpB protein
↑	Imo0782	0,50	unknown, similar to mannose-specific phosphotransferase system (PTS) component IIC
	Imo0784	0,40	unknown, similar to mannose-specific phosphotransferase system (PTS) component IIA
	Imo0880	0,30	unknown, similar to wall associated protein precursor (LPXTG motif)
	Imo0912	0,45	unknown, similar to transporters (formate)
	Imo1261	0,50	unknown
↑	opuCD	0,30	similar to betaine/carnitine/choline ABC transporter (membrane protein)
	opuCB	0,36	similar to glycine betaine/carnitine/choline ABC transporter (membrane protein)
	opuCA	0,41	similar to glycine betaine/carnitine/choline ABC transporter (ATP-binding protein)
	Imo1433	0,14	unknown, similar to glutathione reductase
↑	murC	0,54	similar to UDP-N-acetyl muramate-alanine ligases
	Imo1606	0,48	unknown, similar to DNA translocase
	Imo2213	0,46	unknown, similar to unknown protein
	Imo2230	0,38	unknown, similar to arsenate reductase
	Imo2231	0,36	unknown, similar to unknown proteins
	Imo2571	0,46	unknown, similar to nicotinamidase
	Imo2674	0,51	unknown, similar to ribose 5-phosphate epimerase
	Imo2683	0,50	unknown, similar to cellobiose phosphotransferase enzyme IIB component

Tab. 8.3: Auflistung aller Gene, die in der ::*hprK*-Mutante im Vergleich zum Wildtyp (WT) hoch- (IIIa) und herunterreguliert (IIIb) sind. Die in grau unterlegten Gene befinden sich in einer Operonstruktur, dessen Orientierungsrichtung durch den schwarzen Pfeil angedeutet wird.

Gruppe IIIa:

Operon	Gen	:: <i>hprK</i> /WT	Funktion
	qoxB	2,06	AA3-600 quinol oxidase subunit I
	Imo0049	2,13	unknown
	Imo0071	1,92	unknown
	Imo0094	1,93	unknown
↓	Imo0096	3,28	unknown, similar to PTS system mannose-specific, factor IIAB
	Imo0098	2,94	unknown, similar to PTS system mannose-specific, factor IID
	Imo0100	2,45	unknown
	Imo0102	4,01	unknown
	Imo0105	12,17	unknown, highly similar to chitinase B
↓	ImaA	3,04	antigen A
	Imo0120	2,48	unknown
	Imo0122	3,28	unknown, similar to phage proteins
	Imo0126	3,70	unknown
↓	Imo0128	2,69	unknown, similar to a protein from Bacteriophage phi-105 (ORF 45)
	Imo0130	3,72	unknown, similar to 5 -nucleotidase, putative peptidoglycan bound protein (LPXTG motif)
	Imo0136	1,97	unknown, similar to oligopeptide ABC transporter, permease protein
	Imo0139	1,83	unknown
	plcA	3,26	phosphatidylinositol-specific phospholipase c
	hly	2,04	listeriolysin O precursor
	plcB	2,03	phospholipase C
↓	folA	2,31	highly similar to dihydroneopterin aldolase
	Imo0227	2,35	unknown, conserved hypothetical protein
	Imo0324	2,43	unknown
	Imo0369	1,83	unknown, conserved hypothetical protein, highly similar to B. subtilis Yeel protein
	Imo0386	2,12	unknown, similar to B. subtilis lolD protein, to acetolactate synthase
	Imo0394	2,49	unknown, similar to L. monocytogenes extracellular P60 protein
	Imo0398	2,05	unknown, similar to phosphotransferase system enzyme IIA

Operon	Gen	::hprK/WT	Funktion
↑	lmo0421	2,52	unknown, similar to rod shape-determining protein RodA
	lmo0423	3,15	unknown, similar to RNA polymerase ECF-type sigma factor
↓	inlA	4,00	Internalin A
	inlB	2,01	Internalin B
	lmo0471	1,82	unknown
	lmo0477	2,92	unknown, putative secreted protein
	lmo0501	1,88	unknown, similar to transcription antiterminator BglG family
	lmo0536	2,29	unknown, similar to 6-phospho-beta-glucosidase
	lmo0539	2,10	unknown, similar to tagatose-1,6-diphosphate aldolase
	lmo0543	2,20	unknown, similar to PTS system, glucitol/sorbitol-specific enzyme IIBC component
	lmo0610	2,22	unknown, similar to internalin proteins, putative peptidoglycan bound protein (LPXTG motif)
↓	lmo0632	2,65	unknown, similar to PTS system, fructose-specific IIC component
	lmo0634	2,04	unknown, similar to an E. coli putative tagatose 6-phosphate kinase
	lmo0641	1,83	unknown, similar to heavy metal-transporting ATPase
	lmo0674	2,14	unknown
	lmo0722	2,59	unknown, similar to pyruvate oxidase
	lmo0737	1,82	unknown
↓	lmo0738	1,81	unknown, similar to phosphotransferase system (PTS) beta-glucoside-specific enzyme IIABC component
↑	lmo0782	1,84	unknown, similar to mannose-specific phosphotransferase system (PTS) component IIC
	lmo0784	2,23	unknown, similar to mannose-specific phosphotransferase system (PTS) component IIA
	lmo0798	2,19	unknown, similar to lysine-specific permease
	uhpT	1,84	highly similar to hexose phosphate transport protein
	lmo0866	2,03	unknown, similar to ATP-dependent RNA helicase
	lmo0913	2,17	unknown, similar to succinate semialdehyde dehydrogenase
↓	lmo0915	2,08	unknown, similar to phosphotransferase system enzyme IIC
	lmo0918	1,93	unknown, similar to transcription antiterminator BglG family
	lmo0994	2,00	unknown
	lmo1048	2,02	unknown, similar to molybdenum cofactor biosynthesis protein B
	lmo1105	2,32	unknown, highly similar to TN916 ORF15
	lmo1150	1,99	regulatory protein similar to Salmonella typhimurium PocR protein
	lmo1166	1,84	unknown, similar to NADPH-dependent butanol dehydrogenase
	lmo1172	2,92	unknown, similar to similar to two-component response regulator
	eutA	3,35	similar to ethanolamine utilization protein EutA (putative chaperonin)
	eutB	2,76	similar to ethanolamine ammonia-lyase, heavy chain
	lmo1177	3,25	unknown, similar to putative carboxysome structural protein (eutL)
	lmo1178	6,42	unknown, similar to putative carboxysome structural protein
	lmo1179	1,94	unknown, similar to acetaldehyde dehydrogenase / alcohol dehydrogenase
	lmo1181	2,06	unknown, similar to cobalamin adenosyl transferase
↓	lmo1185	2,10	unknown, similar to Salmonella enterica PduT protein
	lmo1190	1,89	unknown
	cbiF	2,38	similar to precorrin-3 methylase
	cbiG	2,46	similar to cobalamin biosynthesis protein G CbiG
	cbiH	2,60	similar to precorrin methylase
↓	lmo1201	2,17	unknown, similar uroporphyrinogen-III methyltransferase/uroporphyrinogen-III synthase
↑	lmo1254	9,41	unknown, similar to alpha,alpha-phosphotrehalase
	lmo1255	9,11	unknown, similar to PTS system trehalose specific enzyme IIBC
	lmo1257	2,09	unknown
	lmo1374	1,87	unknown, similar to branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase E2 subunit (lipoamide acyltransferase)
	tcsA	2,54	CD4+ T cell-stimulating antigen, lipoprotein
	pflB	2,00	pyruvate formate-lyase
	lmo1433	2,41	unknown, similar to glutathione reductase
	lmo1471	2,57	unknown, similar to ribosomal protein L11 methyltransferase
	lmo1614	1,82	unknown, similar to unknown proteins
	lmo1654	1,90	unknown, putative cell surface protein
	lmo1669	1,84	unknown, some similarity to hypothetical proteins
	lmo1714	1,98	unknown
	lmo1729	1,85	unknown, similar to beta-glucosidases
↓	lmo1731	1,80	unknown, similar to sugar ABC transporter, permease protein
	lmo1732	3,47	unknown, similar to sugar ABC transporter, permease protein
	inlC	2,23	internalin C
	lmo1855	1,86	unknown, similar to similar to D-alanyl-D-alanine carboxypeptidases
	pnp	1,93	similar to purine-nucleoside phosphorylase
	lmo1999	2,07	unknown, weakly similar to glucosamine-fructose-6-phosphate aminotransferase
	cspB	2,07	similar to major cold-shock protein
	lmo2084	2,67	unknown
	lmo2085	2,87	unknown, putative peptidoglycan bound protein (LPXTG motif)
	lmo2125	2,83	unknown, similar to maltose/maltodextrin ABC-transporter (binding protein)
	lmo2129	2,04	unknown
	lmo2133	2,83	unknown, similar to fructose-1,6-biphosphate aldolase type II
↑	lmo2159	2,98	unknown, similar to oxidoreductase
	lmo2160	3,63	unknown, similar to unknown proteins
	lmo2161	3,18	unknown
	lmo2163	2,24	unknown, similar to oxidoreductase
	lmo2245	3,50	unknown, similar to unknown proteins
	lmo2277	1,89	unknown
	lmo2292	2,54	protein gp11 [Bacteriophage A118]

Operon	Gen	::hprK/WT	Funktion
↑	Imo2293	1,83	protein gp10 [Bacteriophage A118]
	Imo2294	3,11	protein gp9 [Bacteriophage A118]
	Imo2295	2,32	protein gp8 [Bacteriophage A118]
	Imo2298	2,53	protein gp4 [Bacteriophage A118]
↑	Imo2313	4,21	unknown, similar to a bacteriophage protein
	Imo2314	2,49	unknown
	Imo2316	2,72	unknown, similar to site-specific DNA-methyltransferase
	Imo2319	1,89	unknown, similar to bacteriophage proteins
↓	Imo2320	2,10	unknown
	Imo2364	3,01	hypothetical protein
	Imo2436	2,70	unknown, similar to transcription antiterminator
	Imo2437	2,53	unknown
↑	Imo2572	1,84	unknown, similar to Chain A, Dihydrofolate Reductase
	Imo2573	1,98	unknown, similar to zinc-binding dehydrogenase
↑	Imo2583	2,53	unknown, similar to two-component response regulator
	Imo2648	1,96	unknown, similar to Phosphotriesterase
↑	Imo2650	3,51	unknown, similar to hypothetical PTS enzyme IIB component
	Imo2685	2,21	unknown, similar to cellobiose phosphotransferase enzyme IIA component
↓	Imo2695	2,76	unknown, similar to dihydroxyacetone kinase
	Imo2696	2,50	unknown, similar to hypothetical dihydroxyacetone kinase
↓	Imo2697	1,92	unknown
	Imo2707	2,20	unknown
↓	Imo2735	2,20	unknown, similar to Sucrose phosphorylase
	Imo2742	1,97	unknown
↓	bvrB	2,84	beta-glucoside-specific phosphotransferase enzyme II ABC component
	Imo2796	2,47	unknown, similar to transcription regulator
↑	Imo2797	3,43	unknown, similar to phosphotransferase system mannitol-specific enzyme IIA
	Imo2798	2,14	unknown, similar to phosphatase
↓	Imo2840	2,25	unknown, similar to Sucrose phosphorylase
	rpmH	1,98	ribosomal protein L34

Gruppe IIIb:

Operon	Gen	::hprK/WT	Funktion
↓	Imo0209	0,50	unknown
	Imo0372	0,53	unknown, similar to beta-glucosidase
↓	Imo0519	0,54	unknown, similar to multidrug resistance protein
	Imo0560	0,51	unknown, similar to NADP-specific glutamate dehydrogenase
↓	Imo0593	0,46	unknown, similar to transport proteins (formate?)
	Imo1516	0,29	unknown, similar to ammonium transporter NrgA
↓	Imo1517	0,37	unknown, similar to nitrogen regulatory PII protein
	aspS	0,49	aspartyl-tRNA synthetase
↓	leuB	0,31	similar to 3-isopropylmalate dehydrogenase
	Imo2192	0,48	unknown, similar to oligopeptide ABC transporter (ATP-binding protein)
↓	Imo2193	0,53	unknown, similar to oligopeptide ABC transporter (ATP-binding protein)
	Imo2194	0,54	unknown, similar to oligopeptide ABC transporter (permease)
↓	Imo2195	0,52	unknown, similar to oligopeptide ABC transporter (permease)
	Imo2460	0,40	unknown, similar to B. subtilis CggR hypothetical transcriptional regulator
↓	Imo2757	0,43	unknown, similar to ATP-dependent DNA helicases

Tab. 8.4: Auflistung aller hochregulierten Gene des Wildtyps EGD-e, gewachsen in LB-Medium mit 50 mM und 5 % XAD-4 (G^{XAD}) im Vergleich zu dem im LB-Medium mit 50 mM Glukose (G^{XAD}) gewachsenen. Die in grau unterlegten Gene befinden sich in einer Operonstruktur, dessen Orientierungsrichtung durch den schwarzen Pfeil angedeutet wird.

Operon	Gen	G^{XAD} / G	Funktion
↑	Imo0043	2,91	Unknown, similar to arginine deiminase
	prfA	14,29	Listeriolysin positive regulatory protein
↓	plcA	45,04	Phosphatidylinositol-specific phospholipase c
	hly	98,85	Listeriolysin O precursor
↓	mpl	51,03	Zinc metalloproteinase precursor
	actA	116,27	Actin-assembly inducing protein precursor
↓	plcB	270,93	Phospholipase C
	Imo0206	118,26	Unknown
↓	Imo0207	66,43	Unknown, hypothetical lipoprotein
	Imo0321	3,42	Unknown, similar to unknown proteins
↓	Imo0325	2,24	Unknown, similar to transcriptional regulators

Operon	Gen	G ^{XAD} / G	Funktion
	lmo0390	2,00	Unknown, similar to uracil-DNA glycosylase
	lmo0391	2,74	Unknown
↓	lmo0392	22,75	Unknown, highly similar to B. subtilis YqfA protein
	lmo0394	7,25	Unknown, similar to L. monocytogenes extracellular P60 protein
	lmo0396	4,13	Unknown, similar to 1-pyrroline-5-carboxylate reductase (ProC)
↓	inlA	21,98	Internalin A
	inlB	19,87	Internalin B
	lmo0435	3,30	Unknown, putative peptidoglycan bound protein (LPXTG motif)
	lmo0445	4,27	Unknown, similar to transcription regulator
	lmo0548	2,03	Unknown
	lmo0554	2,94	Unknown, similar to NADH-dependent butanol dehydrogenase
	iap	7,37	P60 extracellular protein, invasion associated protein iap
	lmo0610	3,78	Unknown, similar to internalin proteins, putative peptidoglycan bound protein (LPXTG motif)
	lmo0628	2,60	Unknown
↓	lmo0641	2,36	Unknown, similar to heavy metal-transporting ATPase
	lmo0642	2,02	Unknown
	lmo0654	2,20	Unknown
	lmo0784	2,11	Unknown, similar to mannose-specific phosphotransferase system (PTS) component IIA
	lmo0794	2,66	Unknown, similar to B. subtilis YwnB protein
	uhpT	51,78	Unknown, highly similar to hexose phosphate transport protein
	lmo0913	2,27	Unknown, similar to succinate semialdehyde dehydrogenase
	lmo1250	2,13	Unknown, similar to antibiotic resistance protein
	lmo1266	2,27	Unknown
	lmo1369	2,64	Unknown, similar to phosphotransbutyrylase
	lmo1375	2,40	Unknown, similar to aminotripeptidase
	lmo1421	2,09	Unknown, similar to glycine betaine/carnitine/choline ABC transporter (ATP-binding protein)
	lmo1424	2,27	Unknown, similar to manganese transport proteins NRAMP
	lmo1433	2,22	Unknown, similar to glutathione reductase
	lmo1694	2,51	Unknown, similar to CDP-abequose synthase
	inlC	54,97	Internalin C
↑	pyrE	2,51	Unknown, highly similar to orotate phosphoribosyltransferases
	pyrF	2,49	Unknown, highly similar to orotidine 5 -phosphate decarboxylases
	pyrD	2,31	Unknown, highly similar to dihydroorotase dehydrogenase
	pyrDII	2,24	Unknown, highly similar to dihydroorotate dehydrogenase (electron transfer subunit)
↑	lmo1848	2,20	Unknown, similar metal cations ABC transporter (permease protein)
	lmo1849	2,30	Unknown, similar to metal cations ABC transporter, ATP-binding proteins
	lmo1945	9,84	Unknown, similar to unknown protein
	lmo2067	2,07	Unknown, similar to conjugated bile acid hydrolase
	lmo2085	2,45	Unknown, putative peptidoglycan bound protein (LPXTG motif)
	lmo2132	2,83	Unknown
	lmo2174	2,49	Unknown, similar to unknown proteins
	lmo2219	5,23	Unknown, similar to post-translocation molecular chaperone
	lmo2231	3,45	Unknown, similar to unknown proteins
	arpJ	2,86	Unknown, similar to amino acid ABC transporter, permease protein
	lmo2387	2,54	Unknown, conserved hypothetical protein
	lmo2673	2,36	Unknown, conserved hypothetical protein
	lmo2720	3,64	Unknown, similar to acetate-CoA ligase

Tab. 8.5: Auflistung aller herunterregulierten Gene des Wildtyps EGD-e, gewachsen in LB-Medium mit 50 mM Glukose und 5 % XAD-4 (G^{XAD}) im Vergleich zu dem im LB-Medium mit 50 mM Glukose (G) gewachsenen. Die in grau unterlegten Gene befinden sich in einer Operonstruktur, dessen Orientierungsrichtung durch den schwarzen Pfeil angedeutet wird.

Operon	Gen	G ^{XAD} / G	Funktion
	ctc	0,33	Unknown, similar to B. subtilis general stress protein
	lmo0477	0,45	Unknown, putative secreted protein
	lmo0811	0,40	Unknown, similar to carbonic anhydrase
	lmo1387	0,47	Unknown, similar to pyrroline-5-carboxylate reductase
	lmo1799	0,19	Unknown, putative peptidoglycan bound protein (LPXTG motif)
	alsS	0,45	Unknown, similar to alpha-acetolactate synthase protein, AlsS
	groEL	0,48	Class I heat-shock protein (chaperonin) GroEL
	lmo2129	0,41	Unknown
↑	lmo2360	0,21	Unknown, transmembrane protein
	lmo2361	0,31	Unknown, conserved hypothetical protein
	kdpA	0,50	Unknown, highly similar to potassium-transporting atpase a chain
	kat	0,46	Catalase
	lmo2830	0,49	Unknown, similar to thioredoxin

Tab. 8.6: Auflistung aller hochregulierten Gene des Wildtyps EGD-e, gewachsen in LB-Medium mit 50 mM Glukose-6-Phosphat und 5 % XAD-4 (G6P^{XAD}) im Vergleich zu dem im LB-Medium mit 50 mM Glukose und 5 % XAD-4 (G^{XAD}) gewachsenen. Die in grau unterlegten Gene befinden sich in einer Operonstruktur, dessen Orientierungsrichtung durch den schwarzen Pfeil angedeutet wird; Y = wird ebenfalls in Glycerin-haltigem Medium exprimiert; X = Genexpression wird durch XAD-4 reguliert (siehe Tab. 8.4).

	Operon	Gene	G6P ^{XAD} / G ^{XAD}	Funktion
Y		qoxA	2,78	AA3-600 quinol oxidase subunit II
Y		qoxB	2,39	AA3-600 quinol oxidase subunit I
Y		qoxC	2,27	AA3-600 quinol oxidase subunit III
Y	↓	qoxD	2,17	Unknown, highly similar to quinol oxidase aa3-600 chain IV
Y		lmo0021	6,63	Unknown, similar to PTS system, fructose-specific IIA component
Y		lmo0024	12,87	Unknown, similar to PTS system, mannose-specific IID component
		lmo0025	3,50	Unknown, similar to phosphoheptose isomerase
	↓	lmo0048	2,14	Unknown, similar to Staphylococcus two-component sensor histidine kinase AgrB
		lmo0049	3,05	Unknown
Y		lmo0105	18,34	Unknown, highly similar to chitinase B
		lmo0109	12,67	Unknown, similar to transcriptional regulatory proteins, AraC family
	↓	lmo0110	19,59	Unknown, similar to lipase
		lmo0113	2,00	Unknown, similar to protein gp35 from Bacteriophage A118
		lmaD	2,22	Unknown, similar to Antigen D
		lmaC	2,73	Unknown, similar to Antigen C
		lmaB	5,42	Antigen B
		lmaA	4,66	Antigen A
		lmo0119	2,92	Unknown
		lmo0120	2,90	Unknown
		lmo0121	3,19	Unknown, similar to bacteriophage minor tail proteins
		lmo0122	3,45	Unknown, similar to phage proteins
		lmo0123	3,56	Unknown, similar to protein gp18 from Bacteriophage A118
		lmo0124	3,38	Unknown
		lmo0125	3,93	Unknown
		lmo0126	4,30	Unknown
		lmo0127	3,99	Unknown, weakly similar to protein gp20 from Bacteriophage A118
	↓	lmo0128	3,95	Unknown, similar to a protein from Bacteriophage phi-105 (ORF 45)
		lmo0129	3,67	Unknown, similar to autolysin: N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase
Y		lmo0130	49,84	Unknown, similar to 5'-nucleotidase, putative peptidoglycan bound protein (LPXTG motif)
		lmo0133	2,01	Unknown, similar to E. coli YjdI protein
		lmo0134	2,54	Unknown, similar to E. coli YjdJ protein
Y		lmo0135	5,18	Unknown, similar to oligopeptide ABC transport system substrate-binding proteins
		lmo0152	3,48	Unknown, similar to oligopeptide ABC transporter-binding protein
Y		lmo0180	2,64	Unknown, similar to sugar ABC transporter, permease protein
Y		lmo0181	2,42	Unknown, similar to sugar ABC transporter, sugar-binding protein
		lmo0186	2,18	Unknown, similar to B. subtilis YabE protein
X, Y		plcA	4,77	Phosphatidylinositol-specific phospholipase c
X, Y		hly	6,21	Listeriolysin O precursor
X, Y		actA	2,22	Actin-assembly inducing protein precursor
X, Y	↓	plcB	2,67	Phospholipase C
		ctc	3,38	Unknown, similar to B. subtilis general stress protein
	↓	lmo0260	3,84	Unknown, similar to unknown proteins
Y		lmo0261	5,70	Unknown, similar to phospho-beta-glucosidase
Y		lmo0265	4,55	Unknown, similar to succinyldiaminopimelate desuccinylase
		lmo0267	3,16	Unknown, similar to other proteins
Y		lmo0278	11,41	Unknown, similar to sugar ABC transporter, ATP-binding protein
	↑	lmo0297	4,65	Unknown, similar to transcriptional antiterminator (BglG family)
Y		lmo0299	9,46	Unknown, similar to PTS beta-glucoside-specific enzyme IIB component
		lmo0323	18,15	Unknown, similar to unknown proteins
	↑	lmo0341	38,24	Unknown
		lmo0342	226,25	Unknown, similar to transketolase
Y	↑	lmo0348	157,45	Unknown, similar to dihydroxyacetone kinase
		lmo0350	239,15	Unknown
		lmo0352	4,12	Unknown, highly similar to regulatory proteins (DeoR family)
		lmo0357	4,43	Unknown, similar to PTS system, enzyme IIA component
	↓	lmo0361	7,06	Unknown, similar to conserved hypothetical integral membrane protein
		lmo0362	7,15	Unknown, similar to conserved hypothetical protein
	↑	lmo0365	7,29	Unknown, similar to conserved hypothetical protein
		lmo0366	8,17	Unknown, conserved hypothetical protein, putative lipoprotein
		lmo0367	6,02	Unknown, conserved hypothetical protein similar to B. subtilis YwbN protein
		lmo0377	4,93	Unknown
Y	↓	lmo0384	11,21	Unknown, similar to B. subtilis lolB protein
Y		lmo0385	11,84	Unknown, similar to B. subtilis lolC protein and to fructokinase
Y	↓	lmo0386	6,62	Unknown, similar to B. subtilis lolD protein, to acetolactate synthase
		lmo0388	3,58	Unknown
X	↓	lmo0391	5,01	Unknown
X		lmo0392	5,68	Unknown, highly similar to B. subtilis YqfA protein
	↓	lmo0393	6,52	Unknown

Operon	Gene	G6P ^{XAD} / G ^{XAD}	Funktion
X	lmo0394	6,51	Unknown, similar to L. monocytogenes extracellular P60 protein
	lmo0397	3,19	Unknown, similar to unknown proteins
	lmo0398	855,65	Unknown, similar to phosphotransferase system enzyme IIA
	lmo0399	141,02	Unknown, similar to fructose-specific phosphotransferase enzyme IIB
Y	lmo0400	110,87	Unknown, similar to fructose-specific phosphotransferase enzyme IIC
	lmo0401	79,52	Unknown, highly similar to E. col YbgG protein, a putative sugar hydrolase
	lmo0402	46,92	Unknown, similar to transcriptional antiterminator (BglG family)
	lmo0410	2,00	Unknown, similar to phosphoenolpyruvate synthase, C-terminal part
	lmo0411	2,61	Unknown, similar to phosphoenolpyruvate synthase (N-terminal part)
	lmo0413	2,59	Unknown
	lmo0421	2,03	Unknown, similar to rod shape-determining protein RodA
	lmo0425	2,27	Unknown, similar to transcription antiterminator BglG family
Y	lmo0427	2,12	Unknown, similar to PTS fructose-specific enzyme IIB component
Y	lmo0428	2,63	Unknown, similar to PTS fructose-specific enzyme IIC component
Y	lmo0429	2,34	Unknown, similar to sugar hydrolase
	lmo0471	2,92	Unknown
	lmo0477	2,02	Unknown, putative secreted protein
	lmo0484	7,81	Unknown
	lmo0485	7,63	Unknown
Y	lmo0502	4,95	Unknown, similar to putative sugar-phosphate isomerase
Y	lmo0503	6,17	Unknown, similar to PTS fructose-specific enzyme IIA component
	lmo0504	4,58	Unknown
Y	lmo0508	3,16	Unknown, similar to PTS system, Galactitol-specific IIC component
	lmo0515	7,85	Unknown, conserved hypothetical protein
Y	lmo0521	5,48	Unknown, similar to 6-phospho-beta-glucosidase
Y	lmo0536	6,50	Unknown, similar to 6-phospho-beta-glucosidase
	lmo0541	12,81	Unknown, similar to ABC transporter (binding protein)
	lmo0553	2,18	Unknown
	lmo0556	3,07	Unknown, similar to phosphoglycerate mutase
	lmo0557	2,93	Unknown, similar to phosphoglycerate mutase
X	iap	3,17	P60 extracellular protein, invasion associated protein iap
	lmo0624	2,55	Unknown, similar to unknown proteins
	lmo0625	2,81	Unknown
Y	lmo0640	7,72	Unknown, similar to oxidoreductase
	lmo0647	5,64	Unknown
	lmo0649	2,16	Unknown, similar to transcription regulators
	lmo0653	3,27	Unknown
	lmo0661	2,91	Unknown, similar to unknown proteins
	lmo0673	2,10	Unknown
	lmo0734	2,32	Unknown, similar to transcriptional regulator (LacI family)
	lmo0736	34,55	Unknown, similar to ribose 5-phosphate isomerase
	lmo0737	51,63	Unknown
	lmo0738	48,21	Unknown, similar to phosphotransferase system (PTS) beta-glucoside-specific enzyme IIABC component
	lmo0740	2,02	Unknown, similar to putative transcription regulator
	lmo0776	4,99	Unknown, similar to transcription regulator (repressor)
Y	lmo0781	4,05	Unknown, similar to mannose-specific phosphotransferase system (PTS) component IID
Y	lmo0782	3,25	Unknown, similar to mannose-specific phosphotransferase system (PTS) component IIC
	lmo0791	2,64	Unknown
Y	lmo0813	2,59	Unknown, similar to fructokinases
	lmo0818	2,32	Unknown, similar to cation transporting ATPase
X, Y	uhpT	2,37	Unknown, highly similar to hexose phosphate transport protein
	lmo0843	2,07	Unknown, similar to B. subtilis protein YsdA
	lmo0844	2,76	Unknown, conserved hypothetical protein
Y	lmo0859	2,03	Unknown, similar to putative sugar ABC transporter, periplasmic sugar-binding protein,
	lmo0864	2,01	Unknown
	lmo0873	2,84	Unknown, Similar to transcriptional regulator (antiterminator)
	lmo0874	4,04	Unknown, similar to PTS system enzyme IIA component
Y	lmo0875	2,52	Unknown, similar to PTS system, beta-glucoside enzyme IIB component
	lmo0880	2,11	Unknown, similar to wall associated protein precursor (LPXTG motif)
	lmo0883	2,66	Unknown, similar to B. subtilis YbtB protein
Y	lmo0914	23,39	Unknown, similar to PTS system, IIB component
Y	lmo0915	10,93	Unknown, similar to phosphotransferase system enzyme IIC
Y	lmo0916	23,47	Unknown, similar to phosphotransferase system enzyme IIA
Y	lmo0917	31,69	Unknown, similar to beta-glucosidase
	lmo0944	3,13	Unknown, similar to B. subtilis YneR protein
	lmo0953	3,31	Unknown
	lmo0954	2,45	Unknown
	lmo0955	2,38	Unknown
	lmo0994	2,42	Unknown
	clpE	34,14	ATP-dependent protease
	lmo1007	9,37	Unknown

	Operon	Gene	G6P ^{XAD} / G ^{XAD}	Funktion
		lmo1041	2,40	Unknown, similar to molybdate ABC transporter binding protein
		lmo1042	10,90	Unknown, similar to molybdopterin biosynthesis protein moeA
		lmo1043	9,78	Unknown, similar to molybdopterin-guanine dinucleotide biosynthesis MobB
		lmo1044	11,85	Unknown, similar to molybdopterin converting factor, subunit 2
		lmo1045	9,75	Unknown, similar to molybdopterin converting factor (subunit 1).
		lmo1046	12,85	Unknown, similar to molybdenum cofactor biosynthesis protein C
		lmo1047	10,17	Unknown, similar to molybdenum cofactor biosynthesis protein A
		lmo1048	8,60	Unknown, similar to molybdenum cofactor biosynthesis protein B
		lmo1049	7,51	Unknown, similar to molybdopterin biosynthesis protein MoeB
Y		lmo1057	2,63	Unknown, similar to L-lactate dehydrogenase
		lmo1058	3,80	Unknown, similar to B. subtilis YktA protein
		lmo1059	2,67	Unknown
		lmo1068	6,43	Unknown
Y		lmo1097	5,66	Unknown, similar to integrases
		lmo1140	3,81	Unknown
		lmo1141	2,00	Unknown, similar to uroporphyrin-III C-methyltransferase
Y		lmo1142	2,85	Unknown, similar to Salmonella enterica PduS protein
		lmo1150	9,54	Regulatory protein similar to Salmonella typhimurium PocR protein
Y		lmo1151	2,15	Unknown, similar to Salmonella typhimurium PduA protein
		lmo1172	4,85	Unknown, similar to similar to two-component response regulator
		lmo1190	2,37	Unknown
		lmo1209	2,01	Unknown, similar to unknown protein
		lmo1241	3,28	Unknown
		lmo1242	2,97	Unknown, similar to B. subtilis Ydel protein
		lmo1243	3,94	Unknown
		lmo1253	2,10	Unknown, similar to transcription regulator GntR family
		lmo1254	4,60	Unknown, similar to alpha, alpha-phosphotrehalase
		lmo1255	3,15	Unknown, similar to PTS system trehalose specific enzyme IIBC
		lmo1256	6,95	Unknown
		lmo1258	5,20	Unknown
		lmo1288	2,09	Unknown, conserved hypothetical protein
Y		glpD	7,22	Unknown, similar to glycerol 3 phosphate dehydrogenase
		lmo1295	2,39	Unknown, similar to host factor-1 protein
		lmo1301	2,09	Unknown, conserved hypothetical protein
		lmo1332	2,42	Unknown, similar to conserved hypothetical proteins
Y		lmo1348	24,98	Unknown, similar to aminomethyltransferase
Y		lmo1349	44,72	Unknown, similar to glycine dehydrogenase (decarboxylating) subunit 1
		lmo1350	40,90	Unknown, similar to glycine dehydrogenase (decarboxylating) subunit 2
		lmo1381	2,43	Unknown
		tcsA	5,00	Unknown, CD4+ T cell-stimulating antigen, lipoprotein
		recA	2,01	Recombination protein recA
		lmo1423	2,06	Unknown
		comEA	2,57	Unknown, similar to integral membrane protein ComEA
		lmo1521	2,27	Unknown, similar to N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase
Y		lmo1538	23,21	Unknown, similar to glycerol kinase
Y		lmo1539	33,19	Unknown, similar to glycerol uptake facilitator
		citC	2,39	Unknown, highly similar to isocitrate dehydrogenases
		lmo1579	3,65	Unknown, similar to alanine dehydrogenase
		lmo1580	7,07	Unknown, similar to unknown protein
		lmo1601	2,26	Unknown, similar to general stress protein
		lmo1612	5,76	Unknown, similar to unknown proteins
		lmo1667	2,09	Unknown, similar to L-lactate dehydrogenases
		lmo1684	2,18	Unknown, similar to glycerate dehydrogenases
		lmo1687	2,27	Unknown, similar to hypothetical proteins
		lmo1690	2,03	Unknown, similar to hypothetical proteins
		lmo1704	2,28	Unknown, similar to conserved hypothetical proteins
		lmo1726	2,76	Unknown, similar to hypothetical proteins
		lmo1727	2,32	Unknown, similar to transcription regulators (LacI family)
		lmo1728	9,28	Unknown, some similarities to cellobiose-phosphorylase
		lmo1731	18,37	Unknown, similar to sugar ABC transporter, permease protein
		lmo1732	13,04	Unknown, similar to sugar ABC transporter, permease protein
X		iniC	3,85	Internalin C
		lmo1790	2,35	Unknown, similar to unknown proteins
		lmo1791	2,52	Unknown
		pyrB	2,32	Unknown, highly similar to aspartate carbamoyltransferase
		lmo1855	2,44	Unknown, similar to similar to D-alanyl-D-alanine carboxypeptidases
		deoD	2,60	Purine nucleoside phosphorylase
		lmo1857	2,36	Unknown, similar to hypoyhetical protein
		lmo1858	2,16	Unknown, similar to dehydrogenases and hypothetical proteins
		lmo1859	2,17	Unknown, similar to transcriptional regulator (PilB family)
		lmo1860	2,15	Unknown, similar to peptidyl methionine sulfoxide reductases
Y		lmo1867	2,39	Unknown, similar to pyruvate phosphate dikinase
		lmo1871	2,77	Unknown, similar to phosphoglucomutases
		lmo1876	5,69	Unknown, similar to formyl-tetrahydrofolate synthetase C-terminal part
		lmo1877	5,72	Unknown, similar to formyl-tetrahydrofolate synthetase N-terminal part
		cspD	159,25	Unknown, similar to cold shock protein

	Operon	Gene	G6P ^{XAD} / G ^{XAD}	Funktion
Y		lmo1883	25,09	Unknown, similar to chitinases
		lmo1888	2,98	Unknown, similar to hypothetical proteins
	↑	hup	3,19	Unknown, similar to non-specific DNA-binding protein HU
		lmo1935	2,81	Unknown, similar to protein-tyrosine/serine phosphatase
	↑	pnp	3,27	Unknown, similar to purine-nucleoside phosphorylase
		drm	4,90	Unknown, similar to phosphopentomutase
	↑	lmo1955	4,32	Unknown, similar to integrase/recombinase
		fhuB	2,65	Unknown, similar to ferrichrome ABC transporter (permease)
	↑	lmo1959	2,21	Unknown, similar to ferrichrome binding protein
		fhuC	2,12	Unknown, similar to ferrichrome ABC transporter (ATP-binding protein)
Y		lmo1972	3,92	Unknown, similar to pentitol PTS system enzyme II B component
Y	↑	lmo1998	5,78	Unknown, similar to opine catabolism protein
Y		lmo1999	3,07	Unknown, weakly similar to glucosamine-fructose-6-phosphate aminotransferase
Y		lmo2000	5,30	Unknown, similar to PTS mannose-specific enzyme IID component
Y		lmo2002	3,95	Unknown, similar to PTS mannose-specific enzyme IIB component
		lmo2003	4,56	Unknown, similar to transcription regulator GntR family
Y	↑	lmo2007	2,43	Unknown, weakly similar to putative sugar-binding lipoproteins
Y		lmo2008	2,72	Unknown, similar to putative ABC transporter, permease protein
		cspB	2,42	Unknown, similar to major cold-shock protein
	↑	lmo2065	3,12	Unknown
		lmo2066	4,08	Unknown
	↑	groEL	6,14	Class I heat-shock protein (chaperonin) GroEL
		groES	5,06	Class I heat-shock protein (chaperonin) GroES
		lmo2084	2,52	Unknown
		lmo2086	2,65	Unknown, weakly similar to transcription regulators
		lmo2089	2,06	Unknown, similar to lipases
	↑	lmo2093	2,25	Unknown
		lmo2095	4,96	Unknown, similar to 1-phosphofructokinase
		lmo2097	6,31	Unknown, similar to PTS system galactitol-specific enzyme IIB component
Y		lmo2108	2,25	Unknown, similar to N-acetylglucosamine-6-phosphate deacetylase
Y	↑	lmo2122	41,46	Unknown, similar to maltodextrin utilization protein MalA
Y		lmo2123	66,12	Unknown, similar to maltodextrin ABC-transport system (permease)
Y		lmo2124	45,69	Unknown, similar to maltodextrin ABC-transport system (permease)
Y	↑	lmo2125	203,77	Unknown, similar to maltose/maltodextrin ABC-transporter (binding protein)
		lmo2126	6,86	Unknown, similar to maltogenic amylase
		lmo2129	6,84	Unknown
Y	↑	lmo2134	25,74	Unknown, similar to fructose-1,6-biphosphate aldolase type II
Y		lmo2135	12,54	Unknown, similar to PTS system, fructose-specific enzyme IIC component
Y		lmo2136	27,36	Unknown, similar to PTS system, fructose-specific enzyme IIB component
		lmo2137	6,60	Unknown, similar to PTS system, fructose-specific enzyme IIA component
		lmo2138	33,55	Unknown, similar to transcription regulator
		lmo2139	2,16	Unknown, similar to ABC transporter (ATP-binding protein)
	↓	lmo2140	2,34	Unknown, similar to ABC transporter (membrane protein)
		lmo2141	2,21	Unknown, similar to unknown protein
Y		lmo2143	3,28	Unknown, weakly similar to mannose-6-phosphate isomerase
	↑	lmo2150	2,06	Unknown
		lmo2158	2,63	Unknown, similar to B. subtilis YwmG protein
Y		lmo2159	3,39	Unknown, similar to oxidoreductase
		lmo2160	10,67	Unknown, similar to unknown proteins
		lmo2161	10,39	Unknown
		lmo2162	6,92	Unknown, similar to unknown proteins
		lmo2163	34,14	Unknown, similar to oxidoreductase
		lmo2164	2,28	Unknown, similar to transcriptional regulator (AraC/XylS family)
		lmo2169	2,11	Unknown
Y		lmo2175	69,86	Unknown, similar to dehydrogenase
	↑	lmo2176	2,90	Unknown, similar to transcriptional regulator (tetR family)
		lmo2181	4,86	Unknown, similar to unknown protein
		lmo2182	10,79	Unknown, similar to ferrichrome ABC transporter (ATP-binding protein)
		lmo2183	5,34	Unknown, similar to ferrichrome ABC transporter (permease)
		lmo2184	16,43	Unknown, similar to ferrichrome ABC transporter (binding protein)
		lmo2185	10,04	Unknown
		lmo2186	100,26	Unknown
		lmo2187	4,55	Unknown
		clpB	3,50	Unknown, similar to endopeptidase Clp ATP-binding chain B (ClpB)
		lmo2210	4,36	Unknown
	↓	lmo2216	2,52	Unknown, similar to histidine triad (HIT) protein
		lmo2217	2,50	Unknown, similar to unknown protein
		lmo2230	2,23	Unknown, similar to arsenate reductase
		lmo2233	2,19	Unknown, similar to transcriptional regulators (LysR family)
		lmo2256	2,84	Unknown, similar to unknown proteins
		lmo2257	7,41	Unknown, hypothetical CDS
	↑	lmo2260	2,33	Unknown, similar to unknown proteins
		lmo2261	2,26	Unknown, similar to unknown proteins

Operon	Gene	G6P ^{XAD} / G ^{XAD}	Funktion
	lmo2273	2,23	Protein gp30 [Bacteriophage A118]
	lmo2274	2,36	Protein gp29 [Bacteriophage A118]
	lmo2275	2,49	Protein gp28 [Bacteriophage A118]
	lmo2276	2,43	Unknown, similar to an unknown bacteriophage protein
	lysA	8,09	L-alanoyl-D-glutamate peptidase
	lmo2279	22,67	Holin [Bacteriophage A118]
	lmo2280	20,86	Protein gp23 [Bacteriophage A118]
	lmo2281	8,58	Protein gp22 [Bacteriophage A118]
	lmo2282	7,18	Protein gp21 [Bacteriophage A118]
	lmo2283	6,55	Protein gp20 [Bacteriophage A118]
	lmo2284	11,92	Protein gp19 [Bacteriophage A118]
	lmo2285	12,64	Protein gp18 [Bacteriophage A118]
	lmo2286	7,31	Protein gp17 [Bacteriophage A118]
	lmo2288	15,25	Protein gp15 [Bacteriophage A118]
	lmo2289	5,37	Protein gp14 [Bacteriophage A118]
	lmo2290	14,22	Protein gp13 [Bacteriophage A118]
	lmo2291	7,29	Major tail shaft protein [Bacteriophage A118]
	lmo2292	16,50	Protein gp11 [Bacteriophage A118]
	lmo2293	48,92	Protein gp10 [Bacteriophage A118]
	lmo2294	24,04	Protein gp9 [Bacteriophage A118]
	lmo2295	11,50	Protein gp8 [Bacteriophage A118]
	lmo2296	29,77	Unknown, similar to coat protein [Bacteriophage SPP1]
	lmo2297	21,68	Unknown, putative scaffolding protein [Bacteriophage A118]
	lmo2298	16,10	Protein gp4 [Bacteriophage A118]
	lmo2299	4,32	Putative portal protein [Bacteriophage A118]
	lmo2300	7,09	Putative terminase large subunit from Bacteriophage A118
	lmo2301	9,07	Unknown, similar to putative terminase small subunit from Bacteriophage A118
	lmo2302	2,46	Unknown
	lmo2303	3,31	Protein gp66 [Bacteriophage A118]
	lmo2304	5,23	Protein gp65 [Bacteriophage A118]
	lmo2305	3,85	Unknown
	lmo2306	4,65	Unknown, similar to phage protein
	lmo2307	4,91	Unknown, hypothetical protein
	lmo2308	5,18	Unknown, similar to single-stranded DNA-binding protein
	lmo2309	5,79	Unknown
	lmo2310	4,69	Unknown
	lmo2311	5,29	Unknown
	lmo2312	6,21	Unknown
	lmo2313	6,14	Unknown, similar to a bacteriophage protein
	lmo2314	5,39	Unknown
	lmo2315	5,14	Unknown, similar to protein gp51 [Bacteriophage A118]
	lmo2316	5,35	Unknown, similar to site-specific DNA-methyltransferase
	lmo2317	4,23	Unknown, similar to protein gp49 [Bacteriophage A118]
	lmo2318	5,83	Unknown
	lmo2319	2,34	Unknown, similar to bacteriophage proteins
	lmo2321	3,83	Unknown
	lmo2322	5,16	Protein gp44 [Bacteriophage A118]
	lmo2323	3,52	Protein gp43 [Bacteriophage A118]
	lmo2324	3,78	Unknown, similar to anti-repressor [Bacteriophage A118]
	lmo2325	3,39	Unknown
	lmo2326	4,28	Unknown, similar to protein gp41 [Bacteriophage A118]
	lmo2327	3,16	Unknown
	lmo2328	5,03	Unknown, similar to transcription regulator
	lmo2329	2,11	Unknown, similar to a putative repressor protein [Bacteriophage A118]
	lmo2330	2,01	Unknown, similar to protein gp33 [Bacteriophage A118]
	lmo2331	2,10	Unknown, weakly similar to gp32_Bacteriophage A118 protein
	lmo2334	2,18	Unknown, similar to transcriptional regulator
	fruA	2,51	Unknown, highly similar to phosphotransferase system (PTS) fructose-specific enzyme IIBC component
	fruB	2,31	Fructose-1-phosphate kinase
	lmo2337	2,00	Unknown, similar to regulatory protein DeoR family
	lmo2340	6,18	Unknown, similar to Erwinia chrysanthemi IndA protein
	lmo2341	4,25	Unknown, similar to carbohydrate kinases
	lmo2342	2,52	Unknown, similar to 16S pseudouridylate synthase
	lmo2373	2,77	Unknown, similar to phosphotransferase system (PTS) beta-glucoside-specific enzyme IIB component
	lmo2388	2,01	Unknown, similar to B. subtilis YwqG protein
	lmo2391	6,94	Unknown, conserved hypothetical protein similar to B. subtilis YhfK protein
	lmo2392	3,12	Unknown, similar to B. subtilis YuzB protein
	lmo2393	3,37	Unknown, similar to B. subtilis YuzD protein
	lmo2406	2,89	Unknown, similar to B. subtilis YunF protein
	lmo2425	3,52	Unknown, similar to glycine cleavage system protein H
	lmo2432	11,92	Unknown
	lmo2437	29,83	Unknown
	lmo2454	3,25	Unknown
	lmo2480	2,04	Unknown, similar to acetyltransferase

	Operon	Gene	G6P ^{XAD} / G ^{XAD}	Funktion
		Imo2504	2,24	Unknown, similar to cell wall binding proteins
		spl	2,37	Peptidoglycan lytic protein P45
		ftsX	2,55	Unknown, highly similar to cell-division protein FtsX
		ftsE	2,48	Unknown, highly similar to the cell-division ATP-binding protein FtsE
		Imo2511	8,23	Unknown, similar to conserved hypothetical proteins like to <i>B. subtilis</i> YvyD protein
		glyA	7,23	Unknown, highly similar to glycine hydroxymethyltransferase
		Imo2564	2,71	Unknown, similar to 4-oxalocrotonate isomerase
		Imo2570	2,65	Unknown
		Imo2571	2,33	Unknown, similar to nicotinamide
		Imo2574	4,98	Unknown
		Imo2582	4,90	Unknown, similar to two-component sensor histidine kinase
		Imo2583	7,73	Unknown, similar to two-component response regulator
Y		Imo2584	120,90	Unknown, similar to formate dehydrogenase associated protein
		Imo2585	167,76	Unknown, similar to <i>B. subtilis</i> YrhD protein
Y		Imo2586	155,66	Unknown, similar to formate dehydrogenase alpha chain
		Imo2590	4,97	Unknown, similar to ATP binding proteins
		Imo2648	7,87	Unknown, similar to Phosphotriesterase
Y		Imo2651	5,42	Unknown, similar to mannitol-specific PTS enzyme IIA component
Y		Imo2659	12,82	Unknown, similar to ribulose-phosphate 3-epimerase
Y		Imo2660	14,92	Unknown, similar to transketolase
		Imo2662	45,85	Unknown, similar to ribose 5-phosphate epimerase
Y		Imo2663	133,48	Unknown, similar to polyol dehydrogenase
Y		Imo2664	184,22	Unknown, similar to sorbitol dehydrogenase
Y		Imo2665	67,21	Unknown, similar to PTS system galactitol-specific enzyme IIC component
Y		Imo2666	78,38	Unknown, similar to PTS system galactitol-specific enzyme IIB component
Y		Imo2667	49,40	Unknown, similar to PTS system galactitol-specific enzyme IIA component
		Imo2668	41,78	Unknown, similar to transcriptional antiterminator (BglG family)
		Imo2673	13,17	Unknown, conserved hypothetical protein
Y		Imo2674	8,19	Unknown, similar to ribose 5-phosphate epimerase
Y		Imo2683	75,80	Unknown, similar to cellobiose phosphotransferase enzyme IIB component
Y		Imo2684	30,46	Unknown, similar to cellobiose phosphotransferase enzyme IIC component
Y		Imo2685	36,30	Unknown, similar to cellobiose phosphotransferase enzyme IIA component
		Imo2692	2,49	Unknown
Y		Imo2695	8,69	Unknown, similar to dihydroxyacetone kinase
Y		Imo2696	8,30	Unknown, similar to hypothetical dihydroxyacetone kinase
		Imo2697	11,39	Unknown
		Imo2699	2,34	Unknown, similar to conserved hypothetical protein
		Imo2700	3,16	Unknown, similar to aldo/keto reductase
		Imo2706	2,29	Unknown
		Imo2707	2,28	Unknown
Y		Imo2708	128,89	Unknown, similar to PTS system, cellobiose-specific enzyme IIC
		Imo2713	3,75	Unknown, secreted protein with 1 GW repeat
		Imo2714	3,86	Unknown, peptidoglycan anchored protein (LPXTG motif)
		Imo2728	2,15	Unknown, similar to transcription regulator MerR family
		Imo2729	2,40	Unknown, similar to unknown proteins
		Imo2742	20,22	Unknown
Y		Imo2743	27,46	Unknown, similar to transaldolase
		Imo2748	4,12	Unknown, similar to <i>B. subtilis</i> stress protein YdaG
		Imo2759	3,52	Unknown, similar to unknown protein
		Imo2761	3,82	Unknown, similar to beta-glucosidase
		Imo2762	11,53	Unknown, similar to PTS cellobiose-specific enzyme IIB
Y		Imo2763	14,76	Unknown, similar to PTS cellobiose-specific enzyme IIC
		Imo2764	9,20	Unknown, similar to xylose operon regulatory protein and to glucose kinase
		Imo2773	3,66	Unknown, similar to transcription antiterminator
		bvrC	2,28	Unknown
		bvrA	5,34	Transcription antiterminator
		Imo2792	2,64	Unknown
		Imo2796	3,28	Unknown, similar to transcription regulator
Y		Imo2797	3,22	Unknown, similar to phosphotransferase system mannitol-specific enzyme IIA
Y		Imo2798	7,76	Unknown, similar to phosphatase
		Imo2823	2,93	Unknown, similar to an hypothetical protein from <i>Thermotoga maritima</i>
		Imo2824	4,35	Unknown, similar to D-3-phosphoglycerate dehydrogenase
		serC	2,53	Unknown, highly similar to phosphoserine aminotransferase
		Imo2828	5,94	Unknown
		Imo2830	2,15	Unknown, similar to thioredoxin
		Imo2831	2,88	Unknown, similar to phosphoglucomutase
		Imo2832	3,14	Unknown, similar to unknown proteins
		Imo2846	4,42	Unknown, highly similar to <i>B. subtilis</i> YulD protein
Y		Imo2848	4,08	Unknown, highly similar to L-rhamnose isomerase
Y		Imo2849	2,70	Unknown, similar to rhamnulokinase
Y		Imo2850	3,52	Unknown, similar to sugar transport proteins

Tab. 8.7: Auflistung aller herunterregulierten Gene des Wildtyps EGD-e, gewachsen in LB-Medium mit 50 mM Glukose-6-Phosphat und 5 % XAD-4 (G6P^{XAD}) im Vergleich zu dem im LB-Medium mit 50 mM Glukose und 5 % XAD-4 (G^{XAD}) gewachsenen. Die in grau unterlegten Gene befinden sich in einer Operonstruktur, dessen Orientierungsrichtung durch den schwarzen Pfeil angedeutet wird. Y = wird ebenfalls in Glycerin-haltigem Medium exprimiert; X = Genexpression wird durch XAD-4 reguliert (siehe Tab. 8.5).

	Operon	Gene	G6P ^{XAD} / G ^{XAD}	Funktion
		lmo0003	0,47	Unknown, conserved hypothetical protein
		lmo0012	0,46	Unknown, similar to mevalonate kinases
		rpsR	0,43	Ribosomal protein S18
		lmo0099	0,28	Unknown
		lmo0103	0,37	Unknown, similar to NADH oxidase
		lmo0209	0,19	Unknown
		ldh	0,18	Unknown, similar to L-lactate dehydrogenase
		lysS	0,39	Lysyl-tRNA synthetase
		clpC	0,46	Endopeptidase Clp ATP-binding chain C
		lmo0233	0,47	Unknown, similar to DNA repair protein Sms
		cysE	0,48	Unknown, similar to serine O-acetyltransferase
		lmo0247	0,49	Unknown
		rpK	0,41	Ribosomal protein L11
		rpIA	0,45	Ribosomal protein L1
		lmo0283	0,27	Unknown, similar to ABC transporter permease protein
		lmo0284	0,35	Unknown, similar to ABC transporter (ATP-binding protein)
Y		lmo0286	0,21	Unknown, similar to aminotransferase
		lmo0355	0,30	Unknown, similar to Flavocytochrome C Fumarate Reductase chain A
		lmo0412	0,24	Unknown
		iniB	0,40	Internalin B
		lmo0435	0,24	Unknown, putative peptidoglycan bound protein (LPXTG motif)
		lmo0450	0,24	Unknown, similar to unknown proteins
		lmo0451	0,20	Unknown
		lmo0469	0,44	Unknown
Y		lmo0490	0,31	Unknown, similar to shikimate 5-dehydrogenase
		lmo0519	0,30	Unknown, similar to multidrug resistance protein
		lmo0573	0,37	Unknown, conserved hypothetical protein
		lmo0593	0,46	Unknown, similar to transport proteins (formate?)
		lmo0596	0,45	Unknown, similar to unknown proteins
Y		lmo0604	0,47	Unknown, similar to B. subtilis YviA protein
		lmo0611	0,26	Unknown, similar to acyl-carrier protein phosphodiesterase and NAD(P)H dehydrogenase
		lmo0626	0,47	Unknown, similar to unknown protein
		lmo0641	0,29	Unknown, similar to heavy metal-transporting ATPase
		lmo0667	0,48	Unknown, similar to ABC transporter (ATP-binding protein)
		lmo0722	0,47	Unknown, similar to pyruvate oxidase
		lmo0731	0,46	Unknown
		lmo0786	0,45	Unknown, similar to acyl-carrier protein phosphodiesterase and to NAD(P)H dehydrogenase
		lmo0788	0,33	Unknown
		lmo0795	0,34	Unknown, conserved hypothetical protein
		lmo0798	0,50	Unknown, similar to lysine-specific permease
		lmo0814	0,37	Unknown, similar to oxidoreductases
		lmo0815	0,42	Unknown, similar to transcription regulators
		nifJ	0,40	Unknown, highly similar to pyruvate-flavodoxin oxidoreductase
		lmo0846	0,49	Unknown, similar to excinuclease ABC, chain C (UvrC)
Y		lmo0866	0,29	Unknown, similar to ATP-dependent RNA helicase
Y		lmo0897	0,05	Unknown, similar to transport proteins
		lmo0912	0,22	Unknown, similar to transporters (formate)
		lmo0920	0,42	Unknown, similar to B. subtilis YcgR protein
		lmo0921	0,49	Unknown, similar to B. subtilis YcgQ protein
		lmo0934	0,44	Unknown, similar to B. subtilis YhbA protein
		lmo0935	0,28	Unknown, similar to B. subtilis CspR protein, rRNA methylase homolog
Y		lmo0951	0,48	Unknown
		lmo0960	0,17	Unknown, similar to proteases
		lmo0961	0,12	Unknown, similar to proteases
		lmo0988	0,41	Unknown, similar to peptide chain release factor 3 (RF-3)
		lmo0995	0,38	Unknown, similar to B. subtilis YkrP protein
Y		gbuA	0,32	Unknown, highly similar to glycine betaine ABC transporter (ATP-binding protein)
Y		gbuB	0,23	Unknown, highly similar to glycine betaine ABC transporters (permease)
		gbuC	0,32	Unknown, highly similar to glycine betaine ABC transporters (glycine betaine-binding protein)
		lmo1067	0,36	Unknown, similar to GTP-binding elongation factor
		lmo1211	0,46	Unknown, similar to unknown proteins
		racE	0,47	Unknown, similar to glutamate racemase
		lmo1250	0,42	Unknown, similar to antibiotic resistance protein
		lmo1251	0,14	Unknown, similar to regulator of the Fnr CRP family (including PrfA)
		lmo1257	0,27	Unknown
Y		proA	0,45	Gamma-glutamyl phosphate reductase
		lmo1266	0,31	Unknown

Operon	Gene	G6P ^{XAD} / G ^{XAD}	Funktion
	parC	0,36	Unknown, highly similar to DNA gyrase-like protein (subunit A)
	lmo1351	0,49	Unknown
	lmo1369	0,43	Unknown, similar to phosphotransbutyrylase
	lmo1375	0,31	Unknown, similar to aminotripeptidase
	lmo1401	0,50	Unknown, conserved hypothetical protein
	pfiB	0,20	Pyruvate formate-lyase
	pfiC	0,09	Pyruvate-formate lyase activating enzyme
			Unknown, similar to glycine betaine/carnitine/choline ABC transporter (ATP-binding protein)
Y	lmo1421	0,28	
	lmo1422	0,43	Unknown, similar to glycine betaine/carnitine/choline ABC transporter (membrane protein)
	lmo1424	0,24	Unknown, similar to manganese transport proteins NRAMP
	lmo1470	0,45	Unknown, similar to unknown proteins
	lmo1471	0,48	Unknown, similar to ribosomal protein L11 methyltransferase
Y	hrcA	0,48	Transcription repressor of class I heat-shock gene HrcA
	udk	0,47	Unknown, similar to Uridine kinase
	aspS	0,43	Aspartyl-tRNA synthetase
	lmo1525	0,38	Unknown, similar to single-stranded-DNA-specific exonuclease (RecJ)
	lmo1536	0,47	Unknown, similar to prephenate dehydratase PheA
	folC	0,19	Unknown, similar to Folyl-polyglutamate synthetase
	lmo1555	0,45	Unknown, similar to uroporphyrinogen III cosynthase (HemD)
Y	hemC	0,46	Unknown, highly similar to porphobilinogen deaminases (hydroxymethylbilane synthase)
	tyrS	0,44	Tyrosyl-tRNA synthetase
	lmo1604	0,39	Unknown, similar to 2-cys peroxiredoxin
	lmo1618	0,45	Unknown, similar to transcription regulator MarR family
Y	lmo1634	0,09	Unknown, similar to Alcohol-acetaldehyde dehydrogenase
	tsf	0,47	Translation elongation factor
	leuS	0,49	Leucyl-tRNA synthetase
Y	ansB	0,41	Unknown, similar to asparaginyl-tRNA synthetases
	lmo1712	0,34	Unknown, similar to multidrug resistance protein, integral membrane protein
	lmo1751	0,35	Unknown, similar to hypothetical RNA methyltransferase
	lmo1752	0,29	Unknown
	purE	0,44	Hosphoribosylaminoimidazole carboxylase I
	rplS	0,49	Ribosomal protein L19
	lmo1796	0,41	Unknown, similar to unknown protein
	rpsP	0,44	Ribosomal protein S16
	rncS	0,49	Unknown, similar to ribonuclease III
Y	lmo1848	0,24	Unknown, similar metal cations ABC transporter (permease protein)
Y	lmo1849	0,23	Unknown, similar to metal cations ABC transporter, ATP-binding proteins
	pfiA	0,42	Unknown, similar to pyruvate formate-lyase
	lmo1922	0,49	Unknown, similar to unknown proteins
	recS	0,38	Unknown, similar to ATP-dependent DNA helicase
	lmo1943	0,29	Unknown, similar to unknown proteins
	lmo1945	0,23	Unknown, similar to unknown protein
Y	lmo1978	0,43	Unknown, similar to glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase
	lmo1992	0,43	Unknown, similar to alpha-acetolactate decarboxylase
X	alsS	0,11	Unknown, similar to alpha-acetolactate synthase protein, AlsS
Y	lmo2114	0,38	Unknown, similar to ABC transporter (ATP-binding protein)
	lmo2115	0,38	Unknown, similar to ABC transporter (permease)
	lmo2156	0,39	Unknown
Y	lmo2192	0,47	Unknown, similar to oligopeptide ABC transporter (ATP-binding protein)
Y	lmo2193	0,41	Unknown, similar to oligopeptide ABC transporter (ATP-binding protein)
Y	lmo2194	0,49	Unknown, similar to oligopeptide ABC transporter (permease)
	hemH	0,32	Unknown, similar to ferrochelataase
	hemE	0,27	Unknown, similar to uroporphyrinogen III decarboxylase
	lmo2218	0,37	Unknown
Y	arpJ	0,22	Unknown, similar to amino acid ABC transporter, permease protein
	lmo2254	0,27	Unknown, similar to unknown proteins
Y	lmo2355	0,49	Unknown, Similar to multidrug resistance protein
X	lmo2360	0,39	Unknown, transmembrane protein
	lmo2365	0,48	Unknown, similar to S. pyogenes RofA regulatory protein
	lmo2410	0,37	Unknown
	lmo2418	0,43	Unknown, similar to ABC transporter, permease protein
	gap	0,39	Unknown, highly similar to glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
	lmo2460	0,35	Unknown, similar to B. subtilis CggR hypothetical transcriptional regulator
	lmo2467	0,31	Unknown, similar to chitinase and chitin binding protein
	lmo2479	0,38	Unknown
	uvrB	0,50	Excinuclease ABC (subunit B)
	comFC	0,45	Unknown, similar to late competence protein comFC
	lmo2553	0,39	Unknown, conserved hypothetical protein
	lmo2554	0,21	Unknown, similar to galactosyltransferase
	lmo2587	0,45	Unknown, conserved hypothetical protein
	lmo2588	0,34	Unknown, similar to drug-export proteins

Operon	Gene	G6P ^{XAD} / G ^{XAD}	Funktion
Y	rplQ	0,49	Ribosomal protein L17
	rpoA	0,33	Unknown, highly similar to RNA polymerase (alpha subunit)
	rpsK	0,36	Ribosomal protein S11
	rpsM	0,41	Ribosomal protein S13
	rpmJ	0,34	Ribosomal protein L36
	infA	0,35	Unknown, highly similar to initiation factor IF-I
	adk	0,31	Unknown, highly similar to adenylate kinases
	secY	0,34	Unknown, highly similar to preprotein translocase subunit
	rplO	0,30	Ribosomal protein L15
	rpmD	0,32	Ribosomal protein L30
	rpsE	0,29	Ribosomal protein S5
	rplR	0,32	Ribosomal protein L18
	rplF	0,27	Ribosomal protein L6
	rpsH	0,34	Ribosomal protein S8
	rpsN	0,30	Ribosomal protein S14
	rplE	0,31	Ribosomal protein L5
	rplX	0,38	Ribosomal protein L24
	rplN	0,35	Ribosomal protein L14
	rpsQ	0,41	Ribosomal protein S17
	rpmC	0,34	Ribosomal protein L29
	rplP	0,43	Ribosomal protein L16
	rpsC	0,44	Ribosomal protein S3
	rplV	0,50	Ribosomal protein L22
	lmo2635	0,35	Unknown, weakly similar to E. coli MenA protein
	lmo2636	0,46	Unknown, conserved hypothetical lipoprotein
	lmo2637	0,50	Unknown, conserved lipoprotein
	lmo2641	0,43	Unknown, similar to heptaprenyl diphosphate synthase component II
	lmo2642	0,37	Unknown
	lmo2669	0,29	Unknown
	lmo2686	0,44	Unknown
	cydD	0,18	Unknown, highly similar to ABC transporter (ATP-binding protein) required for expression of cytochrome BD
	cydC	0,16	Unknown, highly similar to ABC transporter required for expression of cytochrome BD
	cydB	0,13	Unknown, highly similar to cytochrome D ubiquinol oxidase subunit II
cydA	0,20	Unknown, highly similar to cytochrome D ubiquinol oxidase subunit I	
lmo2719	0,33	Unknown, conserved hypothetical proteins	
lmo2720	0,32	Unknown, similar to acetate-CoA ligase	
guaB	0,42	Unknown, similar to inosine-monophosphate dehydrogenase	
lmo2782	0,04	Unknown, similar to PTS, cellobiose-specific IIB component	
X	kat	0,11	Catalase
	lmo2811	0,50	Unknown, similar to GTPase

8.2 ClustalW Alignments

		1		50
DhaK <i>E. coli</i>	(1)	MPYRNCWSKI	MKKLIINDVQDVLDEQLAGLAKAHPSITLHQDPVYVTRADA	
Lmo0348	(1)	-----	MRRLVNDGYEAVEEMLAGYVAAQCKYVDFAEENDKRVIVSK	
Lmo2695	(1)	-----	MKKIILNGTDQVVEQMVVEGLVKSHADVHRVETGRVIVARND	
			His-66	
		51	*	100
DhaK <i>E. coli</i>	(51)	PVAG--	KVALLSGGGSGHEPMLCGYIQGMLSGACPGEIFTSPTPKIFE	
Lmo0348	(41)	QMS EEP	RVRIIVGGGSGHEPLFLGYVGFADAAVVGNIINTSPSPEPCYN	
Lmo2695	(41)	KRPG--	KVGLVSGGGSGHEPAHAGYVGRGMLSAAVCGDVFVTSPTPDQIYE	
			Asp-119	
		101	*	150
DhaK <i>E. coli</i>	(99)	CAMQVDGGE	GVLLI IKNYTGD IILNFEITATEILHDSGVKVTTVVDDDDAVV	
Lmo0348	(91)	AVKAVDSCKG	CLYMYGNYAGDVMNFDMGAEMAADDGIRVETVLVTDITYS	
Lmo2695	(89)	GIKAADQAG	VLLIVKNYTGDVMNFEAADLADADDIKVEQIVVDDDDLAV	
		151		200
DhaK <i>E. coli</i>	(149)	KD SLYT A	GRRGVANTVLI EKLVGAAAEERGDSLDA CAELGRKLNNGHSTIG	
Lmo0348	(141)	AEKVEDR--	RGVAGDLIVFKAAASAAAKGLDLDVAVQA AEKANANTFSMG	
Lmo2695	(139)	EDSTFTT	GRRGVAGTVLVHKLIGAAAEAGASLDELKALGKVIASVKTIG	
			His-230	
		201	*	250
DhaK <i>E. coli</i>	(199)	I A L G A C T V P A A G K P S F T L A D N E M E F G V G I H G E P C I D R R F S S L D Q T V D E M		
Lmo0348	(189)	V A L S S S T L P V T G K A I F E M K E G E M E V G M G I H G E P C I K R T S T E P A D K V V D Q I		
Lmo2695	(189)	V A L S P C T V P E V G H P G F E L G D D E I E L G I G I H G E P C F T R E K I M P S A S L A K Q L		
		251		300
DhaK <i>E. coli</i>	(249)	F D T I L L V N G S Y H R T L R F W D Y Q Q G S W Q E E Q Q T K Q P L Q S G D R V I A L V N N L G A T		
Lmo0348	(239)	M G Y L I E E ----- M K L T S D E E V H V L I N G L G G L		
Lmo2695	(239)	Y E R I S - N ----- E --- S K L L A G D K V V V L V N G M G A T		
		301		350
DhaK <i>E. coli</i>	(299)	P L S E L Y G V Y N R L T T R C Q Q A G L I T I E R N L I G A Y C T S L D M I G F S I T L L K V D D E		
Lmo0348	(265)	P V M D Q Y I C Y R R V D E I L K E K V H I H N P L V G N Y A T S M D M I G M S I T L V R L D D E		
Lmo2695	(265)	P L M E Q Y V F A N D V H E L L K N A G V Q V E K I L V G D Y M T S L E M A G L S L T I L K L E D E		
		351		369
DhaK <i>E. coli</i>	(349)	T - L A L W D A P V H T P A L N W G K		
Lmo0348	(315)	L - K D L L D T P C D T P Y F K V D -		
Lmo2695	(315)	K W V D M I K L P V D T I A W - - - -		

DhaK *E. coli* vs. Lmo0348: 48,6 % Ähnlichkeit; 32,3 % Identität

DhaK *E. coli* vs. Lmo2695: 56,7 % Ähnlichkeit; 41,7 % Identität

Lmo0348 vs. Lmo2695: 59,3 % Ähnlichkeit; 39,8 % Identität

Abb. 8.1: ClustalW Analyse (Vektor NTI) der Dihydroxyaceton (Dha)-Kinase-Untereinheit DhaK aus *E. coli* (*ycgT*) und den Dha-Kinase-Untereinheiten kodiert von lmo0348 und lmo2695 aus *L. monocytogenes*. Die drei Proteine zeigen zusammen eine Ähnlichkeit von 75,9 % und 22,8 % Identität (bei Verwendung der Matrix Blosum62mt2). *, His-66, Asp-119 und His-230 sind in *E. coli* an der kovalenten Bindung von Dha beteiligt (Siebold *et al.*, 2003b).

8.3 Abkürzungsverzeichnis

A	Amper / Adenin
Abb.	Abbildung
ActA/ <i>actA</i>	Aktin-bindender Faktor A/-Gen
ADP	Adenosindiphosphat
Ala	Alanin
Arg	Arginin
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
B.	<i>Bacillus</i>
BHI	Brain Heart Infusion
bp	Basenpaare
BSA	Bovine Serum Albumine Rinderserumalbumin)
bzw.	Beziehungsweise
C	Cytosin / Cellobiose
C3	Verbindung mit drei Kohlenstoffatomen
°C	Grad Celsius
ca.	circa
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CcpA/ <i>ccpA</i>	Catabolite control protein A/-Gen
CcpB/ <i>ccpB</i>	Catabolite control protein B/-Gen
CcpC/ <i>ccpC</i>	Catabolite control protein C/-Gen
cDNA	komplementäre DNA
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-Propansulfonate
Ci	Curie
Cm	Chloramphenicol
<i>cre</i>	catabolite responsive element
Crp	cAMP receptor protein
C-terminal	Carboxyterminus
CTP	Cytosintriphosphat
D	Dalton
dATP	Desoxy-Adenosintriphosphat
dCTP	Desoxy-Cytosintriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dest.	Destilliert
dGTP	Desoxy-Guanosintriphosphat
d.h.	das heißt
Dha	Dihydroxyaceton
DhaK	Dihydroxyaceton-Kinase-Untereinheit K
DhaL	Dihydroxyaceton-Kinase-Untereinheit L
DhaM	Dihydroxyaceton-Kinase-Untereinheit M
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxy-Nukleosidtriphosphate
DPM	Disintegration/min

ds	doppelsträngig
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxy-Thymidintriphosphat
E.	<i>Escherichia</i>
EI/ <i>ptsI</i>	Enzym I/-Gen
EII	Enzym II
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Em	Erythromycin
Em ^R	Erythromycinresistenz
et al.	und andere
etc.	et cetera
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
F-Aktin	filamentöses Aktin
FBP	Fruktose-1,6-Bisphosphat
FKS	fötale Kälberserum
g	Gramm
G	Guanin / Glukose
G1P	Glukose-1-Phosphat
G6P	Glukose-6-Phosphat
G-Aktin	globuläres Aktin
GlpD/ <i>glpD</i>	Glyzerin-Dehydrogenase/-Gen
GlpF	Glyzerin Facilitator
GlpK	Glyzerin-Kinase
Glu	Glutamin
Gly	Glycin
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinethansulfonsäure
His	Histidin
HPr/ <i>ptsH</i>	hitzestabiles Protein/-Gen
HPrK/P/ <i>hprK</i>	HPr-Kinase/Phosphorylase/-Gen
UhpT/ <i>uhpT</i>	Hexose-Phosphat-Transporter/-Gen
HSPG	Heparansulfat-Proteoglykane
HTH	Helix-Turn-Helix-Motiv
i.d.R.	in der Regel
InlC/ <i>inlC</i>	Internalin C/-Gen
K.	<i>Klebsiella</i>
kb	Kilobase
kD	Kilodalton
KE	Klett-Einheiten
KKR	Kohlenstoff-Katabolitrepression
Km	Kanamycin
Km ^R	Kanamycinresistenz
kV	Kilovolt
l	Liter
L.	<i>Listeria</i>
LB	Luria-Bertani
Leu	Leucin
LLO/ <i>hly</i>	Listeriolysin O/-Gen

log.	logarithmisch
LRR	Leucin-reiche Repeats
Lsg.	Lösung
LZZ	Lebendzellzahl
μ	mikro (10 ⁻⁶)
m	milli (10 ⁻³)
M	Molar
min	Minute
MIP	Major Intrinsic Protein
MM	Minimalmedium
MOI	Multiplicity Of Infection
Mpl/ <i>mpl</i>	Metalloprotease/-Gen
mRNA	Messenger RNA
MW	Molekulargewicht
n	nano (10 ⁻⁹)
N	beliebiges Nukleotid (A,C,G oder T)
N-terminal	Aminoterminus
OD...	optische Dichte bei ... nm
ORF	Open Reading Frame
p	pico (10 ⁻¹²)
P	Phosphat
P _i	anorganisches Phosphat
P _{ii}	anorganisches Pyrophosphat
pI	isoelektrischer Punkt
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PC-PLC/ <i>plcB</i>	Phosphatidylcholin-spezifische Phospholipase C/-Gen
PCR	Polymerase Chain Reaction
PEG	Polyethylenglycol
PEP	Phosphoenolpyruvat
PEP::PTS/PTS	Phosphoenolpyruvat-Phosphotransferase-System
PRD	PTS Regulation Domains
PrfA/ <i>prfA</i>	Positiver Regulationsfaktor A/-Gen
Pro	Prolin
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RpoB/ <i>rpoB</i>	RNA-Polymerase (β-Untereinheit)/-Gen
RT	Raumtemperatur; Reverse Transkription
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
Ser	Serin
sog.	sogenannten
ss	einzelsträngig
Sv	Serovar
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBE	Tris-Borsäure-EDTA

TCA	Trichloressigsäure
TEMED	Tetramethylethylendiamin
T _m	Schmelztemperatur
Tris	Tetramethyl Rhodamine Isocyanat
tRNA	transfer RNA
ts	temperatursensitiv
TTP	Thymidintriphosphat
Tyr	Tyrosin
U	Unit (Einheit)
ÜN	über Nacht
UV	Ultraviolett
V	Volt
v.a.	vor allem
Vol.	Volumen
v/v	„volume to volume“
W	Watt
w/v	„weight to volume“
WT	Wildtyp
Y	Glyzerin
Y3P	Glyzerin-3-Phosphat
z.B.	zum Beispiel

9 Curriculum vitae

Persönliche Daten

Name: Sonja Mertins (geb. Morawietz)
Geboren: 11.08.1977 in München
Familienstand: verheiratet
Staatsangehörigkeit: deutsch

Berufliche Tätigkeiten

Seit Jan. 2008 PostDoc an der University of Saskatchewan (Kanada)
März 2004 - Dez. 2007 Promotion an der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg am Lehrstuhl für Mikrobiologie (AG Prof. Dr. W. Goebel) an der Universität Würzburg: „Einfluss des Kohlenstoff-Metabolismus auf die Aktivität des Virulenzfaktors PrfA von *Listeria monocytogenes*“

Studium und Schulausbildung

SS 02 –WS 03/04 Julius-Maximilian-Universität Würzburg
Prüfungsfächer:
HF Mikrobiologie
NF Biochemie
NF Humangenetik
Prädikat „Sehr Gut“

WS 01/02 Auslandssemester
Universität Paul Sabatier, Toulouse/Frankreich

SS 00– SS 01 Julius-Maximilian-Universität Würzburg
Studiengang: Diplom-Biologie

WS 97/98 – WS 99/00 Humboldt-Universität zu Berlin
Studiengang: Diplom-Biologie

1990 – 1997 Ullrich-von-Hutten-Oberschule, Berlin, Abschluss: Abitur 2,9

1984 – 1990 Grundschule, Berlin

Praktika und Studienbegleitende Tätigkeiten

- 2001-2002 Im Zuge des Auslandssemesters 6 monatiges Praktikum am Centre National de la recherche scientifique (CNRS; Toulouse): Mitarbeit an der Entwicklung eines neuen „drug carrier system“
- 2000 Max-Planck-Institut für molekulare Genetik, Berlin
„Silencing-Funktion subtelomerischer Sequenzen in *Saccharomyces cerevisiae*“
- 1997 Max-Delbrück-Zentrum (Krebsforschung). Berlin
- 1997 Berlin Chemie AG (Mikrobiologie), Berlin
- 1996 Max-Delbrück-Zentrum (Kristallographie), Berlin
- 1997 „Jugend forscht“ : „Mikrobielle Infektion im Alaunglas“; erfolgreich Teilnahme am Regional- und Landeswettbewerb von „Jugend forscht“

Publikationen:

1. A. K. Marr[†], B. Joseph[†], S. Mertins, R. Ecke, S. Müller-Altrock, and W. Goebel
([†]contributed equally to the work)

Overexpression of PrfA Leads to Growth Inhibition of *Listeria monocytogenes* in Glucose-Containing Culture Media by Interfering with Glucose Uptake
Journal of Bacteriology, June 2006, p. 3887-3901, Vol. 188, No. 11
2. N. Mauder[†], R. Ecke[†], S. Mertins, D. I. M. Loeffler, G. Seidel, M. Sprehe, W. Hillen, W. Goebel, and S. Müller-Altrock ([†]contributed equally to the work)

Species-Specific Differences in the Activity of PrfA, the Key Regulator of Listerial Virulence Genes
Journal of Bacteriology, November 2006, p. 7941-7956, Vol. 188, No. 22
3. S. Mertins, B. Joseph, M. Goetz, R. Ecke, G. Seidel, M. Sprehe, W. Hillen, W. Goebel, and S. Müller-Altrock

Interference of Components of the Phosphoenolpyruvate Phosphotransferase System with the Central Virulence Gene Regulator PrfA of *Listeria monocytogenes*
Journal of Bacteriology, January 2007, p. 473-490, Vol. 189, No. 2
4. B. Joseph[†], S. Mertins[†], R. Stoll, J. Schär, K. R. Umesha, Q. Luo, W. Goebel and S. Müller-Altrock ([†]contributed equally to the work)

Glycerol-metabolism and PrfA activity in *Listeria monocytogenes*
Journal of Bacteriology, accepted

5. R. Stoll, S. Mertins, B. Joseph, S. Müller-Altrock and W. Goebel

Modulation of PrfA activity in *Listeria monocytogenes* upon growth in different culture media

Molecular Microbiology, submitted

6. E. Eylert[†], J. Schär[†], S. Mertins, R. Stoll, A. Bacher, W. Goebel and W. Eisenreich (†contributed equally to the work)

Metabolism of *Listeria monocytogenes* growing inside macrophages

Molecular Microbiology, accepted

Posterpräsentationen:

1. 25. Symposium on “Mechanisms of Gene Regulation”, 30.3-1.4. 2005, Blaubeuren

PrfA-regulation of Virulence in *Listeria monocytogenes*

2. 26. Symposium on “Mechanisms of Gene Regulation”, 27.-29. Sep. 2006, Königswinter

Characterization of Carbon Catabolite Repression Mutants in *Listeria monocytogenes*

3. Young Investigator Symposium on Infection Biology, 2.-3. März 2007, Würzburg

PrfA-Regulation and Carbon Catabolite Repression in *Listeria monocytogenes*