

Identifizierung
von essentiellen Genen in
Salmonella typhimurium und
Listeria monocytogenes
durch Genom-weite
Insertions-Duplikations-Mutagenese

Dissertation

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

vorgelegt von
Karin Knuth
aus Biberach a. d. Riss

Würzburg, 2004

Eingereicht am:

Mitglieder der Prüfungskommission:

Vorsitzender:

Erster Gutachter:

Zweiter Gutachter:

Datum des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

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

Neben dem akademischen Grad „Staatsexamen, Biologie und Französisch“ habe ich keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

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

Würzburg, den

Karin Knuth

Der experimentelle Teil dieser Arbeit wurde von September 2000 bis März 2002 bei der Creatogen AG in Augsburg und von April 2002 bis Dezember 2003 am Lehrstuhl für Mikrobiologie am Theodor-Boveri-Institut für Biowissenschaften der Universität Würzburg durchgeführt. Diese Arbeit war/ist ein Teil-Projekt des vom BMBF-geförderten Kompetenznetzwerk PathoGenoMik.

HERZLICHEN DANK...

An erster Stelle möchte ich meinem Betreuer Herrn Dr. Thilo M. Fuchs für die hervorragende fachliche Anleitung und vorbildliche Betreuung trotz einer Entfernung von 260 km im Zeitraum 2002/2003 danken. Außerdem sage ich Danke für die ständige Bereitschaft, Fragen zu beantworten und Ratschläge zu geben, für die wertvollen wissenschaftlichen und nicht-wissenschaftlichen Diskussionen, für das Aufzeigen von sowohl Projekt-bezogenen als auch beruflichen Möglichkeiten und für das innige freundschaftliche Verhältnis.

Mein Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. Werner Goebel für die Möglichkeit, diese Arbeit am Lehrstuhl für Mikrobiologie durchgeführt haben zu können, sowie für die stete Unterstützung mit Ideen, Anregungen und Ratschlägen.

Bedanken möchte ich mich weiter bei Herrn Dr. Heiko Apfel, Herrn Dr. Ian Thrippleton und Herrn Dr. Christoph J. Hueck für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes bei der Creatogen AG in Augsburg.

Für die gute Zusammenarbeit, die freundschaftliche Hilfsbereitschaft und das tolle Arbeitsklima möchte ich mich bei allen Kollegen und Mitarbeitern der Creatogen AG in Augsburg und des Lehrstuhls für Mikrobiologie in Würzburg bedanken. Ganz besonders gilt dies für Dr. Thilo M. Fuchs, Dr. Heide S. Niesalla, Dr. Elke A. Freissler, Dr. Marion Déjosez, Bastian Blombach, Claudia Stühler, Dr. Shubha Gopal, Monika Götz, Ellen Appel, Jörg Slaghuis, Dr. Marcus Rauch, Michael Herler, Markus Beck, Dr. Sabine Pilgrim und Dr. Birgit Bergmann.

Für mich undenkbar wäre die Durchführung einer solcher Arbeit ohne moralische Unterstützung durch gute Freunde gewesen. Diesen sage ich vielen Dank.

Der größte Dank gilt von ganzem Herzen meinen Eltern, Irmgard und Harry Knuth, und meiner Familie, die mich in all meinen Plänen und Entscheidungen durch ihre finanzielle, vor allem aber persönliche Hilfe stets unterstützt haben und dies noch tun.

Und schließlich danke ich Rüdiger, meinem zukünftigen Ehemann. Mit seiner Liebe, Wärme und Unterstützung ist eigentlich alles ganz leicht.

Inhalt

1	Zusammenfassung	5
2	Einleitung	8
2.1	Ansätze zur Definition des essentiellen Gen-Sets	9
2.2	<i>Salmonella enterica</i> Serovar Typhimurium	12
2.2.1	Mikrobiologie und Taxonomie	12
2.2.2	Infektionszyklus und Virulenzfaktoren	13
2.3	Ansätze zur Identifizierung von virulenz-assoziierten Genen	15
2.4	<i>Listeria monocytogenes</i>	17
2.4.1	Mikrobiologie und Taxonomie	17
2.4.2	Infektionszyklus und Virulenzfaktoren	18
2.5	Zielsetzung	21
3	Ergebnisse	22
3.1	Etablierung der Insertions-Duplikations-Mutagenese IDM	22
3.1.1	Konstruktion geeigneter Vektoren	24
3.1.1.1	Klonierung eines konditional replizierenden Vektors für die Mutagenese von <i>S. typhimurium</i> : pIDM1	25
3.1.1.2	Charakterisierung von pIDM1	26
3.1.1.3	Klonierung eines konditional replizierenden Vektors für die Mutagenese von <i>L. monocytogenes</i> : pLSV101	29
3.1.1.4	Charakterisierung von pLSV101	30
3.1.2	Konstruktion von Fragmentbanken	34
3.1.2.1	Konstruktion einer Fragmentbank von <i>S. typhimurium</i> in pIDM1	34
3.1.2.2	Konstruktion einer Fragmentbank von <i>L. monocytogenes</i> in pLSV101	37
3.2	Anwendung von IDM auf <i>Salmonella typhimurium</i>	38
3.2.1	Generierung der <i>S. typhimurium</i> Mutantenbank und Screening auf lethale Mutationsereignisse	38
3.2.2	Charakterisierung und Validierung der lethalen Insertionen	39
3.2.3	Klassifizierung der identifizierten essentiellen Gene und Untersuchung auf Homologie zu Proteinen anderer pathogener Bakterien	41
3.2.4	Regulation der Expression der identifizierten essentiellen Gene	44
3.2.5	Berechnung der Sättigung der Mutantenbank und des essentiellen Gen-Sets von <i>S. typhimurium</i>	48
3.3	Anwendung von IDM auf <i>Listeria monocytogenes</i> EGD	49

3.3.1	Generierung der Mutantenbank von <i>L. monocytogenes</i>	49
3.3.2	Reversion der Mutation	50
3.3.3	Identifizierung von attenuierenden Mutationen im Zellkultursystem	52
3.3.3.1	Screening auf verminderte intrazelluläre Replikation in Caco-2 Zellen	52
3.3.3.2	Charakterisierung der replikations-defizienten <i>L. monocytogenes</i> Mutanten	53
3.3.3.3	Klassifizierung der replikations-defizienten <i>L. monocytogenes</i> Mutanten	54
3.3.3.4	Validierung der replikations-defizienten <i>L. monocytogenes</i> Mutanten	56
3.3.4	Vergleich von Insertions- und Deletionsmutanten von <i>L. monocytogenes</i> EGD	57
3.3.4.1	Konstruktion der Deletionsmutante EGD Δ <i>glpD</i>	57
3.3.4.2	Vergleich von Insertions- und Deletionsmutanten	58
3.3.5	Screening der Mutantenbank auf Defekte in der Induktion der Differenzierung von T-Zellen zu Typ 1 T-Zellen	60
4	Diskussion	62
4.1	Etablierung der Insertions-Duplikations-Mutagenese IDM	62
4.2	Anwendung der Insertions-Duplikations-Mutagenese IDM auf <i>S. typhimurium</i>	65
4.2.1	Identifizierung von essentiellen Genen in <i>S. typhimurium</i> durch IDM	66
4.2.2	Definition des essentiellen Gen-Sets	69
4.3	Anwendung der Insertions-Duplikations-Mutagenese IDM auf <i>L. monocytogenes</i>	72
4.3.1	Identifizierung von virulenz-assoziierten Genen in <i>L. monocytogenes</i>	72
4.3.2	Ansätze zur Identifizierung von virulenz-assoziierten Genen	79
4.4	Anwendung von IDM auf weitere Organismen	80
5	Material und Methoden	82
5.1	Material	82
5.1.1	Bakterienstämme	82
5.1.2	Nährmedien und Agarplatten für Bakterien	83
5.1.3	Zelllinien	83
5.1.4	Medien und Zusätze für die Zelllinien	83
5.1.5	Plasmide	84
5.1.6	Primer	84
5.1.7	Enzyme und Standards	85

5.1.8	Häufig verwendete Lösungen und Puffer	85
5.1.9	Antibiotika	86
5.1.10	Chemikalien	86
5.1.11	Geräte und Verbrauchsmaterialien	87
5.1.12	Kits 88	
5.1.13	Software	88
5.1.14	Datenbanken und Internetadressen	88
5.2	Methoden	89
5.2.1	Mikrobiologische Methoden	89
5.2.1.1	Steriles Arbeiten	89
5.2.1.2	Anzucht und Kultur von Bakterien	89
5.2.1.3	Einfrieren von Bakterien	89
5.2.1.4	Untersuchung des <i>in vitro</i> Wachstumsverhaltens von Bakterien	89
5.2.2	Molekularbiologische Methoden	90
5.2.2.1	Allgemeine molekular- und zellbiologische Methoden	90
5.2.2.2	Isolierung chromosomaler DNA aus <i>Salmonella</i>	90
5.2.2.3	Isolierung chromosomaler DNA aus <i>Listeria</i>	90
5.2.2.4	Isolierung von Plasmid-DNA (Mini-Maßstab)	91
5.2.2.5	Isolierung von Plasmid-DNA (Midi-Maßstab)	91
5.2.2.6	Ethanol-Präzipitation von DNA	92
5.2.2.7	PEG-Präzipitation von DNA	92
5.2.2.8	DNA Quantifizierung	92
5.2.2.9	PCR-Amplifikation von DNA	92
5.2.2.10	Sequenzierung von DNA	93
5.2.2.11	Restriktion von DNA mittels Restriktionsendonukleasen	94
5.2.2.12	Dephosphorylierung von linearer DNA	94
5.2.2.13	Ligation von DNA	95
5.2.2.14	Säulenchromatographische Aufreinigung von DNA	95
5.2.2.15	Aufreinigung von DNA mit Phenol und Chloroform	96
5.2.2.16	Analytische und präparative Agarosegel-Elektrophorese	96
5.2.2.17	Elektroelution	97
5.2.2.18	Herstellung elektrokompeter Zellen von <i>E. coli</i> und <i>Salmonella</i>	97
5.2.2.19	Herstellung elektrokompeter Zellen von <i>Listeria</i>	97
5.2.2.20	Transformation durch Elektroporation	98
5.2.2.21	Konstruktion und <i>in vitro</i> Wachstum von regulierbar lethalen <i>S. typhimurium</i> Mutanten	99
5.2.2.22	Konstruktion von <i>L. monocytogenes</i> Deletionsmutanten	100
5.2.3	Zellkultur	104
5.2.3.1	Kultivierung von Zellen	104

5.2.3.2	Einfrieren und Auftauen von Zellen	104
5.2.3.3	Untersuchung der intrazellulären Replikation von <i>L. monocytogenes</i> Insertionsmutanten	104
5.2.3.4	Untersuchung von Adhäsion und Invasion von <i>L. monocytogenes</i> Stämmen	106
6	Literatur	107
7	Anhang	121
7.1	Abkürzungen	121
7.2	Tabelle I	122
7.3	Tabelle II	127
	Publikationen, Gastvorträge, Posterpräsentationen und Workshops	130
	Curriculum vitae	131

1 Zusammenfassung

Die in dieser Arbeit etablierte Insertions-Duplikations-Mutagenese IDM ermöglicht es, das Genom von pathogenen Bakterien zu mutagenisieren und die so generierte Mutantenbank im *high-throughput*-Format auf Gene zu untersuchen, die unter bestimmten Bedingungen für das infektiöse Potential oder für das Überleben dieser Keime von Bedeutung sind. Die Grundlage von IDM bildet ein konditional replizierender Vektor, in den eine Genbank des Wirtsorganismus kloniert wird und der unter nicht-permissiven Replikationsbedingungen mittels homologer Rekombination ins Chromosom integriert und dadurch einen Gen-Knockout bedingt. Das IDM-Verfahren weist gegenüber der Transposon-Mutagenese den Vorteil auf, dass das Genom nach dem Zufallsprinzip saturierend mutagenisiert werden kann und dass keine *hot spots* für die Insertion auftreten. Darüber hinaus kann der mutierte Genlocus nach Screening der Mutanten schnell per PCR identifiziert werden, indem die Exzision des Vektors induziert und das klonierte, homologe Fragment sequenziert wird. Die Insertion des Vektors ins Chromosom und damit der Gen-Knockout ist selbst ohne Selektionsdruck sehr stabil, so dass die Mutanten im Zellkultur- oder Tier-System untersucht werden können. IDM wurde im Rahmen dieser Arbeit erfolgreich auf *Salmonella enterica* Serovar typhimurium und *Listeria monocytogenes* angewandt.

Die Applikation von IDM auf *S. typhimurium* hatte zum Ziel, Gene zu identifizieren, deren Produkte für das Überleben dieses Gram-negativen Keims in Vollmedium unter Laborbedingungen essentiell sind. Ausgehend von 14.000 *S. typhimurium* Fragmentbank-Klonen konnten durch Induktion der Integration des Vektors 262 Klone identifiziert werden, für welche die Mutation zu einem lethalen Phänotyp führte. 116 der 262 entsprechenden Proteine konnte durch IDM erstmalig eine essentielle Funktion für die Vitalität von *S. typhimurium* zugewiesen werden. Darunter befinden sich sowohl Proteine, die homolog sind zu Proteinen anderer klinisch-relevanter Keime, als auch Proteine, die *Salmonella*-spezifisch sind. Der größte Teil der identifizierten Proteine ist in die Speicherung und Weitergabe von Information (Transkription, Translation, DNA-Reparatur etc.) involviert, viele sind allerdings auch Proteine unbekannter Funktion. Die Essentialität der durch IDM identifizierten Gene konnte durch die Konstruktion von konditional lethalen Mutanten bestätigt werden. IDM ist demnach das erste Mutagenese-Verfahren, welches das essentielle Gen-Set von *S. typhimurium* für das Überleben in Vollmedium zu definieren vermochte. Basierend auf den IDM Daten konnte es auf 511 Gene, d.h. auf 11 % des Gesamt-Genoms beziffert werden.

Bei der Applikation von IDM auf *L. monocytogenes* lag der Fokus auf der Identifizierung von Genen, die für das Überleben dieses Gram-positiven Bakteriums im

Zytosol von eukaryontischen Zellen von Bedeutung sind. Im Screening von bis dato 720 der 1491 *L. monocytogenes* Insertionsmutanten auf ein attenuiertes Replikationsverhalten in Caco-2 Zellen konnten 69 Mutanten selektioniert werden. In diesen Mutanten sind Gene ausgeknockt, deren Produkte hauptsächlich wichtige Funktionen in der Nährstoffbereitstellung, in der Energiesynthese und im Metabolismus inne haben.

Mit der Insertions-Duplikations-Mutagenese IDM steht ein molekulares Werkzeug zur Verfügung, welches für die Identifizierung neuer *targets* für sowohl Breitband- als auch Spezies-spezifische Antiinfektiva eingesetzt werden kann und welches unbekannt Proteinen eine biologische Funktionen zuweisen kann.

Summary

Using insertion-duplication-mutagenesis IDM, that has been established in this work, it is possible to mutate the genome of pathogenic bacteria and to generate a mutant bank. This bank can be screened in a high throughput format on genes that are relevant under certain conditions for the infectious potential and the survival of these germs. IDM is based on a conditionally replicating vector which integrates into the chromosome under non-permissive replication conditions via homologous recombination after having cloned a gene bank from the host organism into it. The vector integration causes a knockout of the respective gene. In contrast to transposon mutagenesis, the IDM approach has the advantage that the whole genome is mutated and that no mutation hot spots occur. Furthermore, after having screened the mutant bank, the mutated gene locus can be identified very quickly by applying PCR: excision of the vector is induced and the cloned, homologous fragment is sequenced. Integration of the vector into the chromosome and therefore the gene knockout is very stable even without any selection so that the mutants can be examined in the cell culture and animal model. In this work IDM has been applied successfully to *Salmonella enterica* Serovar typhimurium and *Listeria monocytogenes*.

Application of IDM to *S. typhimurium* aimed to identify genes whose products are essential for the survival of that Gram negative germ in rich medium under laboratory conditions. Starting with 14.000 *S. typhimurium* fragment-bank clones, induction of integration of the vector led to the identification of 262 clones for which the mutation resulted in a lethal phenotype. For 116 of the 262 respective proteins, this is the first data that assigns to these proteins an essential function for viability of *S. typhimurium*. Amongst them are proteins that are homologue to proteins of other clinically relevant germs, as well as proteins that are *Salmonella* specific. Most of the identified proteins are involved in information storage and processing (transcription, translation, DNA repair etc.), but many are proteins of unknown function. The

essentiality of the identified genes could be confirmed by construction of conditionally lethal mutants. Hence, IDM is the first mutagenesis approach that reached to define the essential gene-set of *S. typhimurium* for survival in rich medium. Based on the IDM data it could be estimated at 511 genes, that means at 11 % of the whole genome.

The application of IDM to *L. monocytogenes* focussed on the identification of genes that play an important role for the survival of that Gram-positive bacterium in the cytosol of eucaryotic cells. Until now 720 of the 1491 *L. monocytogenes* mutants have been screened on a attenuated replication behaviour in Caco-2 cells and 69 mutants have been selected. These mutants harbour mutations in genes whose products mainly hold important functions in nutrient uptake, energy synthesis and metabolism.

The insertion-duplication-mutagenesis IDM has proven to be a suitable molecular tool that can be used for the identification of novel targets for both broad spectrum and species-specific antibiotics and that can assign a biological function to unknown proteins.

2 Einleitung

Aufgrund der anhaltend hohen gesundheitlichen Gefahr für den Menschen durch Bakterien und der gleichzeitig zunehmenden Resistenz von Bakterien gegenüber den herkömmlichen Antibiotika (World Health Report 2003, www.who.int) haben sich Forschungsprojekte in den vergangenen Jahren stark auf die Identifizierung und Charakterisierung von Genprodukten ausgerichtet, die für die Ausprägung der Virulenz bzw. für das Überleben dieser krankheitsauslösenden Bakterien essentiell sind (Forsyth *et al.*, 2002). Klassischerweise wird für die Untersuchung und Analyse der Funktion eines spezifischen Proteins in einem Organismus das entsprechende Gen durch Deletion oder Insertion ausgeknockt und der Effekt dieser Mutation im Vergleich zum nicht-mutierten Wildtypstamm beobachtet (Knippers, 1997). Dabei werden die Untersuchungen unter den Bedingungen durchgeführt, unter denen man einen Einfluss des analysierten Genprodukts erwartet. Oftmals ist es allerdings das Ziel, so viele Gene als möglich gleichzeitig zu identifizieren, die für das pathogene Potential oder das Überleben des untersuchten Keims von Bedeutung sind und für die eine solche Rolle bislang nicht bekannt war. In diesem Fall ist das Einfügen von gezielten Mutationen zu aufwendig, es muss vielmehr eine Genom-sättigende Mutagenese nach dem Zufallsprinzip durchgeführt und die so generierte Mutantenbank unter den gewählten Versuchsbedingungen gescreent werden. Für die Konstruktion von solchen Mutantenbanken hat sich der Einsatz von Transposons bewährt (Hayes, 2003). Allerdings können Mutanten für Screening-Ansätze auch durch Insertions-Duplikations-Mutagenese generiert werden (Lee *et al.*, 1998). Diese Mutagenese beruht auf Gen-Knockout durch Insertion eines Vektors nach homologer Rekombination und soll hier als funktionale Alternative und Ergänzung zur Transposon-Mutagenese vorgestellt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde IDM auf zwei bakterielle Pathogene angewandt: auf *Salmonella enterica* Serovar typhimurium und auf *Listeria monocytogenes*. Ziel der Mutagenisierung von *S. typhimurium* war die Identifizierung von Genen, die für das Überleben dieses Keims unter Laborbedingungen, wo alle Nährstoffe in Form von Vollmedium bereit gestellt sind, essentiell sind. Das Screening beinhaltete daher die Differenzierung zwischen lethalen und vitalen Mutationsereignissen. Die IDM Anwendung auf *L. monocytogenes* hingegen zielte darauf ab, virulenz-assoziierte Gene zu identifizieren, so dass das Screening auf die Selektion von attenuierten Mutanten ausgerichtet war.

2.1 Ansätze zur Definition des essentiellen Gen-Sets

Schon in den 90er Jahren wurden zahlreiche Versuche unternommen, die minimale Gen-Ausstattung, die für die Lebensfähigkeit eines Einzellers erforderlich ist, zu definieren (Akerley *et al.*, 1998; Mushegian *et al.*, 1996; Hutchison *et al.*, 1999). Das Konzept des essentiellen Gen-Sets impliziert, dass jedes Gen in diesem Genom unter bestimmten Bedingungen essentiell ist für das Überleben der Zelle (Maniloff, 1996; Mushegian *et al.*, 1996). Das große Interesse an der Identifizierung des minimalen Genoms beruht auf der Tatsache, dass die Genprodukte solcher Gene klassische Targets für Antiinfektiva sind. Angesichts der zunehmenden natürlichen Resistenz von krankheitsauslösenden Bakterien gegenüber bestimmten Antibiotika, eröffnet die Identifizierung von bisher unbekanntem essentiellen Genen die Möglichkeit, neue Antiinfektiva zu entwickeln (Selzer *et al.*, 2000).

Durch die Sequenzierung von derzeit mehr als 200 bakteriellen Genomen steht eine große Anzahl an Sequenzdaten zur Verfügung, die experimentelle Daten zur Essentialität eines Gens ergänzen und stützen können. Aber auch ausschließlich bioinformatische Ansätze sind bekannt, die durch *comparative genomics* das minimale Genset zu definieren suchen. Dem Ansatz von Mushegian *et al.* (1996) liegt die Idee zugrunde, dass in den Organismen, die die kleinsten Genome aufweisen, nahezu alle Gene essentiell für das Überleben sein müssten. Durch den Abgleich der Genom-Sequenz von *Mycoplasma genitalium* (468 Protein kodierende Gene) gegen diejenige von *Haemophilus influenzae* (1700 Protein kodierende Gene) konnten Mushegian *et al.* 265 Gene als das essentielle Gen-Set für das Überleben eines Einzellers festlegen. Die meisten dieser Gene sind hoch konserviert und sind homolog zu Genen von Eukaryonten und Archae-Bakterien. Koonin (2003) ging mit seinem *comparative genomics* Ansatz noch weiter, indem er die Genome von 100 verschiedenen Bakterienspezies verglich, um die minimale Gen-Ausstattung und einen allen Bakterien gemeinsamen Vorfahren, den *last universal common ancestor* (LUCA) definieren zu können. Durch die Sequenzanalysen konnte er 63 Gene als minimales Genom angeben. Dabei handelt es sich sowohl um homologe bzw. orthologe Gene dieser Bakterienarten, als auch um *non-orthologous gene displacement* Gene (NOGD), d.h. um Gene, die nicht ortholog sind zu einander, die jedoch verantwortlich sind für die identische, essentielle biologische Funktion und daher auf das gleiche Gen im gemeinsamen Vorfahren LUCA zurückgehen. Die von Koonin identifizierten 63 Gene kodieren hauptsächlich Proteine, die in die Translation involviert sind (58). Eine Kombination aus *comparative genomics* und experimenteller Bakterien-Genetik haben Arigoni *et al.* (1998) und Freiberg *et al.* (2001) auf *E. coli* angewandt. Arigoni *et al.* haben durch Sequenzanalysen in *E. coli* 26 ORFs identifiziert, die für Proteine unbekannter Funktion kodieren und die homolog sind zu Proteinen von *Mycoplasma genitalium*, dem kleinsten bislang sequenzierten Genom.

Die Deletion dieser 26 Gene durch zweimalige homologe Rekombination mit dem Temperatur-sensitiven Vektor pKO3 resultierte in der Identifizierung von sechs Genen, deren Knockout zur Lethalität von *M. genitalium* führt. Durch die Konstruktion von konditional lethalen, Arabinose-abhängigen Mutanten konnte die Essentialität dieser sechs Genloci bestätigt werden (Arigoni *et al.*, 1998). Freiberg *et al.* untersuchten die *E. coli* Gesamt-Sequenz nach ORFs unbekannter Funktion, die für putativ lösliche Proteine kodieren und die darüber hinaus homolog sind zu Proteinen von *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* und *Enterococcus*. Von den 27 selektionierten Genen konnten in *E. coli* 21 deletiert werden ohne dass die Vitalität verloren ging. Sechs der 27 Gene wurden dementsprechend als essentiell für das Überleben von *E. coli* definiert (Freiberg *et al.*, 2001).

Die meisten Untersuchungen des essentiellen Gen-Sets von Bakterien beruhen allerdings auf klassischer experimenteller Genetik. Sehr häufig wurden Transposon-basierte Methoden angewandt, um das Genom eines Organismus zu mutagenisieren und die Folgen zu beobachten. Für *Haemophilus influenzae* und *Streptococcus pneumoniae* wurde von Akerley *et al.* (1998) das Verfahren *Genomic analysis and mapping by in vitro transposition* (GAMBIT) etabliert. Nachdem *in vitro* entweder chromosomale DNA-Fragmente oder PCR-Produkte mit dem Transposon Himar1Tn mutagenisiert worden waren, wurden die Transpositions-Produkte per Transformation in die beiden natürlich kompetenten Wirte transferiert, wo sie über homologe Rekombination in das Chromosom integrierten. Mit einem Gen-spezifischen und einem Transposon-situierten Primer wurde dann per PCR nach einer gewissen Inkubationsdauer, während der sich die Mutanten vermehren konnten, die Häufigkeit und Positionierung der Insertionen analysiert (*Genetic footprinting*), die die Lebensfähigkeit der beiden untersuchten Stämme nicht beeinträchtigt hatten, um dadurch Rückschlüsse auf lethale Mutationen ziehen zu können. Nach dieser Methode konnten drei essentielle Gene in *H. influenzae* identifiziert werden. Gerdes *et al.* (2003) konnten dieses Verfahren zu einem *high throughput*-Verfahren optimieren und das gesamte Genom auf Gene screenen, deren Produkte für die Überlebensfähigkeit von *E. coli* in Vollmedium essentiell sind. Von den 4291 ORFs, die das *E. coli* MG1655 Genom umfasst, wurden nach diesem Prinzip 3746 untersucht und darunter 620 essentielle Gene identifiziert. Eine weitere Variation der Transposon-Mutagenese ist das TnAraOut-System (Judson *et al.*, 2000). Mit Hilfe eines Transposon, das zusätzlich den Arabinose-induzierbaren Promotor P_{Bad} kodiert, werden Mutanten selektioniert, deren Wachstum und Lebensfähigkeit von Arabinose abhängig geworden ist. Genotypisch betrachtet wurde in diesen Mutanten durch die Transposon-Insertion der native Promotor eines essentiellen Gens durch P_{Bad} ersetzt. Angewandt auf *Vibrio cholerae* konnten so 16 essentielle Gene

identifiziert werden, wobei vier davon bereits bekannt essentiell waren. Ein Genom-sättigender, „negativer“ Transposon-Ansatz wurde von Hutchison *et al.* (1999) für *M. genitalium* durchgeführt. Durch Selektion von vitalen *M. genitalium* Mutanten sollte herausgefunden werden, welche Gene dieses potentiell minimalen Genoms wirklich das essentielle Gen-Set konstituieren. Für 853 der 2209 untersuchten Transposon-Insertionen konnten keine vitalen Klone selektioniert werden. Die weitere Analyse erbrachte, dass 265-350 der 480 *Mycoplasma* Gene essentiell sind, darunter ca. 100 Gene, die für hypothetische Proteine unbekannter Funktion kodieren. Diesem „negativen“ Ansatz zur Identifizierung von essentiellen Genen steht die „positive“ Selektion von lethalen Transposon-Insertionen gegenüber. Akerley *et al.* (2002) haben für *H. influenzae* eine Genom-sättigende Transposon-Mutagenese durchgeführt, mit dem Ziel, lethale Mutationsereignisse mit Hilfe von *genetic footprinting* zu detektieren und dadurch essentielle Gene zu identifizieren. 478 der 1272 untersuchten ORFs wurden dementsprechend als essentiell für das Überleben von *H. influenzae* unter Vollmedium-Bedingungen ausgemacht.

Eine Alternative zu Transposon-basierten Mutagenese-Verfahren stellt der Gen-Knockout durch die Insertion einer Resistenzkassette oder eines Vektors dar. Für *Bacillus subtilis* wurden bereits beide Insertionsmethoden für die Identifizierung von essentiellen Genen beschrieben. Itaya (1995) hat in *B. subtilis* 79 nach dem Zufallsprinzip ausgewählte Genloci durch Insertion einer Resistenzkassette mutiert und dadurch sechs essentielle Gene identifiziert, darunter drei, die bereits als essentiell beschrieben sind. Kobayashi *et al.* (2003) haben 2957 Gene von *B. subtilis* einzeln durch gezielte Plasmid-Insertionen ausgeknockt. Polare Effekte dieser Insertion auf die Expression von *downstream* gelegenen Genen des gleichen Operons wurden dadurch umgangen, dass diese Gene ausgehend von einem plasmid-ständigen, IPTG-regulierten Promotor, der durch die Insertion vorgeschaltet wurde, transkribiert wurden. Von den 2957 untersuchten Genen waren 150 essentiell für die Überlebensfähigkeit von *B. subtilis* in reichhaltigem Medium. Basierend auf diesen Daten und schon bekannten Daten aus der Literatur bzw. aus Sequenzanalysen proklamieren Kobayashi *et al.*, dass sich das essentielle Gen-Set von *B. subtilis* aus 271 der 4101 vorhandenen Gene zusammensetzt.

Eine weitere methodische Alternative für die Identifizierung von essentiellen Genen ist die *antisense* Technologie. Nach Integration eines Vektors ins Chromosom wird ausgehend von einem Vektor-kodierten, induzierbaren Promotor eine artifizielle RNA transkribiert, die mit der von benachbarten Genen transkribierten mRNA hybridisieren kann, wenn sie selbst in *antisense* Orientierung zu dieser mRNA kodiert ist. Im Falle dass die durch die *antisense* RNA abgefangene mRNA von einem essentiellen Gen transkribiert wurde, ist dadurch ein Phänotyp entstanden, der in Abhängigkeit des Inducers konditional lethal ist. Ji *et al.* (2001) haben in den Vektor pYJ335, der einen

Tetrazyklin-induzierbaren Promotor kodiert, eine Fragmentbank von *Staphylococcus aureus* kloniert und durch homologe Rekombination 20.000 *S. aureus* Insertionsmutanten generiert und diese auf einen konditional lethalen Phänotyp untersucht. Sie konnten für 600 Klone ein von Tetrazyklin-abhängiges Wachstum verzeichnen. Nach Sequenzierung der 600 Inserts konnten sie ca. 150 Klone ausmachen, in denen eine artifizielle *antisense* RNA mit einer mRNA eine Duplex-Bildung eingehen konnte und so die Translation und Synthese dieses Proteins inhibieren konnte. Unter den 150 identifizierten essentiellen Genen sind ca. 60 Gene, die homolog sind zu bekannten essentiellen Genen anderer Bakterienarten. Forsyth *et al.* (2002) haben ebenfalls nach dem *antisense* RNA Prinzip 250.000 *S. aureus* Mutanten gescreent, die sie mit dem Vektor pEPSA5, der einen Xylose-induzierbaren Promotor kodiert, konstruiert haben. Sie konnten 3117 Xylose-sensitive Klone identifizieren, 2169 davon trugen die Insertion so, dass eine Inhibierung der Translation durch eine *antisense* RNA, die ausgehend vom Plasmid-kodierten Xylose-Promotor gebildet wurde, möglich war. Die weitere Analyse dieser Mutanten resultierte in der Identifizierung von 658 singulären Genloci, deren Produkte für das Überleben von *S. aureus* essentiell sind. 168 dieser Genloci sind wiederum homolog zu *M. genitalium* Genen.

2.2 *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium

2.2.1 Mikrobiologie und Taxonomie

Salmonella ist ein Gram-negatives, fakultativ intrazelluläres Stäbchen, das der Familie der Enterobacteriaceae angehört. Es sind zwei *Salmonella* Spezies definiert: *Salmonella bongori* und *Salmonella enterica*, wobei letztere Spezies sieben Subspezies aufweist. Die Subspezies 1 von *Salmonella enterica* umfasst mehr als 2.000 verschiedene Serovare, die durch O-spezifische Polysaccharidketten (O-Antigene) und eine hochvariable zentrale Domäne in den Flagellenfilamenten (H-Antigene) charakterisiert sind (Boyd *et al.*, 1996; Cotter *et al.*, 2000). In diese Subgruppe gehören auch die drei bedeutsamen, humanpathogenen *Salmonella enterica* Serovare Typhimurium, Enteritidis und Typhi. Infektionen mit diesen Serovaren werden vornehmlich durch die orale Aufnahme kontaminierter Nahrungsmittel verursacht. In Abhängigkeit vom Serovar und vom Wirt sind die Symptome eine lokale, selbstlimitierende Darminfektion bis hin zur Lethalität durch Multiorganversagen oder septischem Schock. Enteritische Salmonellosen treten in den Industrienationen derzeit mit zunehmender Häufigkeit auf (Miller *et al.*, 1995).

Salmonella enterica Serovar Typhi infiziert spezifisch den Menschen (Typhus abdominalis) und führt zu einem schwerwiegendem Krankheitsverlauf. In Entwicklungsländern kommt es durch Typhus abdominalis zu ca. 16-17 Millionen Krankheits- und 600.000 Todesfällen pro Jahr (Pang *et al.*, 1998). In Nord- und Mitteleuropa werden typhöse Salmonellosen durch Reisende importiert und treten daher nur

sporadisch auf. Serovar Typhi gilt als streng human-spezifisch und besiedelt außer Schimpansen weder Wild- noch Haustiere (Hone *et al.*, 1999).

Im Gegensatz dazu weisen die Serovare Typhimurium und Enteritidis ein breites Wirtsspektrum auf. Für einen gesunden Menschen stellen sie im Normalfall keine Lebensgefahr dar, da sich eine Infektion mit diesen Serovaren meist als selbst-limitierende Gastroenteritis manifestiert. Im Falle von immun-supprimierten Menschen kann allerdings eine Infektion mit Serovar Enteritidis lethal verlaufen. Serovar Typhimurium verursacht in suszeptiblen Mäusen bereits in einer geringen Infektionsdosis eine systemische, tödlich verlaufende Infektion, während es im Menschen nur zu einer Gastroenteritis führt (Miller *et al.*, 1995).

Aufgrund des sehr ähnlichen Krankheitsverlaufes von murinen Typhimurium und humanen Typhi Infektionen sind Mäuse, die mit Serovar Typhimurium infiziert werden, das bevorzugte Modell zur Untersuchung der Virulenz von *Salmonella* und der Immunantwort auf Salmonellose.

2.2.2 Infektionszyklus und Virulenzfaktoren

Die Infektion mit *Salmonella* erfolgt meist über kontaminierte Lebensmittel. Da nur ein Teil der oral aufgenommenen Bakterien durch den sauren pH Wert im Magen abgetötet wird, erreichen einige den hinteren Dünndarm (terminaler Ileum) und dort die Peyer'schen Plaques, die die bevorzugte Eintrittsstelle in subepitheliale Bereiche sind (Carter *et al.*, 1974). Im Bereich der Peyer'schen Plaques grenzt ein follikel-assoziiertes Epithel (FAE) die Lymphfollikel vom Darmlumen ab. Dieses FAE besteht aus Enterozyten und M-Zellen, die beide von *Salmonella* invadiert und transmigriert werden können (Jones *et al.*, 1994a; Penheiter *et al.*, 1997; Galán 1996). Nach Transmigration und Zerstörung der Enterozyten und M-Zellen gelangt *Salmonella* ungehindert in subepitheliale Gewebe, wo es eine lokale Ablösung der Epithelschicht bewirkt und auf Zellen der Immunabwehr, Makrophagen und dendritische Zellen, trifft. Diese Antigen-präsentierende Zellen (APC) phagozytieren die Bakterien. Allerdings besitzt *Salmonella* die Fähigkeit, im Phagosom im Zytosol von APCs überleben und replizieren zu können, bzw. in Makrophagen sogar Apoptose zu induzieren. Mit Hilfe dieser Zellen werden die Bakterien dann auch extraintestinal verbreitet, was zu einer Kolonisierung der mesenterialen Lymphknoten, der Leber und der Milz und damit zu einer systemischen Infektion führt.

Dieser komplexe Infektionszyklus, in dessen Verlauf *Salmonella* immer wieder mit verschiedenen Umgebungen und Abwehrmechanismen von Seiten des Wirts konfrontiert wird, erfordert spezifische Virulenzfaktoren und eine strikte Regulation der Expression dieser Faktoren (Cotter *et al.*, 2000). Die für die Virulenz von *Salmonella* essentiellen Gene liegen zum größten Teil zusammengefasst als Pathogenitätsinseln (SPI) auf dem Chromosom vor. Bislang sind fünf solcher Inseln definiert (SPI-1 bis

SPI-5). Die initiale Interaktion der Bakterien mit den M-Zellen und den Enterozyten wird durch Adhärenzfaktoren wie beispielsweise Fimbrien vermittelt. Die anschließende Invasion in diese Zellen geht mit Hilfe des Typ-III Sekretionssystems vonstatten, das hauptsächlich durch Gene der SPI-1 kodiert wird und ein komplexes Zusammenspiel von mehr als 30 Proteinen ist. Unmittelbar nach Adhäsion von *Salmonella* an eine Epithelzelle werden über eine nadel-ähnliche Struktur diverse *Salmonella* Effektorproteine (z.B. SopE, SopB, SipA, SipC und SptP) in das Zytoplasma der Wirtszelle sekretiert, die lokale und temporäre Umlagerungen der Aktin-Filamente des Zytoskeletts induzieren (*membrane ruffling*), welche *Salmonella* wiederum die Invasion ins Zytosol der Epithelzellen ermöglichen (*trigger Mechanismus*) (Hardt, *et al.*, 1998a; Galán *et al.*, 2000). Wenn *Salmonella* dann in subepitheliale Gewebe vorgedrungen ist und von APCs phagozytiert wurde, wird durch externe Signale wie Magnesium die Transkription von *Salmonella* Genen induziert (Garcia Véscovi *et al.*, 1996), die das Bakterium dazu befähigen, im Phagosom in den APCs zu replizieren und gleichzeitig antimikrobiellen Abwehrmechanismen zu entgehen. Hierzu zählt u.a. das Zwei-Komponenten-System PhoP/PhoQ (Fields *et al.*, 1986; Fields *et al.*, 1989; Groisman *et al.*, 1989; Miller *et al.*, 1989). Die Histidin-Kinase PhoP reguliert die Transkription von mehr als 20 Genen, deren Expression entweder reprimiert (PhoP reprimierte Gene *prg*) oder aktiviert wird (PhoP aktivierte Gene *pag*) (Miller *et al.*, 1990; Behlau *et al.*, 1993; Garcia Véscovi *et al.*, 1996). Darüber hinaus wird durch die spezifischen, im Phagosom vorherrschenden Bedingungen und durch PhoPQ u.a. die Expression von SPI-2 kodierten Genen induziert, die für ein weiteres Typ-III Sekretionssystem kodieren (Hensel, 2000; Shea *et al.*, 1996). Über dieses werden weitere *Salmonella* Effektorproteine (*sse*), Chaperone (*ssc*) und Regulatoren (*ssa*) sekretiert (Hensel *et al.*, 1997; Hensel *et al.* 1998), die essentiell sind für die intraphagosomale Replikation von *Salmonella*. SpiC beispielsweise verhindert die Fusion von Lysosomen mit den Phagosomen (Uchiya *et al.*, 1999). Mutationen in diesen SPI-2 kodierten Genen führen nachweislich zur Attenuation von *Salmonella* im Zellkultur- und Tiermodell (Ochman *et al.*, 1996; Hensel *et al.*, 1995). Zusätzlich zu diesen Virulenzproteinen, die direkt in die einzelnen Phasen des Infektionszyklus von *Salmonella* involviert sind oder die die Expression spezifischer Virulenz-Gene regulieren, gibt es weitere Proteine, die für das Überleben von *Salmonella* in eukaryontischen Zellen relevant sind. Dies sind Proteine, die wichtige Schritte in diversen Stoffwechselwegen katalysieren. Hierzu zählt u.a. AroA, die 3-Enolpyruvylshikimat-5-P-Synthetase, welche im Syntheseprozess von aromatischen Aminosäuren eine zentrale Rolle einnimmt (Hoiseh *et al.*, 1981).

Lage	Gen		Rolle in der Virulenz	Referenz
SPI-1	<i>inv</i>	Invasionsprotein	Sekretion von Typ-III Effektoren	Galan <i>et al.</i> , 1989
	<i>orgA</i>		Sekretion von Typ-III Effektoren	Jones <i>et al.</i> , 1994b
	<i>sptP</i>	Thyrosin-Phosphatase	Aktin-Umlagerungen	Fu <i>et al.</i> , 1998
	<i>sipA</i>	Invasionsprotein	Aktin-Umlagerungen	McGhie <i>et al.</i> , 2001
	<i>sipB</i>	Invasionsprotein	Apoptose	Hersh <i>et al.</i> , 1999
	<i>sipC</i>	Invasionsprotein	Aktin-Umlagerungen	Hayward <i>et al.</i> , 1999
61 cs	<i>sopE*</i>	Effektorprotein	Aktin-Umlagerungen	Hardt <i>et al.</i> , 1998b
SPI-2	<i>sseA</i>	Chaperon	Translokation von Typ-II Effektoren	Ruiz-Albert <i>et al.</i> , 2003
	<i>sseBCD</i>	Translokon-Proteine	Translokation von Typ-III Effektoren	Waterman <i>et al.</i> , 2003
	<i>spiC</i>	Sekretions-Apparat-Protein	Verhinderung Fusion von Phagosom mit Lysosomen	Uchiya <i>et al.</i> , 1999
SPI-3	<i>mgtCB</i>	Transportprotein	Mg ²⁺ Aufnahme	Blanc-Potard <i>et al.</i> , 1999
SPI-4	diverse		Apoptose	Wong <i>et al.</i> , 1998
SPI-5	<i>sopB*</i>	Inositol-P-Phosphatase	Chlorid-Sekretion	Norris <i>et al.</i> , 1998

Tabelle 1: Ein Auswahl an bekannten Virulenzfaktoren von *S. typhimurium* (modifiziert und ergänzt nach Marcus *et al.*, 2000). *Genprodukte, die über den Typ-III Sekretions-Apparat in die Wirtszelle sekretiert werden.

2.3 Ansätze zur Identifizierung von virulenz-assoziierten Genen

Für das bessere Verständnis von bakteriell ausgelösten Infektionskrankheiten ist es notwendig, alle Gene und Proteine zu identifizieren, die es dem infektiösen Keim ermöglichen, sein pathogenes Potential auszubilden. Zahlreiche Methoden wurden bereits für die Identifizierung und Charakterisierung solcher Gene in verschiedenen pathogenen Organismen eingesetzt. Die sogenannte *signature tagged mutagenesis* (STM) ist dabei das am häufigsten angewandte Verfahren (Hensel *et al.*, 1995). Es beruht auf einer Transposon-Mutagenese und ermöglicht das Screening von den so generierten Mutanten in Pools im *in vivo*-Infektionsmodell. Nach der *in vivo*-Untersuchung von solchen Mutantepools können Klone, die nicht mehr virulent sind, leicht identifiziert werden durch den Vergleich des Ausgangspools mit dem Pool, der nach Passage durch das Infektionsmodell selektioniert wurde und aufgrund einer Markierung der einzelnen Mutanten. STM wurde in den vergangenen Jahren erfolgreich eingesetzt zur Identifizierung von Virulenz-assoziierten Genen von pathogenen Keimen wie *Streptococcus pneumoniae* (Polissi *et al.*, 1998; Lau *et al.*, 2001;

Hava *et al.*, 2002), *Staphylococcus aureus* (Mei *et al.*, 1997), *Listeria monocytogenes* (Autret *et al.*, 2001), *Mycobacterium tuberculosis* (Camacho *et al.*, 1999), *Haemophilus influenzae* (Herbert *et al.*, 2002), *Yersinia pestis* (Flashner *et al.*, 2004), *Salmonella typhimurium* (Tsolis *et al.*, 1999) und anderen. Ein Screening nach Virulenz-assoziierten Genen mittels klassischer Transposon-Mutagenese, d.h. ohne Markierung der Mutanten, ist weit aufwendiger durchzuführen und ist aber dennoch *in vitro* auch im *high throughput*-Maßstab anwendbar. Bei dieser Methode wird entweder jede Mutante einzeln auf Defekte in der Virulenz untersucht oder aber das Screening wird mit einer Methode zur Anreicherung von attenuierten Mutanten kombiniert und ermöglicht so den Einsatz von Mutantenpools. Mit Hilfe von Transposon-Mutanten konnten virulenz-assoziierte Gene von *Salmonella enterica* Serovar typhimurium (Fields *et al.*, 1986), *Salmonella enterica* Serovar enteritidis (Zhao *et al.*, 2002), *Pseudomonas fluorescens* (de Lima Pimenta *et al.*, 2003), *Vibrio vulnificus* (Smith *et al.*, 2003) und anderen identifiziert werden. Eine weitere Methode für die Generierung von Mutanten ist die Insertionsmutagenese. Durch Insertion eines Vektors in einen Genlocus mittels homologer Rekombination wird das Leseraster zerstört und das Gen ausgeknockt. Bijlsma *et al.* (1999) haben diese Methode auf *Helicobacter pylori* angewandt und eine Insertionsmutantenbank auf Defekte in der Virulenz gescreent. Zwei Verfahren, die auf einem Vergleich der pathogenen Bakterienart mit einer nicht-pathogenen Art der gleichen Gattung basieren und zur Aufdeckung von Genen angewendet werden, die ausschließlich in der pathogenen Spezies vorhanden sind, sind die subtraktive Hybridisierung und *comparative genomics*. Durch genomische Subtraktion konnten bereits für uropathogene *E. coli* (Sorsa *et al.*, 2004), für *Shigella flexneri* (Walker *et al.*, 2002), für *Pseudomonas aeruginosa* (Choi *et al.*, 2002) und für *Porphyromonas gingivalis* (Sawada *et al.*, 1999) virulenz-assoziierte Gene identifiziert werden. Für *Listeria monocytogenes* konnten durch den bioinformatischen Vergleich der Sequenz des epidemischen Serovars 4b mit derjenigen des nicht-epidemischen Serovars 1/2a drei Transkriptionsregulatoren und sieben Oberflächenproteine, darunter zwei Internaline, als spezifisch für Serovar 4b und damit als potentiell virulenz-assoziiert bestimmt werden (Doumith *et al.*, 2004). In den vergangenen Jahren wurden zunehmend Methoden etabliert, die darauf abzielen, virulenz-assoziierte Gene durch Erstellung von Transkriptionsprofilen zu identifizieren. Diese Methoden ermöglichen es, zu untersuchen, ob ein bestimmtes Gen des pathogenen Organismus differentiell exprimiert wird, d.h. ob das Gen spezifisch während der Infektion transkribiert wird und *in vitro* nicht (differentielle Genexpression). Auch mit dieser Methode können Screenings im *high throughput*-Format durchgeführt werden. Durch zufällige Fusion von DNA-Fragmenten an Reporterproteine wie das Fluoreszenz-Protein Gfp oder eine Resistenzkassette in einem Plasmid, konnten für *Listeria monocytogenes* (Wilson *et al.*, 2001), *Staphylococcus aureus* (Schneider *et al.*, 2002) und *Yersinia entero-*

colitica (Gort *et al.*, 2000) Gene bzw. Promotoren identifiziert werden, die spezifisch unter den gewählten Infektionsbedingungen exprimiert bzw. induziert werden. Eine Kombination von Gfp-Induktion und Transposon-Mutagenese haben Köhler *et al.* (2002) angewandt. Durch fluoreszenz-mikroskopische Analyse von *Brucella suis* Transposon-Mutanten, die konstitutiv *gfp* exprimieren, konnten Mutanten selektioniert werden, die nicht mehr in Makrophagen replizieren konnten. So konnten Gene identifiziert werden, die für das pathogene Potential von *Brucella suis* essentiell sind. Im Falle des *in vivo expression technology* Systems IVET fungiert als Reporter ein essentielles Wachstumsgen, das chromosomal ausgeknockt worden ist und dadurch eine Auxotrophie bewirkt. Für die Infektiosität relevante Gene werden in diesem Verfahren dadurch identifiziert, dass DNA-Fragmente-Reporter-Fusionen selektioniert werden, die die lethale Auxotrophie komplementieren können. Mit Hilfe von IVET konnten in *Streptococcus gordonii* (Kili *et al.*, 1999), in *Klebsiella pneumoniae* (Lai *et al.*, 2001), in *Shigella flexneri* (Bartoleschi *et al.*, 2002) und in anderen Organismen Gene identifiziert werden, die für die Virulenz dieser Keime von Bedeutung sind. Für die Anwendung von IVET auf *Listeria monocytogenes* wurde das für Listeriolysin LLO kodierende, nicht für das Wachstum essentielle Gen *hly* als Reporter gen verwendet, das gleichzeitig chromosomal deletiert worden war, so dass auf Klone gescreent werden konnte, die wieder hämolytische Eigenschaften haben (Dubail *et al.*, 2000). Der Einsatz der Microarray Technologie ermöglicht ebenfalls die Analyse des Transkriptoms von einem pathogenen Bakterium unter *in vivo* Bedingungen. Für *Yersinia pestis* (Thulasiraman *et al.*, 2001), *Mycobacterium tuberculosis* (Talaat *et al.*, 2004) und *Pseudomonas aeruginosa* (Goodman *et al.*, 2004) sind hierzu bereits Ergebnisse veröffentlicht.

2.4 *Listeria monocytogenes*

2.4.1 Mikrobiologie und Taxonomie

Listeria ist ein Gram-positives, fakultativ intrazelluläres, fakultativ anaerobes, nicht sporulierendes Stäbchen von einer Größe von 0,5 x 0,5-2 µm, das in einem breiten Temperaturbereich (0,5-45 °C) wachsen kann. *Listeria* ist taxonomisch in die Gruppe der Gram-positiven Bakterien mit niedrigem GC-Gehalt eingeordnet und ist dadurch eng verwandt mit *Bacillus*, *Brochothrix* und *Lactobacillus*. Die Gattung *Listeria* umfasst sechs Arten: *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, *L. innocua*, *L. welshimeri* und *L. grayi* (Rocourt, 1999). Von diesen sechs bekannten Arten gelten nur *L. monocytogenes* und *L. ivanovii* als infektiös, wobei *L. monocytogenes* human- und tierpathogen ist und *L. ivanovii* fast ausschließlich tierpathogen. Die übrigen Vertreter gelten als harmlose Saprophyten, auch wenn *L. seeligeri* und *L. welshimeri* in einigen wenigen Fällen als Erreger von humaner Listeriose isoliert wurden (Rocourt *et al.*, 1986).

Eine Infektion mit *L. monocytogenes* ist vor allem für Personen mit einem geschwächten Immunsystem gefährlich, wie beispielsweise für Schwangere, Neugeborene und ältere Menschen. Die Hauptinfektionsquelle sind kontaminierte Lebensmittel. Die Symptome einer Listeriose sind zunächst denen einer Influenza ähnlich, können sich allerdings zu einer Septikämie, einer Enzephalitis, einer Meningoenzephalitis und in manchen Fällen zu einer Gastroenteritis entwickeln, sowie bei Schwangeren zum Abort führen. Die Mortalitätsrate liegt bei über 20 %. Listeriose trat beim Menschen bislang nur sporadisch auf, erst in jüngster Zeit wurden kleinere Epidemien bekannt.

Die Virulenz und das pathogene Potential von *L. monocytogenes* im Menschen sind eng verbunden mit der Fähigkeit, sich im Laufe des Infektionszyklus in Geweben von Zelle zu Zelle auszubreiten und drei Barrieren zu durchbrechen: die Darmbarriere, die Blut-Hirn-Schranke und die Plazenta.

2.4.2 Infektionszyklus und Virulenzfaktoren

Listeria wird bevorzugt über kontaminierte Lebensmittel aufgenommen. Sobald die Bakterien den Magen aufgrund ihrer charakteristischen Säure-Toleranz nahezu unbeschadet passiert haben, adhären sie an Zellen im Darmbereich und dringen mittels induzierter Phagozytose in diese ein. Dabei ist unklar, ob *Listeria* wie *Salmonella* bevorzugt die M-Zellen der Peyer'schen Plaques am terminalen Ileum invadiert oder die Dünndarmepithelzellen (Jensen *et al.*, 1998; Racz *et al.*, 1972). Dem Invasionsschritt liegt anders als bei *Salmonella* und *Shigella* kein *trigger* Mechanismus zugrunde (Finlay *et al.*, 1991), sondern ein *zipper* Mechanismus. *Listeria* wird nicht wie *Salmonella* und *Shigella* nach der Induktion eines *membrane ruffling* durch Makropinozytose aufgenommen, sondern wird schrittweise von der Zellmembran umhüllt und dann in die Zelle aufgenommen (Isberg *et al.*, 1994; Swanson *et al.* 1995). Nach der Aufnahme in die Zelle befindet sich *Listeria* in einer Vakuole, dem Phagosom. Schon 30 Minuten später kommt es durch sekretierte bakterielle Proteine zur Lyse der Phagosomen-Membran, so dass die Bakterien frei im Zytosol der Wirtszelle vorliegen, wo sie beginnen, sich zu teilen. Trotz eines sehr minimalen intrazellulären Nährstoff-Angebots kann sich *Listeria* mit einer Generationszeit von ca. einer Stunde während dieser Phase des Infektionszyklus rasch vermehren. Gleichzeitig mit der Zellteilung kann man zunächst eine ungeordnete Rekrutierung von Wirtszell-Aktin beobachten, welches innerhalb von zwei Stunden zu einem polar angesiedelten Aktin-Schweif umorganisiert wird. Durch die ständige Polymerisation von Aktin am originären Ende des Schweifs wird die Bakterienzelle mit einer Geschwindigkeit von 0,3 $\mu\text{m}/\text{Sek}$ im Zytosol vorwärts geschoben (Tilney *et al.*, 1989). Erreicht *Listeria* mittels dieses Aktin-basierten Antriebs die Zellmembran, wird dort die Ausbildung pseudopodienartiger Ausstülpungen induziert, in

deren Spitzen sich die Bakterienzellen befinden. Aufgrund noch nicht bekannter Erkennungsmechanismen werden diese Membranausstülpungen von den kontaktierten Nachbarzellen phagozytiert. Diese als *spreading* bezeichnete Phase des *Listeria* Infektionszyklus kann bereits vier Stunden nach Infektion beobachtet werden. Nach der Abschnürung der Pseudopodien in die neu infizierten Zellen ist *Listeria* von einer Doppelmembran umgeben, welche ebenfalls lysiert wird, so dass die Bakterien erneut ins Wirtszell-Zytosol entkommen können, wo neue Zyklen von Replikation und Ausbreitung beginnen. Durch diesen Ausbreitungsmechanismus, der auch der Grund dafür ist, dass Antikörper bei einer Listeriose nicht protektiv sind, gelangt *Listeria* schließlich über Zellen der *Lamina propria* in die Blutbahn und von dort zu den primären Zielorganen Leber und Milz, wo Makrophagen einen großen Teil der Bakterienpopulation phagozytieren (Cossart *et al.*, 1989a). Verbleibende Bakterien replizieren in den Hepatozyten und breiten sich über den Blut-Kreislauf im gesamten Körper aus, wenn sie nicht zuvor durch eine T-Zell-vermittelte Immunantwort eliminiert wurden (Kaufmann 1993).

Dieser sehr komplexe, für *L. monocytogenes* charakteristische Lebensstil wird durch spezifische Virulenzfaktoren ermöglicht, die zum größten Teil in Form einer Pathogenitätsinsel auf dem Chromosom kodiert vorliegen (*Listeria pathogenicity island* LIPI-1) (Kreft *et al.*, 2002; Vazquez-Boland *et al.*, 2001). LIPI-1 umfasst einen Bereich von 9,6 kbps und kodiert neben drei noch unbekanntenen Genen (*orfX*, *orfZ* und *orfB*) die Gene *pfrA*, *plcA*, *hly*, *mpl*, *actA* und *plcB*. PrfA fungiert als positiver Master-Regulator und reguliert sowohl seine eigene als auch die Expression der anderen Gene von LIPI-1. Darüber hinaus kontrolliert es auch die Transkription von Virulenzgenen, die ausserhalb von LIPI-1 kodiert sind (*inlAB*-Operon, *inlC*, *hpt*, *bsh* u.a.). Nach oraler Aufnahme von *L. monocytogenes* wird die Invasion in die nicht-professionell phagozytierenden Zellen des Darmepithels bzw. in M-Zellen durch die bakteriellen Virulenzfaktoren InlA und InlB vermittelt, die Oberflächenproteine sind (Gaillard *et al.*, 1991). Neben diesen beiden gut charakterisierten Internalinen gibt es sieben weitere Internaline, deren Funktion im Infektionsgeschehen bislang noch nicht eindeutig geklärt ist (Engelbrecht *et al.*, 1996; Dramsi *et al.*, 1997; Raffelsbauer *et al.*, 1998). Für das Entkommen von *L. monocytogenes* aus dem Phagosom ist das porenbildende Zytotoxin Listeriolysin O (LLO) notwendig, das durch das Gen *hly* kodiert wird (Mengaud *et al.*, 1987; Cossart *et al.*, 1989b). Synergistisch mit der Phospholipase C PlcA bewirkt es die Lyse der Phagosomenmembran (Camilli *et al.*, 1993) und ermöglicht damit dem Bakterium den Eintritt ins Wirtszell-Zytosol. Parallel zur Vermehrung der Bakterien durch Zellteilung im Zytosol kommt es mit Hilfe des Aktin-Nukleator-Proteins ActA zur Polymerisierung von Aktin des Zytoskeletts der Wirtszelle (Domann *et al.*, 1992; Kocks *et al.*, 1992). Der wachsende Aktin-Schweif, an dessen wachsendem Pol sich die Bakterienzelle befindet, „schiebt“ das Bakterium

durch das Zytosol über die Zellgrenze hinweg, so dass auch die Nachbarzellen infiziert werden. Erneut kann *L. monocytogenes* mit Hilfe des hämolytischen Listeriolysins, der Phospholipase C PlcA und nun auch unter Beteiligung der Phospholipase C PlcB aus der doppelwandigen Vakuole entkommen. Die beiden Phospholipasen PlcA und PlcB unterscheiden sich durch ihre Substratspezifität: während PlcA spezifisch Phosphatidylinositol hydrolisiert, besitzt PlcB ein breites Substratspektrum und hydrolisiert die meisten Phospholipide, die in biologischen Membranen vorkommen (Vázquez-Boland *et al.*, 1992; Goldfine *et al.*, 1993). PlcB wird nach Ansäuerung der Vakuole durch die Metalloprotease Mpl und durch zelluläre Proteasen proteolytisch aktiviert (Marquis *et al.*, 1997).

Gen	Rolle in der Virulenz	Referenz	
<i>prfA</i> *	Positiver Regulationsfaktor A	Transkriptionsaktivator	Leimeister-Wachter <i>et al.</i> , 1990
<i>plcA</i> *	Phospholipase C	Lyse der Phagosomenmembran	Camilli <i>et al.</i> , 1993
<i>plcB</i> *	Phospholipase C	Lyse der Phagosomenmembran	Vázquez-Boland <i>et al.</i> , 1992
<i>hlyA</i> *	Listeriolysin	Lyse der Phagosomenmembran	Bielecki <i>et al.</i> , 1990
<i>mpl</i> *	Metalloprotease	Aktivierung von PlcB	Coffey <i>et al.</i> , 2000
<i>actA</i> *	Aktin-Nukleator-Protein	Zelle-zu-Zelle Ausbreitung	Kocks <i>et al.</i> , 1992
<i>inlA</i>	Internalin A	Aufnahme in die Zelle	Gaillard <i>et al.</i> , 1991
<i>inlB</i>	Internalin B	Aufnahme in die Zelle	Dramsi <i>et al.</i> , 1995

Tabelle 2: Übersicht über bekannte Virulenzfaktoren von *L. monocytogenes* (modifiziert nach Roberts *et al.*, 2003). *Virulenzgene, die in der Pathogenitätsinsel LIPI-1 kodiert werden.

Neben diesen wichtigen Virulenzfaktoren (siehe Tabelle 2), die die einzelnen Schritte des Infektionszyklus von *L. monocytogenes* gewährleisten und die *Listeria* spezifisch sind, ist eine Reihe weiterer Proteine für das Überleben und Vermehren im Zytosol einer eukaryontischen Zelle notwendig. Dies sind einerseits Proteine, die mehr oder weniger allgemeine *housekeeping* Funktionen inne haben und den Stoffwechsel während des intrazellulären, saprophytischen Lebensstils aufrecht erhalten. Hierzu zählen die Glucose-6-P-Translokase Hpt (Chico-Calero *et al.*, 2002) und die Proteine Fur und PerR, die die Aufnahme von Eisen katalysieren (Rea *et al.*, 2004). Andererseits sind es Proteine, die Stress-Mediatoren sind und Mechanismen für die Adaptation an die Abwehrmechanismen des Wirts auslösen. Zu dieser Kategorie gehören der Sigmafaktor B (Wiedmann *et al.*, 1998; Nadon *et al.*, 2002), die Clp Proteine (Rouquette *et al.*, 1996; Nair *et al.*, 1999; Nair *et al.*, 2000a; Gaillot *et al.*, 2000 u.a.) das Zwei-Komponenten-System LisRK (Cotter *et al.*, 1999) und die Hydrolase Bsh (Dussurget *et al.*, 2002). Diese virulenz-assoziierten Gene sind in Tabelle 3 zusammengestellt.

Gen		Rolle in der Virulenz	Referenz
<i>iap</i>	Invasion-assoziiertes Protein (p60)	Murein-Hydrolyse	Wuenscher <i>et al.</i> , 1993
<i>sigB</i>	Sigmafaktor B (σ^B)	Stress-Antwort	Wiedmann <i>et al.</i> , 1998
<i>hpt</i>	Glucose-6P-Translokase	Intrazelluläre Replikation	Chico-Calero <i>et al.</i> , 2002
<i>dfp</i>	Flavoprotein	DNA Synthese	Autret <i>et al.</i> , 2001
<i>clp</i> Gene	ClpC, ClpE, ClpP, CtsR	Stress-Antwort	Rouquette <i>et al.</i> , 1996
<i>lisRK</i>	Zwei-Komponenten-System	Säure-, Ethanol-Stress	Cotter <i>et al.</i> , 1999
<i>svpA</i>	<i>surface virulence-associated protein</i>	Intrazelluläre Replikation	Borezee <i>et al.</i> , 2001
<i>recQ</i>	DNA Helikase	DNA Reparatur	Autret <i>et al.</i> , 2001
<i>inl</i> Gene	Internaline	Aufnahme in die Zelle	Dramsi <i>et al.</i> , 1997
<i>p104</i>	Oberflächenprotein	Adäsion an die Zelle	Pandiripally <i>et al.</i> , 1999
<i>bsh</i>	Hydrolase	Intrazelluläre Replikation	Dussurget <i>et al.</i> , 2002
<i>srtA</i>	Sortase	Verknüpfung von Proteinen mit der Zellwand	Garandean <i>et al.</i> , 2002
<i>fur</i>	Regulator Fe ³⁺ Aufnahme	Intrazelluläres Wachstum	Rea <i>et al.</i> , 2004
<i>perR</i>	Regulator Fe ³⁺ Aufnahme	Intrazelluläres Wachstum	Rea <i>et al.</i> , 2004
<i>aut</i>	Autolysin	Aufnahme in die Zelle	Cabanes <i>et al.</i> , 2004

Tabelle 3: Übersicht über einige Virulenz-assoziierte Gene von *L. monocytogenes* (modifiziert und ergänzt nach Roberts *et al.*, 2003).

2.5 Zielsetzung

Das Ziel dieser Arbeit war, die Insertions-Duplikations-Mutagenese IDM als ein Verfahren zu etablieren, das es ermöglicht, im *high-throughput*-Format das Genom von sowohl Gram negativen als auch Gram positiven pathogenen Bakterien auf Gene zu untersuchen, die unter bestimmten Bedingungen für diese Keime essentiell sind. Es sollte exemplarisch an *S. typhimurium* gezeigt werden, dass IDM dazu eingesetzt werden kann, Gene zu identifizieren, die das essentielle Gen-Set für das Überleben der Bakterienzelle konstituieren. Darüber hinaus sollten mit Hilfe von IDM Gene von *L. monocytogenes* identifiziert werden, die für das Wachstum und die Replikation dieses Keims im Zytosol von eukaryontischen Zellen relevant sind.

3 Ergebnisse

3.1 Etablierung der Insertions-Duplikations-Mutagenese IDM

Es sollte ein Mutageneseverfahren etabliert werden, welches das Potential besitzt, ein bakterielles Genom saturierend zu mutagenisieren und das eine Alternative zur bisher häufig angewandten Transposonmutagenese (Fields *et al.*, 1986; Hensel *et al.*, 1995) darstellt. Da das Verfahren auf Gen-Knockout durch homologe Rekombination und Insertion beruht, wurde es Insertions-Duplikations-Mutagenese (IDM) genannt.

Die Grundlage dieser Mutagenese bildet ein Vektor, dessen Replikation von bestimmten Bedingungen abhängig und dadurch von außen steuerbar ist. Während ein solcher Vektor unter permissiven Bedingungen frei repliziert, ist seine Replikation unter nicht-permissiven Bedingungen inhibiert. Kloniert man in diesen konditional replizierenden Vektor chromosomale DNA-Fragmente des Wirtes, kommt es während der Wachstums- und Zellteilungsphase des Bakteriums zur Rekombination zwischen dem klonierten Fragment und dem homologen Locus auf dem Chromosom und folglich zur Insertion des Vektors ins Chromosom. Dadurch ist das Leseraster an dieser Stelle unterbrochen und das entsprechende Gen ausgeknockt.

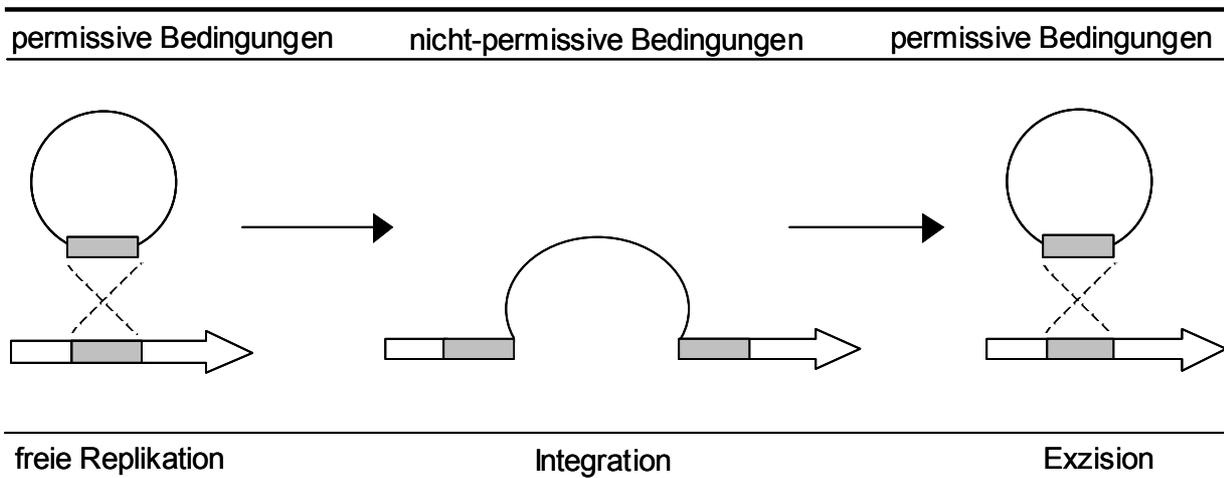


Abbildung 1: Rekombinationsereignisse in einem konditionalen Replikationssystem.

In einen konditional replizierenden Vektor wurde ein DNA-Fragment kloniert, das homolog (grau) ist zu einem Genlocus (Blockpfeil) des Empfängerstamms. Unter permissiven Replikations-Bedingungen repliziert der Vektor frei. Nach shift auf nicht-permissive Bedingungen wird die Rekombination zwischen den homologen Bereichen verstärkt induziert (gestrichelte Linien) und dadurch der Vektor ins Chromosom inseriert. Durch Wiederanlegen von permissiven Bedingungen kann die Integration wieder rückgängig gemacht werden. Der Vektor wird exzisiert.

Genotypisch betrachtet kommt es durch die homologe Rekombination auch zu einer Duplikation des mutierten Genbereiches, da gleichzeitig mit der Insertion des Vektors auch das homologe, klonierte Fragment inseriert wird. Durch Wiederanlegen von permissiven Bedingungen kann dieser Schritt jedoch rückgängig gemacht und der

Wildtyp-Genotyp wieder hergestellt werden. Abbildung 1 fasst als Schema das konditionale Replikationssystem zusammen.

In der Literatur beschriebene konditionale Replikationssysteme beruhen entweder auf An- und Abwesenheit eines essentiellen Replikationsproteins, wie beispielsweise dem durch *pir* kodierten Protein Pir (Miller *et al.*, 1988; Metcalf *et al.*, 1996) oder auf einem mutierten und dadurch Temperatur-sensitiven Replikationsprotein, wie beispielsweise dem RepA_{ts} Protein (Maguin *et al.*, 1992; Benjamin *et al.*, 1990). Der Vorteil des Temperatur-abhängigen Systems ist, dass durch shift der Temperatur von nicht-permissiven auf wieder permissive Bedingungen die Integration rückgängig gemacht werden kann, d.h. der Vektor exzidiert wird und dadurch eine schnelle Identifizierung des mutierten Locus in Form von Sequenzierung des homologen, klonierten Fragments möglich ist. Dieser Vorteil kommt vor allem dann zum Tragen, wenn mit einer Insertions-Mutantenbank gearbeitet werden soll und wenn diese Mutantenbank in ein Screening eingesetzt werden soll. Im *pir* System hingegen muss die Insertionsmutante von Interesse mit dem Replikationsprotein Pir aufwendig komplementiert werden (in Form von Transformation eines Pir kodierenden Plasmids), damit die Exzision des integrierten Plasmids induziert und das klonierte Fragment sequenziert werden kann. Da das Ziel dieser Arbeit das Screening verschiedener Mutantenbanken in verschiedenen Systemen war, wurde das Temperatur-abhängige Vektorensystem für die IDM Anwendung ausgewählt.

Ein in der Literatur für Gram-negative und Gram-positive Bakterien als funktional beschriebenes Temperatur-sensitives Replikationssystem ist des RepA_{ts} System (Maguin *et al.*, 1992; Benjamin *et al.*, 1990). Wildtypisches RepA kodiert für ein Replikationsprotein, das an den spezifischen Replikationsorigin ORI bindet und diesen dadurch aktiviert. Im Zuge der Zellteilung und -vermehrung repliziert der Vektor frei. RepA_{ts} hingegen ist an vier Positionen mutiert (Transitionen), so dass es bei nicht-permissiven Temperaturbedingungen zu einer Strukturveränderung von RepA_{ts} kommt, wodurch dieses nicht mehr an den Replikationsorigin binden kann. Die Replikation des Vektors ist in diesem Fall inhibiert. RepA_{ts} wurde durch Mutagenisierung des Plasmids pGK12 mit Hydroxylamin generiert und wurde ursprünglich von dem Plasmid pVE6007 (u.a.) kodiert. pVE6007 ist sowohl in Gram-negativen als auch Gram-positiven Bakterien funktional im Sinne von Temperatur-sensitiv, wobei die permissive Temperatur 30 °C beträgt, die nicht-permissive > 35 °C.

Da sich pVE6007 jedoch im *E. coli* Stamm EC101 (RepA⁺), der bei der IDM Mutagenese von *S. typhimurium* als Zwischenwirt dienen sollte, sehr instabil verhielt (Niesalla, 2002), wurde für das *S. typhimurium* Mutagenese-Plasmid eine Klonierungsstrategie verfolgt, die es vorsah, die RepA_{ts} Funktion (inklusive Promotor) aus pVE6007 in pORI(3) (T. M. Fuchs, unveröffentlicht) zu klonieren. Der daraus resultierende Vektor wurde pIDM1 genannt. pORI(3) kodiert den gleichen RepA ab-

hängigen Replikationsorigin wie pVE6007, sowie eine in Gram-negativen funktionale Tetracyclin-Resistenz.

Obwohl pVE6007 ursprünglich aus einem Gram-positiven Keim isoliert wurde, musste auch der direkte Einsatz dieses Plasmids für die Mutagenese des Gram-positiven Bakterien-Stammes *L. monocytogenes* verworfen werden, da auch in diesem Fall pVE6007-Konstrukte in einen *E. coli* Stamm als Klonierungs-Zwischenwirt hätten transformiert werden müssen. Außerdem wurde für *L. monocytogenes* bereits ein funktionales Temperatur-sensitives Vektorsystem beschrieben (Wuenscher *et al.*, 1990), auf welches dann zurückgegriffen wurde, als sich herausgestellt hatte, dass der für die IDM Mutagenese von *S. typhimurium* eingesetzte Vektor pIDM1 in Gram-positiven Keimen nicht funktional ist. Der RepF_{ts} kodierende *Listeria shuttle vector* pLSV1 wurde darüber hinaus schon gezielt zur Konstruktion von spezifischen Insertionsmutanten eingesetzt (Wuenscher *et al.*, 1990) und musste daher für die Anwendung von IDM auf *L. monocytogenes* nicht mehr modifiziert werden, sondern wurde lediglich optimiert. Wie RepA ist RepF ein für die Replikation des Plasmids essentielles Protein. Es ist verantwortlich für die Öffnung des positiven DNA-Stranges am Replikationsorigin (Villafane *et al.*, 1987). RepF_{ts} allerdings weist zwei Transitions-Mutationen auf und kann daher diese Funktion nicht mehr ausüben. pLSV1 kodiert neben RepF_{ts} einen RepF abhängigen Origin für die Replikation in Gram-positiven Bakterien, des weiteren einen Origin für die Replikation in Gram-negativen Bakterien und eine Erythromycin-Resistenz. Die Replikation von pLSV1 ist also nur im Gram-positiven Wirt von der Temperatur abhängig. Permissive Bedingungen sind 30 °C, nicht-permissive 42 °C.

3.1.1 Konstruktion geeigneter Vektoren

Für die Etablierung und Anwendung der IDM Mutagenese auf verschiedene Organismen musste also zunächst jeweils ein Vektor kloniert werden, der folgende Kriterien erfüllt:

Neben seines konditionalen Replikationsverhaltens sollte er eine Antibiotikumsresistenz für die Selektion aufweisen. Außerdem sollte er für die Klonierung der homologen DNA-Fragmente singuläre Restriktionsschnittstellen in Form einer *multiple cloning site* (mcs) kodieren. Hinzu kam eine effiziente Transformierbarkeit in den zu mutagenisierenden Wirt und in einen *E. coli* Klonierungs-Zwischenwirt. Ein sehr wichtiges Vektor-Kriterium war auch der Ausschluss illegitimer Rekombination, d.h. es musste gewährleistet sein, dass der Vektor ohne kloniertes, homologes Fragment nicht aufgrund eigener homologer Bereiche ins Chromosom integriert. Die Integration und dadurch der Gen-Knockout musste ausschließlich auf dem spezifischen, klonierten Fragment beruhen. Als letztes war es dann von Nöten, dass nach Klonierung eines solchen homologen Fragments eine Rekombinationsfrequenz

größer 10^{-6} gegeben ist, damit eine ausreichend große Anzahl an Mutanten generiert werden kann.

3.1.1.1 Klonierung eines konditional replizierenden Vektors für die Mutagenese von *S. typhimurium*: pIDM1

Für die Anwendung der Insertions-Duplikations-Mutagenese auf *S. typhimurium* wurde der temperatur-sensitive Vektor pIDM1 kloniert. Abbildung 2 stellt die Klonierungsstrategie im Überblick dar.

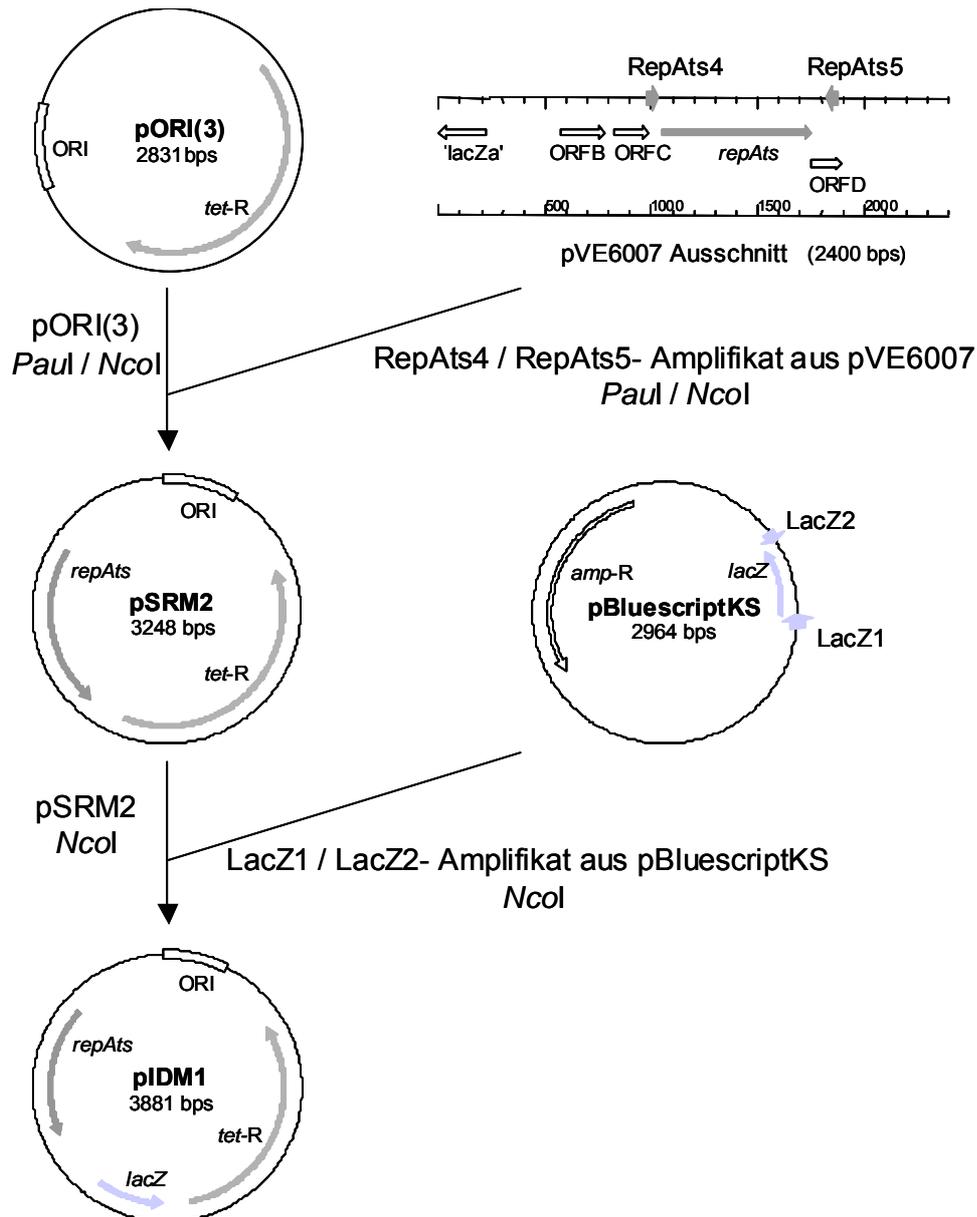


Abbildung 2: Klonierungsstrategie für die Konstruktion des konditional replizierenden Vektors pIDM1 für die Mutagenisierung von *S. typhimurium* 14028.

Hierfür wurde das Gen *repA_{ts}*, das für das Temperatur-sensitive Replikationsprotein RepA_{ts} kodiert, mit den Primern RepA_{ts}4 und RepA_{ts}5 aus dem Vektor pVE6007 (Maguin *et al.*, 1992) amplifiziert und über die Schnittstellen *Paul* und *Nco*I in

pORI(3) ligiert. Das Plasmid pORI(3) ist ein Derivat von pORI19, das durch den Austausch der Erythromycin-Resistenzkassette gegen die Tetrazyklinresistenzkassette von pBR322 entstanden ist (T. M. Fuchs, persönliche Mitteilung). In dieses Zwischenkonstrukt pSRM2 wurde dann zusätzlich die *multiple cloning site* (mcs) inklusive *lac* Promotor und *lacZ* Gen aus pBluescriptKS über eine künstliche *NcoI* Restriktionsstelle eingefügt (Primer lacZ1 und lacZ2).

3.1.1.2 Charakterisierung von pIDM1

Der Vektor pIDM1 ist 3881 bps groß und kodiert eine Tetrazyklinresistenz, welche die Selektion von Transformanten und Mutanten ermöglicht. Transformationsraten für *E. coli* Stämme liegen im Bereich von 5×10^3 - $2,4 \times 10^8$ Transformanten/ μg pIDM1 DNA. In Gram-positiven Bakterien ist er nicht funktional, wie durch Transformationsversuche in *B. subtilis* und *L. monocytogenes* herausgefunden werden konnte (Daten nicht gezeigt). Er weist eine mcs mit singulären Restriktionsstellen zu Klonierungszwecken und ein funktionales *lacZ* Gen auf. Die wichtigste Eigenschaft von pIDM1 ist jedoch sein konditionales, von der Temperatur abhängiges Replikationsverhalten in Gram-negativen Bakterien, das durch das Protein RepA_{ts} vermittelt wird. Die permissive Temperatur für pIDM1 ist 30 °C, die nicht-permissive 37-38,5 °C, was zunächst durch Ausstrichversuche bestätigt werden konnte: während bei 37 °C der mit pIDM1 transformierte *E. coli* Stamm DH5 α (RepA⁻) (DH5 α pIDM1) auf tetrazyklinhaltigen Agarplatten kein Wachstum zeigte, wuchsen *E. coli* EC101 (RepA⁺) pIDM1 Transformanten unter Tetrazyklin-Selektion bei ebenfalls 37 °C innerhalb von einem Tag heran. In beiden Fällen war bei 30 °C normales Wachstum zu verzeichnen, was bedeutet, dass das auf pIDM1 kodierte RepA_{ts} nachweislich bei 37 °C inhibiert ist und dass die Replikation des Plasmids und damit das Wachstum der Bakterien nur durch Komplementation mit wildtypischem RepA, wie es in dem Stamm EC101 der Fall ist, möglich ist.

Auch aus Flüssigkultur-Tests resultierte dieses Ergebnis: In regelmäßigen Abständen wurden aus zwei DH5 α pIDM1 Kulturen (LB-Medium ohne Tetrazyklin), die parallel bei 30 °C und 37 °C inkubiert wurden, Aliquots entnommen und auf LB-Platten mit und ohne Tetrazyklin (17,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) ausplattiert und bei 30 °C bzw. 37 °C inkubiert. Die Kulturen waren zuvor mit einer Zwischenkultur (LB +Tet 17,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 30 °C), die wiederum mit einer ÜNK (LB Tet 17,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 30 °C) angeimpft worden war, inokuliert worden. Es wurde deutlich, dass in der 30 °C Kultur die Anzahl der pIDM1 tragenden Zellen (auf LB Tet selektioniert) stets der Bakterien-Gesamtzahl (selektioniert auf LB) entsprach und zwar über einen Zeitraum von ca. acht Stunden hinweg. Nach 19 Stunden fiel der Anteil an plasmid-tragenden Zellen aufgrund mangelnder Antibiotikums-Selektion auf ca. 90 % der Gesamtzellzahl ab, was jedoch bedeutet, dass die pIDM1-Replikation bei 30 °C stabil verläuft. In der 37 °C Kultur allerdings nahm die Anzahl an tetrazyklin-resistenten Zellen schon nach 4 Stunden sehr stark

ab (52 % der Gesamtzellen) und sank nach 21 Stunden auf einen Wert von nahezu 0 %, so dass eindeutig gezeigt werden konnte, dass bei 37 °C die Plasmid-Replikation inhibiert ist.

Der Vektor pIDM1 wurde auch sequenziert. Dadurch konnten die oben genannten Eigenschaften wie die Tetrazyklin-Resistenz und die Gene *repA_{ts}* und *lacZ* bestätigt und die Situierung des Replikationsorigins und der diversen Restriktionsschnittstellen ermittelt werden. In Abbildung 3 ist die mit Hilfe des Clonemanager-Programmes erstellte Plasmidkarte abgebildet.

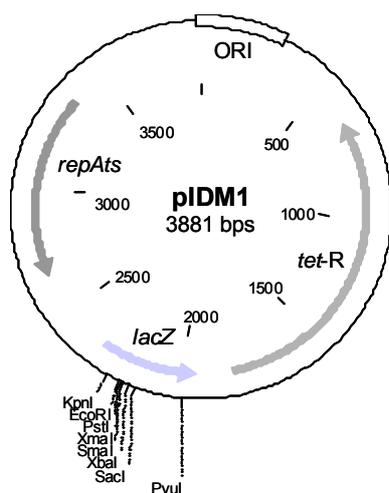


Abbildung 3: Plasmidkarte von pIDM1 mit Angabe der *multiple cloning site*.

Werden in pIDM1 DNA-Fragmente kloniert, die homolog sind zu einem chromosomalen Genlocus des Wirts, können nach einem shift der Temperatur von 30 °C auf 37 °C in Anwesenheit von Tetrazyklin sogenannte Integranen bzw. Insertionsmutanten selektioniert werden. Der Vektor pIDM1+Fragment ist in diesem Fall während der Wachstums- und Replikationsphase der Zellen bei 30 °C über homologe Rekombination in den spezifischen Genlocus ins Chromosom integriert und bleibt dort inseriert, so lange die Temperatur (37 °C) und das Tetrazyklin selektierend wirken. Die Synthese des von diesem Gen kodierten Proteins ist in diesem Fall inhibiert bzw. mangelhaft.

Illegitime Rekombination, d.h. zufällige Rekombination von pIDM1 ins Chromosom in Abwesenheit eines klonierten homologen Fragmentes, findet mit einer Wahrscheinlichkeit von kleiner als 1×10^{-7} statt, während die spezifische homologe Rekombination mit einer Häufigkeit zwischen $4,2 \times 10^{-4}$ und 2×10^{-2} auftritt und zwar in Abhängigkeit von der Größe des homologen, in den Vektor klonierten Fragments (Niesalla, 2002) und vom chromosomalen Locus selbst (Biswas *et al.*, 1993; Lee *et al.*, 1998). Diese Werte wurden spezifisch für pIDM1 ermittelt, indem einerseits für *S. typhimurium* mit pIDM1 (Stamm 14028 pIDM1) und andererseits für 66 unterschiedliche *S. typhimurium* Klone mit pIDM1+Fragment (Stämme 14028 pIDM1+Fragment) die *integration rate per cell* (IPC) bestimmt wurde.

Dass die Integration von pIDM1 durch homologe Rekombination sehr spezifisch und vor allem temperatur-induziert ist, konnte mittels PCR für *S. typhimurium* exemplarisch am Genlocus *phoP* gezeigt werden. Aus *phoP* wurde ein intragenisches Fragment amplifiziert und über *KpnI* in pIDM1 ligiert. Wie unter 3.2.1, Seite 38, beschrieben, wurde dann ausgehend von der *S. typhimurium* Transformante 14028 pIDM1-*phoP'* die *phoP* Insertionsmutante 14028::*phoP'*-pIDM1 generiert. Mit Hilfe von zwei verschiedenen Primerkombinationen, die entweder den Zustand von frei replizierendem (plasmid-bindende Primer LacZ1 und SRMgb2) oder aber von integriertem Plasmid (ein plasmid- und ein chromosomal bindender Primer: LacZ1 und PhoP3) abbilden, wurden dann die beiden *S. typhimurium* Stämme 14028 pIDM1-*phoP'* (angezogen bei 30 °C, d.h. Plasmid in trans) und 14028::*phoP'*-pIDM1 (angezogen bei 37 °C, d.h. Plasmid integriert) untersucht. Es zeigte sich eindeutig, dass bei nicht-permissiver Temperatur keine freie Replikation von pIDM1-*phoP'* möglich ist und daher nur chromosomal im *phoP* Gen integriertes Plasmid amplifiziert werden kann (siehe Abbildung 4).

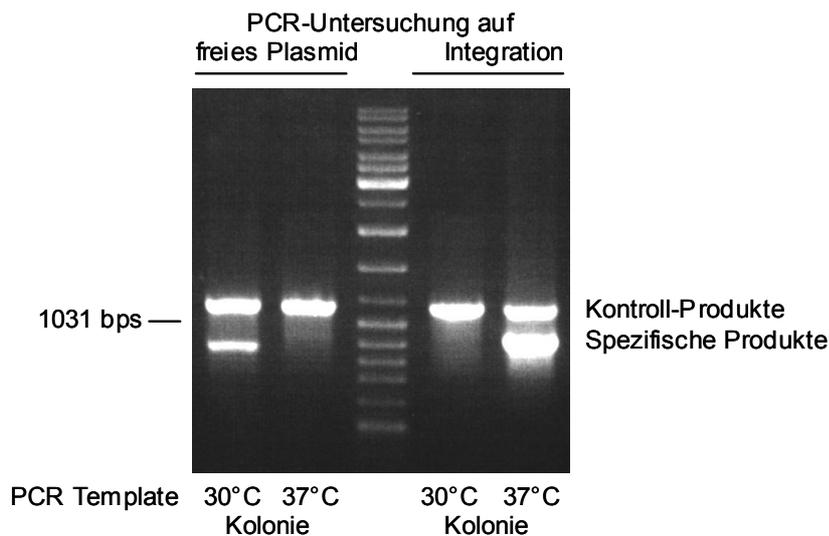


Abbildung 4: Gelelektrophoretische Auftrennung der Produkte der PCR-Untersuchung von 14028 pIDM1-*phoP'* (Plasmid in trans, 30 °C Kolonie) und 14028::*phoP'*-pIDM1 (Plasmid integriert, 37 °C Kolonie). Für den PCR-Test auf freies Plasmid wurden die plasmid-ständigen Primer LacZ1 und SRMgb2 verwendet, für den Nachweis von integriertem Plasmid der plasmid-bindende Primer LacZ1 und der chromosomal bindende Primer PhoP3. Als Positiv-Kontrolle wurden die gleichen *templates* mit den chromosomal in *aroA* bindenden Primern AroAfor1 und AroArev1 amplifiziert.

Für den Nachweis, dass ein negatives PCR-Ergebnis (wie im Falle von u.a. der PCR-Untersuchung einer Integrierten mit Primern, die nur Plasmid in trans abbilden) nicht dadurch zustande kam, dass kein *template* eingesetzt wurde, wurde immer ein Kontrollansatz mitgeführt. Hierfür wurde mit einem ausschließlich chromosomal bindenden Primerpaar (AroAfor1+AroArev1) ein DNA-Fragment *down-* oder *upstream* des Insertionslocus amplifiziert. Das Gelfoto zeigt eindeutig, dass in jedem der PCR-Ansätze DNA als *template* vorhanden war und folglich ein negatives PCR-

Ergebnis darauf zurückzuführen ist, dass die oben genannten spezifischen Primerkombinationen ganz spezifische Situationen und Ereignisse von pIDM1 abbilden.

3.1.1.3 Klonierung eines konditional replizierenden Vektors für die Mutagenese von *L. monocytogenes*: pLSV101

Für die Mutagenisierung von *L. monocytogenes* durch IDM wurde das für Gram-positive Bakterien spezifische Plasmid pLSV1 (Wuenscher *et al.*, 1990) modifiziert. Hierfür war es notwendig, pLSV1 zunächst zu sequenzieren. Ausgehend von der bekannten Sequenz im Bereich der mcs wurde ein spezifischer Sequenzierprimer generiert, mit dem zunächst ein Bereich von ca. 500 bps sequenziert wurde. Diese Sequenz diente dann als Ausgangspunkt für die nächste Sequenzierung. Durch stufenweise Sequenzierungsreaktionen wurde schließlich die Gesamt-Sequenz von pLSV1 ermittelt (Fa. BioLux, Stuttgart).

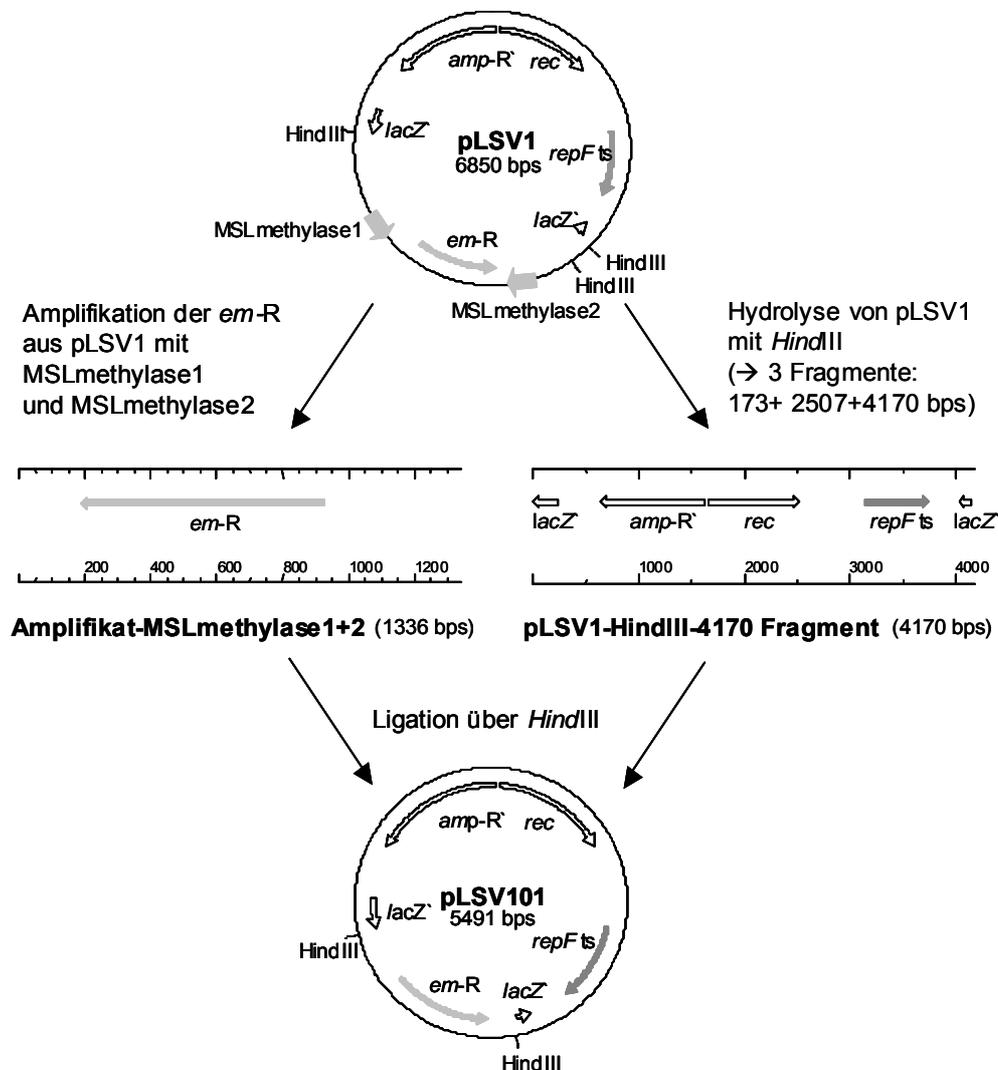


Abbildung 5: Klonierungsstrategie für die Konstruktion des konditional replizierenden Vektors pLSV101 für die Mutagenisierung von *L. monocytogenes* EGD, basierend auf einer Verkleinerung von pLSV1.

Für die Konstruktion des Plasmids pLSV101, das eine verkleinerte Version von pLSV1 darstellt, wurde dann die Methylase, die die Erythromycin-Resistenz (*em-R*) vermittelt, aus pLSV1 mit den Primern MSLmethylase1 und MSLmethylase2 amplifiziert und mit *HindIII* geschnitten. Parallel wurde pLSV1 ebenfalls mit *HindIII* hydrolisiert, so dass 3 Fragmente der Länge 173 bps, 2507 bps und 4170 bps entstanden. Das 4170 bps lange Fragment, das neben dem Replikationsorigin für Gram-negative Bakterien auch den Replikationsorigin für Gram-positive Bakterien und das Replikationsprotein RepF_{ts} kodiert, wurde aufgereinigt und mit dem Methylase-kodierenden Fragment ligiert. Eine schematische Darstellung dieser Klonierung zeigt Abbildung 5.

3.1.1.4 Charakterisierung von pLSV101

Der Vektor pLSV101 ist 5492 bps groß und ist ein Derivat des Temperatursensitiven, 6850 bps großen Vektors pLSV1 (Wuenschel *et al.*, 1990). pLSV101 kodiert neben den nicht funktionalen Genresten einer Ampicillin-Resistenz und von *lacZ* eine funktionale Methylase, die eine Resistenz gegen Erythromycin vermittelt. Transformationsraten von pLSV101 liegen für *E. coli* Stämme im Bereich 1×10^7 - 4×10^8 cfu/ μ g DNA, für *L. monocytogenes* im Bereich 2 - 5×10^2 cfu/ μ g DNA. Das Temperatur-abhängige Replikationsverhalten in Gram-positiven Bakterien wird durch das Replikationsprotein RepF_{ts} kodiert. Durch Ausstrichversuche konnte ermittelt werden, dass die nicht-permissive Temperatur für pLSV101 in *L. monocytogenes* EGD bei >42 °C liegt. Bei dieser Temperatur wuchsen auf BHI Agar-Platten mit Erythromycin (5 μ g/ml) keine Einzelkolonien von EGD pLSV101 an, wohingegen der Wildstamm EGD starkes Wachstum zeigte. In Flüssigkultur-Tests wurde das Temperatur-abhängige Replikationsverhalten von pLSV101 noch genauer untersucht. Eine bei permissiver Temperatur mit Erythromycin angezogene ÜNK von EGD pLSV101 wurde 20fach verdünnt und bei 30 °C mit Antibiotikum bis zu einer Populationsdichte von $OD_{550}=0,28$ zwischengezüchtet. Dann wurde eine Kultur angeimpft (20fach) und ohne Antibiotikumsselektion bei 42 °C schüttelnd inkubiert. Aus dieser wurden stündlich Aliquots entnommen und in verschiedenen Verdünnungsstufen auf BHI Agar-Platten mit und ohne Erythromycin ausplattiert und bei 42 °C gelagert. So konnte ein Abbild davon gewonnen werden, wie divers die Population in der 42 °C Kultur im Zeitverlauf ist: es konnte unterschieden werden zwischen replikations-defizienten, da pLSV101-tragenden Zellen (selektioniert auf BHI Em 42 °C) und Zellen, die pLSV101 sekretiert haben und dadurch replizieren können (selektioniert auf BHI 42 °C). Parallel dazu wurden aus der gleichen Kultur Aliquots auf BHI Agarplatten mit und ohne Erythromycin ausplattiert. Diese wurden bei 30 °C inkubiert und gaben dadurch Aufschluss über die Gesamtzahl an lebenden Bakterien (selektioniert auf BHI 30 °C) und die Anzahl an pLSV101-tragenden Zellen (selektioniert auf BHI Em 30 °C). Es konnten zu keinem Zeitpunkt auf der BHI Em

42 °C Platte lebende Kolonien selektioniert werden, was bedeutet, dass pLSV101 bei 42 °C nicht replizieren kann, wohingegen Zellen, die das Plasmid segregiert haben bzw. dessen Kopienzahl während der Zellteilung schließlich bis auf null Kopien/Zelle ausgedünnt haben, bei 42 °C wachsen und sich vermehren können.

Wie für pIDM1 wurde auch für das Mutageneseplasmid pLSV101 die Sequenz ermittelt. Da das Ausgangs-Plasmid pLSV1 bereits sequenziert worden war, konnte für pLSV101 die Sequenz im Clonemanager konstruiert werden. Diese wurde durch Restriktions- und PCR-Analysen verifiziert (Daten nicht gezeigt) und ist in Abbildung 6 als Plasmidkarte dargestellt. Durch das Erstellen dieser Plasmidkarte konnte auch die mcs definiert werden.

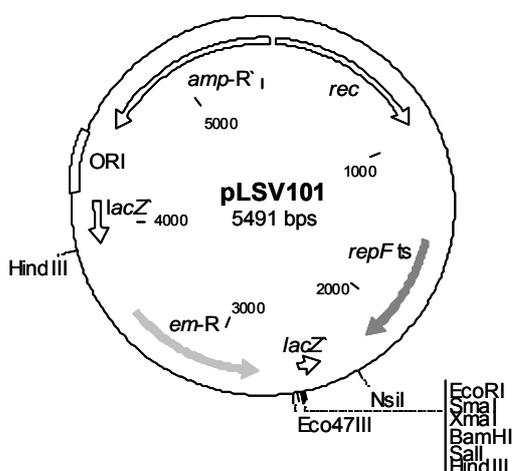


Abbildung 6: Plasmidkarte von pLSV101 mit Angabe der *multiple cloning site*.

Wie bereits in den Vektor-Anforderungen für eine IDM Anwendung angeführt (siehe 3.1, Seite 22), ist es ein wichtiges Kriterium, dass der Vektor nicht ins Chromosom integrieren kann, ohne dass ein zum Wirt homologes Fragment kloniert wurde. Für pLSV101 kann eine solche illegitime Rekombination ausgeschlossen werden, wie durch negative Integrationsversuche mit EGD pLSV101 gezeigt werden konnte. Hierfür wurde in 8 unabhängigen Ansätzen eine Einzelkolonie von EGD pLSV101 in 1 ml BHI Medium suspendiert und es wurden 50 µl dieser Suspension auf BHI Agar-Platten mit Erythromycin (5 µg/ml) ausplattiert und diese bei 42 °C inkubiert. Es wuchsen auch nach mehreren Tagen keine Kolonien heran.

Kloniert man hingegen kurze, homologe DNA-Fragment in pLSV101, erhält man mit einer Häufigkeit von $1,5 \times 10^{-4}$ – 3×10^{-6} Integrationsmutanten. Diese Werte wurden durch Bestimmung der IPC für 12 unabhängige Klone EGD pLSV101+Fragment im Vergleich zu EGD pLSV101, wie unter 3.2.1 auf Seite 38 beschrieben, ermittelt. Dabei konnte keine Abhängigkeit der Integrationsrate von der Länge des Fragments festgemacht werden.

Der Nachweis, dass die Integration spezifisch in den homologen Locus erfolgt ist, konnte wieder mittels PCR am Beispiel von *inIC* erbracht werden. Aus *L. monocytogenes* EGD wurde mit den Primern inIC1 und inIC2, die beide am

5' Ende eine *EcoRI* Schnittstelle kodieren, ein 928 bps großes, intragenisches Fragment aus *inIC* amplifiziert. Dieses Produkt wurde mit *EcoRI* hydrolysiert, woraus ein 382 bps großes und ein 536 bps großes Fragment resultierte. Beide *inIC* Fragmente wurden jeweils über *EcoRI* in pLSV101 ligiert und nach Isolation aus *E. coli* XL2-blue in *L. monocytogenes* EGD transformiert. Für die Integration wurde wie für die Bestimmung der IPC eine Einzelkolonie von EGD pLSV101-*inIC*'-lang bzw. EGD pLSV101-*inIC*'-kurz in 1 ml BHI Medium gelöst und 1/20 davon auf eine Erythromycin-haltige BHI Agar-Platte ausgebracht, die dann wiederum für 2 Tage bei 42 °C gelagert wurde. Nach mehreren Passagen unter Erythromycin Selektion bei 42 °C wurde die Exzision durch Ausstreichen mehrerer unabhängiger Einzelkolonien auf BHI-Platten mit Erythromycin, die nun bei 30 °C inkubiert wurden, induziert. Auch die so generierten Exzisanten wurden mehrmals passagiert, bevor sie dann zusammen mit dem Ausgangs-Transformanten-Klon (Plasmid in trans) und der entsprechenden Integrate in einer PCR untersucht wurden. Für pLSV101-*inIC*'-lang ist das Ergebnis der PCR in Abbildung 7 ersichtlich.

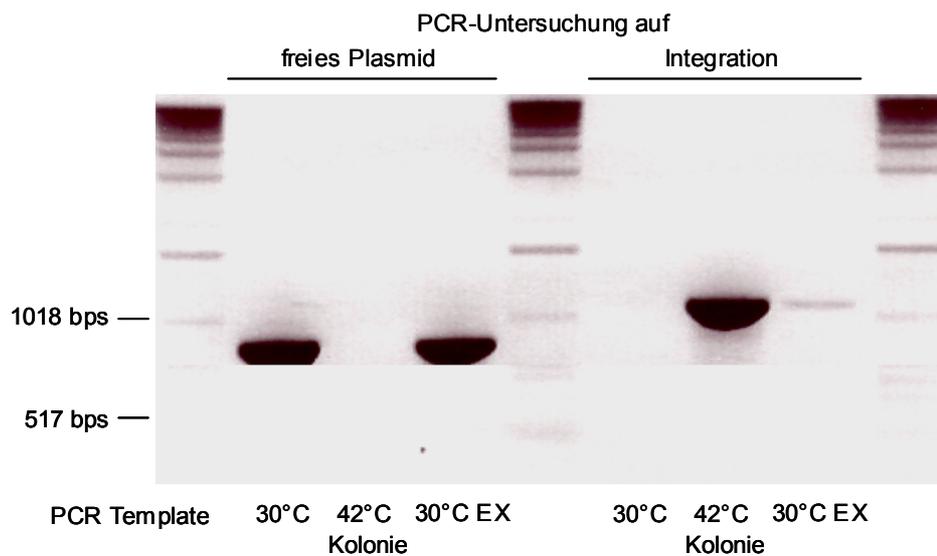


Abbildung 7: Gelelektrophoretische Auftrennung der Produkte der PCR-Untersuchung von *L. monocytogenes* EGD pLSV101-*inIC*'-lang (Plasmid in trans, 30 °C Kolonie), EGD::*inIC*'-lang-pLSV101 (Plasmid integriert, 42 °C Kolonie) und EGD pLSV101-*inIC*'-lang EX (Plasmid wieder in trans, 30 °C Kolonie). Für den PCR-Test auf freies Plasmid wurden die plasmid-ständigen Primer LSV3 und LSV-4380rev verwendet, für den Nachweis von integriertem Plasmid der plasmid-bindende Primer LSV3 und der chromosomal bindende Primer LM1. Die zu erwartenden Produkte sollten 861 bps bzw. 1111 bps groß sein. EX= exzisiert.

Mit der Primerkombination LSV3 und LSV-4380rev wird nur dann ein PCR-Produkt amplifiziert, wenn das Plasmid in trans vorliegt (d. h. vor Integration und nach Exzision), da beide Primer ausschließlich im Plasmid hybridisieren. Im Gegensatz dazu bildet die Primerkombination LM1 und LSV3 nur integriertes Plasmid ab, weil LM1 außerhalb von *inIC* auf dem Chromosom bindet. Als *template* für die PCR wurde jeweils eine Einzelkolonie der Transformante (EGD pLSV101-*inIC*'-lang), der

Integrante (EGD::*inIC*-lang-pLSV101) und der Exzisante (EGD pLSV101-*inIC*-lang EX) eingesetzt. Es ist klar zu erkennen, dass mit den Primern für freies Plasmid nur mit der Transformante und der Exzisante ein Produkt generiert werden konnte, während eine Integration ausschließlich in der Integranten abgebildet wurde.

Da die *L. monocytogenes* Insertions-Mutanten auch im Zellkultur-System analysiert werden sollten, wurde die Stabilität der spezifischen pLSV101-Integration exemplarisch an *inIC* untersucht. Hierfür wurde die Integrante EGD::*inIC*-lang-pLSV101 in einer ÜNK in BHI Medium mit Erythromycin (5 µg/ml) bei 42 °C angezogen, dann 20fach verdünnt (BHI Em5, 42 °C) und bis zum Erreichen einer Optischen Dichte von OD₅₅₀=0,3 zwischengezüchtet. Von dieser Zwischenkultur wurde 1 ml in 19 ml BHI Medium ohne Erythromycin inokuliert und die Inkubationstemperatur auf 37 °C verringert. Durch stündliches Ausplattieren von verschiedenen Verdünnungsstufen auf Agar-Platten mit und ohne Erythromycin, die wiederum bei 30 °C und 42 °C inkubiert wurden, konnte verfolgt werden, wie schnell sich in dieser Kultur ohne Antibiotikums- und Temperatur-Selektion die Anzahl an Integranten verringert. Die auf Erythromycin-Platten bei 42 °C selektionierten cfu repräsentierten den Anteil an stabilen Integranten und wurden verglichen mit der Bakterien-Gesamtzahl pro ml Kultur, die auf den Erythromycin-freien Platten bei 30 °C ermittelt worden war.

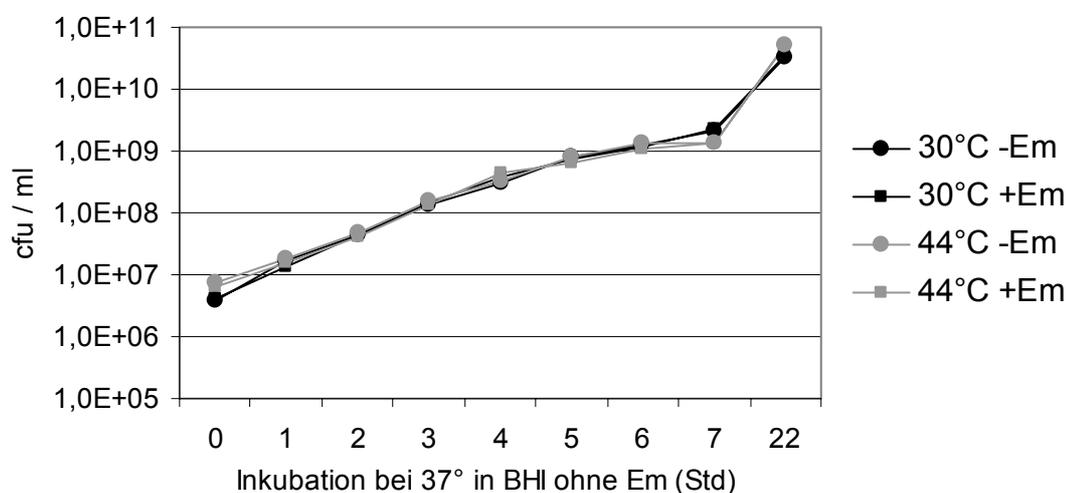


Abbildung 8: Grafische Darstellung der Untersuchung der Stabilität der Insertion von pLSV101-*inIC* im *inIC* Genlocus von *L. monocytogenes* EGD ohne Temperatur- und Antibiotikumsselektion. Die Integrante EGD::*inIC*-pLSV101 wurde zunächst bei 42 °C in BHI Em5 angezogen und dann auf 37 °C BHI geschiftet. Stündlich wurden Aliquots aus der 37 °C BHI Kultur von EGD::*inIC*-pLSV101 auf BHI Agarplatten mit und ohne Em5 ausplattiert, die dann jeweils bei 30 °C und 42 °C inkubiert wurden, um die Anzahl an stabilen Integranten (auf BHI Em5 42 °C) im Vergleich zur Bakterien-Gesamtzahl (auf BHI 30 °C bzw. 42 °C) zu ermitteln. Die einzelnen Kurven zeigen auf, wie viele cfu pro ml Aliquot aus der 37 °C BHI Kultur unter den verschiedenen Selektionsbedingungen angewachsen sind.

Wie aus Abbildung 8 ersichtlich ist, entsprach bis zu einem Zeitwert von 22 Stunden die Integrantenzahl stets der Bakterien-Gesamtzahl, was die Integration im *inIC* Locus als sehr stabil definieren lässt. In einem weiteren, unabhängigen Versuch

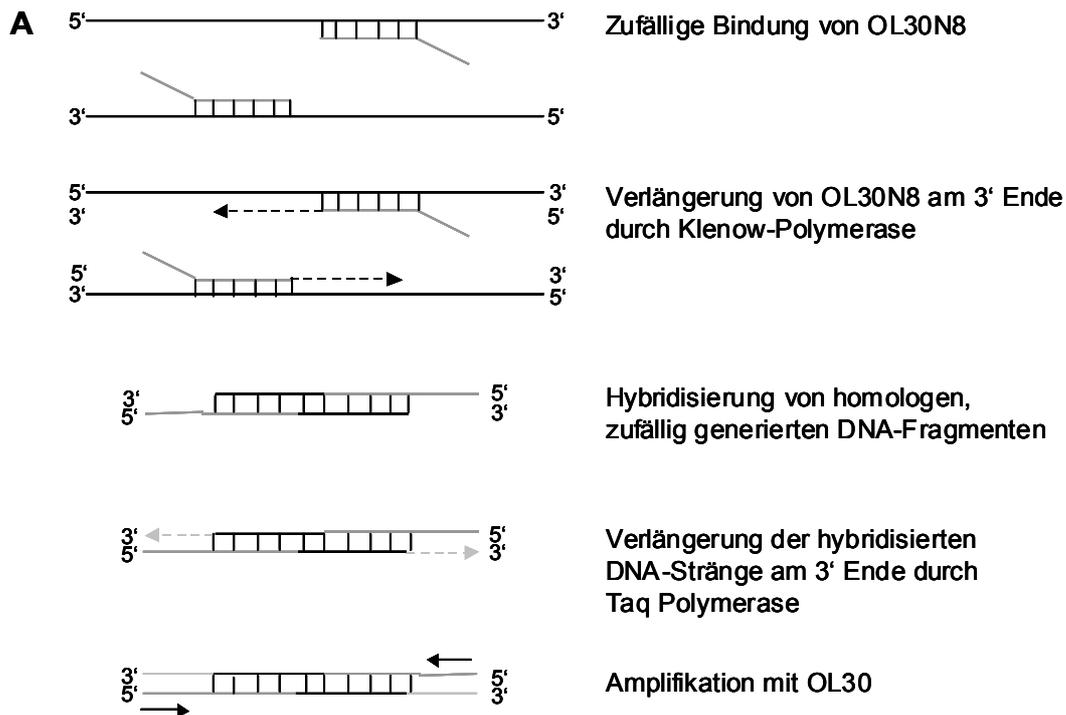
konnte gezeigt werden, dass sogar bis 26 Stunden nach shift auf nicht-selektive Bedingung die *in/C* Integration erhalten blieb. Ab 30 Stunden nach diesem shift sind nur noch 50 % der Bakterienzellen Integrierten. D.h. 50 % der Population haben das Plasmid zwar nicht mehr integriert, jedoch liegt es noch in trans vor (Exzisanten), erkennbar an den cfu/ml, die auf Erythromycin-Platten bei 30 °C angewachsen sind. Nach 53 Stunden sinkt der Anteil an Integrierten auf 17 % ab.

3.1.2 Konstruktion von Fragmentbanken

DNA-Fragmente für die Klonierung einer Gen- bzw. Fragmentbank können prinzipiell nach zwei verschiedenen Methoden generiert werden. Die erste Methode sieht das Generieren der Fragmente mit Hilfe von Polymerasen und unspezifischen Oligonukleotiden vor, die eine nicht-definierte Abfolge von mehreren bps beinhalten (Froussard, 1992). Die andere Methode basiert auf Scherung und Aufbrechen chromosomaler DNA (Lee *et al.*, 1999).

3.1.2.1 Konstruktion einer Fragmentbank von *S. typhimurium* in pIDM1

Für die Generierung von chromosomalen Fragmenten für die Klonierung einer Genbank von *S. typhimurium* 14028 in den Mutagenesevektor pIDM1 wurde das Protokoll von Froussard (1992) modifiziert. Das Protokoll basiert auf dem zufälligen *Annealing* eines Gemischs aus *wobble* Primern an gescherte DNA, wobei sich am 5' Ende dieser Primer die gleichen 21 bekannten Basenpaare befinden, während ihr 3' Ende ein Oktamer von nach dem Zufallsprinzip generierten, unbekanntem Oligonukleotiden aufweist (OL30N8). Mit dem Klenow-Enzym werden die Primer am 3' Ende verlängert, so dass längere DNA-Fragmente entstehen, die mit homologen Fragmenten hybridisieren können. Durch Zugabe von Taq-Polymerase werden die überstehenden Enden des Hybridisierungsprodukts aufgefüllt. In einer nachfolgenden PCR mit dem *wobble primer* ohne random 3' Ende (OL30) werden die doppelsträngigen, verschieden langen Hybridisierungsprodukte amplifiziert.



B 5' AAGTCGACGGATCCGGTACCTNNNNNNNN 3' OL30N8
 5' AAGTCGACGGATCCGGTACCT 3' OL30

Abbildung 9: (A) Schema der Generierung von zufälligen DNA-Fragmenten für die Konstruktion einer Fragmentbank von *S. typhimurium* 14028 in pIDM1. (B) Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide OL30N8 und OL30 mit Angabe der *KpnI*-Schnittstelle, über die die nach dem Zufallsprinzip generierten Fragmente nach Gel-Elution in pIDM1 kloniert wurden.

Nach Generierung von *S. typhimurium* 14028 Fragmenten nach diesem Protokoll mit dem *wobble* Primer OL30N8 in 70 unabhängigen Klenow-Reaktionen und der anschließenden Amplifikation mit Primer OL30 wurden diese in einer präparativen Agarosegel-Elektrophorese ihrer Länge nach aufgetrennt und es wurde der Bereich 450–500 bps ausgeschnitten. Nach Hydrolyse mit der Restriktionsendonuklease *KpnI* und anschließender Phenol-Chloroform-Extraktion, wurden die DNA-Fragmente in den ebenfalls *KpnI* gespaltenen und dephosphorylierten Vektor pIDM1 ligiert. In mehreren Test-Ligationen konnte festgestellt werden, dass die Ligationseffizienz auf bis zu 90% gesteigert werden kann, wenn ca. 100 ng Vektor-DNA mit 150-200 ng Fragment-DNA ligiert werden und die Ligation selbst für 2,5 Std bei 24 °C inkubiert wird. Ebenfalls eine Erniedrigung des Anteils an religiertem Vektor, d.h. an Vektor in den kein Fragment ligiert wurde, erbrachte eine an die Ligation anschließende Fällung mit PEG. Die Transformation in den *E. coli* Helferstamm EC101 erfolgte durch Elektroporation von 2 µl DNA-Suspension. Die Transformationsansätze wurden schüttelnd für 60 Min bei 30 °C zwischengezüchtet, bevor sie dann auf LB Agarplatten mit Tetrazyklin (17,5 µg/ml) ausplattiert und für zwei Tage bei 30 °C inkubiert wurden. Aus einer solchen Elektroporation resultierten durchschnittlich

$1,0 \times 10^3$ Transformanten pro ml. 170-450 dieser *E. coli* Klone wurden in Pools zusammengefasst und in 300 μ l Lösung I des *GFX Micro Plasmid Preparation Kits* gelöst und anschließend aus ihnen pIDM1+Fragment im Minimaßstab isoliert. Insgesamt wurde aus 28000 *E. coli* Klonen Plasmid in Pools isoliert. Bei der Transformation dieser Plasmidpools in *S. typhimurium* 14028 wurde ca. 300 ng Plasmidpool-DNA elektroporiert und die nach zwei Tagen bei 30 °C auf tetrazyklinhaltigen LB Agarplatten gewachsenen Fragmentbank Klone wurden einzeln in 96-well-Mikrotiterplatten in LB Medium mit 17,5 μ g/ml Tetrazyklin bei 30 °C üN hochgezogen und dann mit 20 % Glycerin bei -80 °C eingelagert, wobei zur Vermeidung von Redundanz statt 28000 nur 14000 *S. typhimurium* Transformanten gepickt und eingefroren wurden. Tabelle 4 gibt eine Übersicht über die einzelnen Schritte.

Klenow	1 μ M OL30N8	94 °C 1 Min ohne Klenow-Enzym
Reaktion	1x Klenow-Puffer	25 °C 5 Min (ohne Klenow)
	200 μ M dNTPs	Zugabe Klenow-Enzym
	1,25 U Klenow-Enzym	37 °C 120 Sek
	400 ng chromosomale DNA	
	dH ₂ O ad 20 μ l	

Säulenchromatographische Aufreinigung des Ansatzes

PCR	1x PCR Puffer	95 °C 1 Min, 50°C 1 Min, 72 °C, 2 Min: 1x
	200 μ M dNTPs	Zugabe OL30
	2,5 U Taq Polymerase	94 °C 40 Sek, 64 °C 45 Sek, 72 °C 1 Min: 10x
	10 μ l eluierte Klenowfragmente	94 °C 35 Sek, 60 °C 45 Sek, 72 °C, 1 Min: 25x
	dH ₂ O ad 50 μ l	
	3,2 μ M OL30	

Präparative Gel-Elektrophorese, Elution des Bereiches 450-550 bps aus dem Gel

*Kpn*I Hydrolyse der eluierten Fragmente

Phenol-Chloroform-Aufreinigung der Fragmente

Ligaton der Fragmente in *Kpn*I gespaltenen, dephosphorylierten Vektor

Transformation in *E. coli*

Isolation von Vektor+Fragment aus *E. coli* in Pools

Transformation von Vektor+Fragment in Pools in *S. typhimurium*

Einlagerung der *S. typhimurium* Fragmentbank-Klone in -80 °C

Tabelle 4: Protokoll der Generierung der *S. typhimurium* Fragmente für die Erstellung einer Fragmentbank in pIDM1.

3.1.2.2 Konstruktion einer Fragmentbank von *L. monocytogenes* in pLSV101

Bei der Konstruktion einer Fragmentbank von *L. monocytogenes* EGD wurde mit einigen Modifikationen nach dem Protokoll von Lee *et al.* vorgegangen (Lee *et al.*, 1999). DNA-Fragmente werden hierbei nicht per Random-PCR generiert, sondern durch Scherung chromosomaler DNA durch Ultraschall. Dadurch kann die Varianz der Genbank gesteigert werden, da kein PCR-Schritt in die Fragmentgenerierung involviert ist, bei dem durch Bindepräferenzen bestimmte DNA-Bereiche stärker amplifiziert werden als andere. Anders als im Scherungsprotokoll von Lee *et al.* beschrieben, wurden die Enden der so entstandenen DNA-Fragmente nicht mit T4 Polymerase oder Klenow-Enzym getrimmt, um dann blunt in einen Vektor kloniert zu werden, sondern sie wurden *Mbol* hydrolisiert und dann über die *Mbol* kompatible *Bam*HI Schnittstelle in pLSV101 ligiert.

Zunächst wurde 1 µg chromosomale DNA von *L. monocytogenes* PKP1 in 1 ml *Sonication buffer* suspendiert. Diese DNA-Lösung wurde dann durch einen Sonicator mit 50 % Leistung 3 Mal für 30 Sek mit Ultraschall beschallt, wobei der Ansatz stets kühl auf Eis gehalten wurde. Nach Fällung der so entstandenen DNA-Fragmente mit Ethanol wurden diese für 60 Min mit *Mbol* (= *Sau*3A) verdaut und auf einem Agarosegel aufgetrennt. Der Gelbereich, der DNA-Fragmente der Länge 300–700 bps enthielt, wurde ausgeschnitten, die DNA elektroeluiert und anschließend in einer Phenol-Chloroform-Extraktion aufgereinigt. Parallel hierzu wurde der Vektor pLSV101 mit *Bam*HI hydrolisiert. Nach Dephosphorylierung der Vektor-DNA wurden Fragmente (ca. 250 ng) und Vektor (ca. 100 ng) über Nacht ligiert und dann mit PEG gefällt. Insgesamt wurden 16 Ligationen nach diesem Protokoll durchgeführt, so dass nach Elektroporation dieser Ansätze in den *E. coli* Klonierungszwischenwirt XL2-blue 3658 Transformanten generiert werden konnten. Diese wurden gepoolt (ca. 60–380 Transformanten/Pool) und aus ihnen wurde Vektor+Fragment im Minimaßstab präpariert. Diese Plasmid-Pool-DNA wurde dann in *Listeria monocytogenes* EGD durch Elektroporation in 37 unabhängigen Transformationsansätzen transferiert, wobei 300 ng DNA auf 250 µl kompetente Zellen eingesetzt wurden. Die Transformationsrate betrug dabei durchschnittlich 5×10^2 cfu/µg DNA. Die Selektion der *Listeria* Fragmentbank-Klone fand auf BHI Agarplatten mit 5 µg/ml Erythromycin und bei 30 °C statt. Anschließend wurden in 36 Microtiterplatten à 96 wells in BHI mit 5 µg/ml Erythromycin 3648 *L. monocytogenes* EGD Fragmentbank-Klone, die pLSV101+Fragment *in trans* tragen, bei 30 °C üN angezogen und mit 20 % Glycerin bei –80 °C eingelagert.

3.2 Anwendung von IDM auf *Salmonella typhimurium*

Ziel der Anwendung von IDM auf *S. typhimurium* war die Identifizierung von Genen, die für das Wachstum dieses Keims unter optimalen Laborbedingungen essentiell sind, mit Hinblick auf die Identifizierung potentieller *drug targets*. Daher setzte das Screening bereits bei der Generierung der Insertions-Mutanten an: es wurde differenziert zwischen *S. typhimurium* Ausgangs-Klonen, für die eine vitale Integrante erzeugt werden konnte und zwischen solchen, für die die Integration zur Lethalität führte.

3.2.1 Generierung der *S. typhimurium* Mutantenbank und Screening auf lethale Mutationsereignisse

Für das Screening auf lethale Mutationsereignisse und dadurch auf essentielle Wachstumsgene von *S. typhimurium* 14028 wurde von den Fragmentbank-Klonen ausgegangen, die bei permissiver Temperatur (30 °C) angezogen worden waren und daher pIDM+Fragment *in trans* trugen (siehe 3.1.2.1, Seite 34) Durch shift dieser Klone auf nicht-permissive Temperatur wurde die Integration des Vektors ins Chromosom von *S. typhimurium* durch Rekombination des Fragments mit dem homologen chromosomalen Genlocus induziert. Resultierte aus der Integration keine vitale Mutante, wurde angenommen, dass durch die spezifische homologe Rekombination ein essentielles Wachstumsgen ausgeknockt worden war. Es wurde dann aus dem entsprechenden Klon aus der 30 °C Masterplate per PCR das für diesen lethalen Phänotyp verantwortliche Fragment amplifiziert und sequenziert.

Zunächst wurde von jedem der 30 °C Klone, die auf LB Agar-Platten mit Tetrazyklin (17,5 µg/ml) ausgestrichen worden waren, im 96-well-Format eine Zellsuspension hergestellt, indem eine Einzelkolonie in 200 µl LB Medium mit Tetrazyklin (17,5 µg/ml) gelöst wurde. Von diesen Suspensionen wurden mit einer 12-Kanal-Pipette je 20 µl auf eine vorgewärmte, quadratische LB Agarplatte, die ebenfalls Tetrazyklin enthielt, aufgetropft. Die Platten wurden für zwei Tage bei 37 °C gelagert, dann wurde ausgewertet, für welche 30 °C Ausgangsklone vitale Integranten generiert werden konnten und für welche nicht. Für Klone, die keine vitalen Mutanten ergaben, wurde die Integration wiederholt und wurde mehrfach die *integration rate per cell* (IPC) bestimmt, falls es einige wenige Integranten gab. Hierfür wurde eine bei 30 °C angezogene Einzelkolonie in 1 ml LB Medium suspendiert. 50 µl dieses Zelllysats wurden auf eine tetrazyklinhaltige Agarplatte ausgebracht, die bei 37 °C inkubiert wurde, während 100 µl der 10⁻⁴ Verdünnung dieses Lysats auf eine tetrazyklinhaltige Agarplatte ausplattiert wurden, die bei 30 °C inkubiert wurde. Der Quotient aus den bei 37 °C angewachsenen Integranten und den bei 30 °C angewachsenen Klonen (Gesamtzahl an Bakterien im Lysat) ergab den IPC Wert.

S. typhimurium Klone, für die keine vitalen Integrianten generiert werden konnten, bzw. deren IPC Wert kleiner 6×10^{-6} war, wurden einer weiteren Charakterisierung in Form von Sequenzierung des klonierten Inserts und Abgleich dieser Sequenz gegen die *S. typhimurium* Gesamtsequenz unterworfen.

Im *highthroughput*-Verfahren wurden die 14000 *S. typhimurium* 14028 Fragmentbankklone auf lethale und vitale Insertionsereignisse untersucht. Das Screening dieser Klone resultierte in der Identifizierung von 500 lethalen Insertionsereignissen. Die entsprechenden 500 *S. typhimurium* 14028 Klone aus der 30 °C Masterplatte wurden daher für die Wiederholung der Integration und zur Bestimmung der IPC herangezogen. Für 459 der 500 Klone konnten IPC Werte zwischen 0 und 6×10^{-6} ermittelt werden, d.h. Werte, die im Vergleich zu denjenigen der Kontrollgruppe aus Kapitel 3.1.1.2, Seite 26, um mindestens Faktor 75 geringer waren. Es bestätigte sich hiermit, dass der IPC Wert als Maß für die Überlebensfähigkeit eines bestimmten Insertions-Genotyps und folglich als Maß für die Essentialität eines Genlocus für das Überleben eines Stammes herangezogen werden kann. 41 *S. typhimurium* Klone wiesen in der Wiederholung IPC Werte auf, die größer waren als 6×10^{-6} und wurden daher nicht weiter berücksichtigt.

3.2.2 Charakterisierung und Validierung der lethalen Insertionen

Aus den 459 *S. typhimurium* Klonen, die bei nicht-permissiver Temperatur nicht lebensfähig waren, wurde jeweils das in pIDM1 klonierte Insert ansequenziert. Hierfür wurde zunächst mit den Primern lacZ1 und SRMgb2 das Fragment aus den Klonen amplifiziert und das Produkt säulenchromatographisch aufgereinigt. Die Sequenzierungsreaktion selbst wurde von der Firma BioLux (Stuttgart) mit dem Primer SRMgb2 durchgeführt. Die durchschnittliche Länge der erhaltenen Sequenzen betrug 150–200 bps. Diese Sequenzen wurden dann gegen die annotierte *S. typhimurium* LT2 Gesamtsequenz der Washington University School of Medicine (<http://www.genome.wustl.edu/>) abgeglichen, um den Insertionslocus, der dem jeweiligen lethalen Phänotyp zugrunde liegt, zu identifizieren. Für 262 singuläre Fragmente konnte so der durch Insertions-Duplikations-Mutagenese mutierte Genlocus präzise bestimmt und funktional analysiert werden. Die verbleibenden Fragmente waren redundant oder waren zu Genen zu homolog, die bereits durch ein anderes Fragment identifiziert worden waren. Und im Falle von sieben Fragmenten war die Annotierung der Genbereiche so ungenau, dass auch diese nicht zu den singulären Fragmenten gezählt wurden und daher auch nicht in die Auswertung eingingen.

In der Gesamtauswertung dieser 262 singulären Fragmente wurde deutlich, dass die für die IDM Mutagenese erstellte Fragmentbank sehr divers ist und vor allem, dass diese Fragmente aus Genen oder Genbereichen stammen, die über das ganze

Genom von *S. typhimurium* verteilt sind, was bedeutet, dass sogenannte *hot spots* oder bevorzugte Bindebereiche des Randomprimers OL30N8 in der PCR während der Fragmentgenerierung nicht verzeichnet werden konnten (siehe Abbildung 10, Seite 41).

Bei der weiteren Charakterisierung der lethalen Insertionsereignisse wurde zwischen Insertionen, die sich innerhalb des kodierenden Bereichs eines Gens befanden („intragenisch“) und solchen, die zwischen zwei Genen oder sogar Genanfang bzw. – ende überlappend situiert waren („intergenisch“) unterschieden. Von den 262 analysierten Fragmenten stammten 167 aus intragenischen Bereichen, die verbleibenden Fragmente aus intergenischen bzw. in sieben Fällen aus Bereichen, wo die Annotierung noch sehr ungenau war. Durch Abgleich der Sequenzen der intra-genischen Fragmente mit der Liste von bekannten essentiellen Genen von *E. coli* (Gerdes *et al.*, 2003; www.shigen.nig.ac.jp) konnte festgestellt werden, dass 99 der 167 intragenischen Fragmente aus *S. typhimurium* Genen stammten, die homolog sind zu essentiellen Genen bzw. Operons von *E. coli*. Die IPC für diese Klone betrug Werte kleiner 6×10^{-6} , was erneut die Integrationsfrequenz als Maß für die Essentialität eines Genlocus bestätigte. Drei Fragmente wurden identifiziert, die im IDM Screening einen lethalen Phänotyp bewirkt hatten und die jedoch aus Genen stammten, die als nicht essentiell beschrieben sind. So wurden in diesem Screening durch Analyse der intragenischen lethalen Insertionen neben 99 bekannt essentiellen Genen bzw. Operons 65 neue essentielle Genloci identifiziert.

Interessanterweise erbrachte die Analyse der intergenischen Insertionen ebenfalls 45 Klone, deren IPC kleiner 6×10^{-6} war und deren Fragmente aus Operons mit mindestens einem bekannten essentiellen Gen stammten. Dass *S. typhimurium* Mutanten dieses Genotyps im Screening auf lethale Insertionen selektioniert wurden, obwohl der kodierende Bereich eines Gens gar nicht mutiert worden war, kann dadurch erklärt werden, dass bei Integration des Vektors pIDM1 in ein Operon ein polarer Effekt auf die Expression der *downstream* gelegenen Gene angenommen werden muss. Das für den lethalen Phänotyp verantwortliche Gen ist demnach das der Insertion *downstream* folgende Gen. Neben 44 bereits bekannt essentiellen Genen bzw. Operons konnten 51 weitere, neue essentielle Gene in *S. typhimurium* durch die Analyse der intergenischen Insertionen identifiziert werden.

Fasst man die Auswertung der 262 analysierten Fragmente zusammen, so kann festgehalten werden, dass insgesamt 116 potentiell neu essentielle Wachstumsgene bzw. essentielle Operons in *S. typhimurium* 14028 identifiziert werden konnten. 143 der identifizierten Gene waren bereits für *E. coli* als obligat essentiell beschrieben worden und die verbleibenden drei waren Gene, die in der Literatur als nicht-essentiell bekannt sind. Da diese drei Gene in Operons organisiert sind, die für Membran- oder sekretierte Protein kodieren, muss hier angenommen werden, dass

die Insertion von pIDM1 das Expressions-Gleichgewicht dieser polycistronischen Transkription negativ beeinflusste und so zu dem selektionierten lethalen Phänotyp führte (Fuchs *et al.*, 2001).

Die in Abbildung 10 dargestellte zirkuläre Genkarte von *S. typhimurium* zeigt die Gesamtverteilung der Fragmente bzw. Insertionen im Genom und hebt gleichzeitig hervor, wie viele Insertionen in bekannt essentiellen Wachstumsgenen im Screening selektioniert wurden. Tabelle I im Anhang listet noch mal alle in *S. typhimurium* 14028 durch IDM identifizierten bekannt essentiellen und neu essentiellen Gene auf.

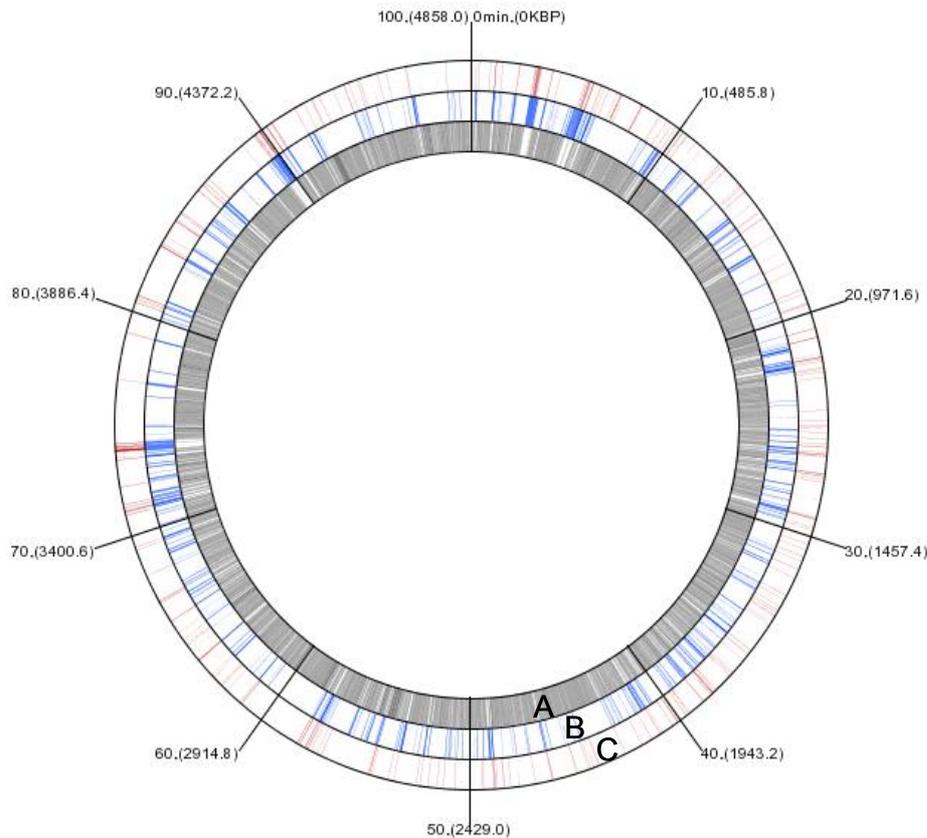


Abbildung 10: Zirkuläre Genkarte des Genoms von *S. typhimurium* 14028 mit Angabe der IDM Insertionen. Von innen nach aussen sind dargestellt: (A) alle ORFs des Genoms, (B) bekannte essentielle Gene, (C) lethale IDM Insertionen.

3.2.3 Klassifizierung der identifizierten essentiellen Gene und Untersuchung auf Homologie zu Proteinen anderer pathogener Bakterien

Mit Hilfe der sogenannten *cluster of orthologous groups* (COG, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) konnten die identifizierten Gene funktional klassifiziert werden, indem die Proteinsequenzen dieser Gene gegen die „COG“ Proteine abgeglichen wurden. Den COGs liegt der Vergleich von 43 individuellen Genomen auf Proteinebene und eine Einteilung der Proteine in funktionale Gruppen und Untergruppen zugrunde. Die funktionale Gruppierung unterscheidet zwischen vier

Klassen: (a) Informationsspeicherung und –verarbeitung (COG J, K, L), (b) zelluläre Prozesse (COG D, O, M, N, P, T), (c) Metabolismus (COG C, G, E, F, H, I, Q) und (d) unbekannte Gene (COG R, S).

Wie erwartet fiel der größte Teil der 262 identifizierten essentiellen Gene in den Bereich Informationsspeicherung und –verarbeitung (81) und dort hauptsächlich in die Unterklasse Translation (56). Neben zahlreichen für rRNA und ribosomale Proteine kodierenden Genen wurden auch 13 tRNA Synthetasen als essentiell für das Wachstum von *S. typhimurium* identifiziert. Interessanterweise fielen in die Klasse Informationsspeicherung und –verarbeitung auch sechs Gene, die bisher in der Literatur noch nicht als essentiell beschrieben wurden (*rnb*, *vacB*, *sbc*, *recC*, *ung* und ein ORF, der für einen unbekanntem Transkriptionsregulator kodiert). Die zahlenmäßig zweithäufigste Genklasse, die von den IDM Insertionen betroffen war, stellte die Klasse der unbekanntem Gene (66) dar, für die es keine Funktionszuweisung durch Homologievergleiche oder experimentelle Daten gibt, gefolgt von der Klasse „Metabolismus“ (58) und abschließend der Klasse „zelluläre Prozesse“ (57) (siehe Tabelle I im Anhang). Die Zuordnung der potentiell neuen essentiellen Gene zu den spezifischen Gruppen ergab wie erwartet, dass in der Klasse „Informationsspeicherung und –verarbeitung“ die wenigsten neuen essentiellen Gene identifiziert werden konnten (6). Die Klasse „unbekannte Gene“ hingegen wies 54 der 116 potentiell neuen essentiellen Gene auf, wie in Tabelle 5:, die diese Auswertung zusammenfasst, zu sehen ist.

Mutantenklasse	Anzahl Mutanten	als neu essentiell identifizierte Gene
Informationsspeicherung und -verarbeitung	81	6
Zelluläre Prozesse	57	25
Metabolismus	58	31
Unbekannte Gene	66	54

Tabelle 5: Klassifizierung der 262 für *S. typhimurium* lethalen Insertionen und Angabe der Klassen der 116 als neu essentiell identifizierten Gene.

Die Sequenzen von einer Auswahl an identifizierten Proteinen wurden auf Homologie zu Proteinen von anderen klinisch-relevanten Keimen durch Blast Searches untersucht (<http://mbgd.genome.ad.jp/>). Dabei wurden die Proteinsequenzen gegen das Gesamt-Genom von u.a. *Vibrio cholerae*, *Neisseria meningitidis*, *Helicobacter pylori*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae*, *Mycobacterium tuberculosis* und *Haemophilus influenzae* abgeglichen. Das Kriterium für die Annahme einer Homologie war ein E-value von $<10^{-4}$ und eine Ähnlichkeit zwischen zwei Aminosäure-Sequenzen von mindestens 20 %. Proteine, die Homologie aufwiesen zu *Saccharomyces cerevisiae* und/oder *Homo sapiens* wurden nicht weiter validiert. Das Ergebnis ist in Tabelle 6 dargestellt.

Gen-Name	<i>S. enterica</i> sv. <i>Typhimurium</i>	<i>E. coli</i> K12	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Vibrio cholerae</i>	<i>Neisseria meningitidis</i>	<i>Haemophilus influenzae</i>	<i>Campylobacter jejuni</i>	<i>Helicobacter pylori</i>	<i>Chlamydia pneumoniae</i>	<i>Treponema pallidum</i>	<i>Chlamydia trachomatis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>Mycoplasma genitalium</i>	<i>S. cerevisiae/Homo sapiens</i>	bekannte Funktion	hypothetische Funktion	unbekannte Funktion
STM0557																				
STM1552																				
STM1637																				
lpdA (STM0154)																				
STM268																				
rhsE (STM0292)																				
clpX (STM0449)																				
lpxH (STM0535)																				
STM0724																				
hutH (STM0791)																				
STM0857																				
STM0858																				
STM0932																				
STM1003																				
yccJ (STM1118)																				
yjhC (STM1133)																				
yceI (STM1157)																				
icdA (STM1238)																				
yneI (STM1524)																				
STM1559																				
STM1560																				
hslJ (STM1648)																				
yciR (STM1703)																				
yehK (STM1754)																				
yoaE (STM1829)																				
prc (STM1845)																				
sbcB (STM2067)																				
yeeF (STM2068)																				
STM2087																				
dgoA (STM2273)																				
yfaW (STM2291)																				
yghZ (STM2406)																				
pdxK (STM2435)																				
yfgE (STM2496)																				
STM2619																				
yfiF (STM2648)																				
STM3012																				
metK (STM3090)																				
deaD (STM3280)																				
yidC (STM3842)																				
yifB (STM3899)																				
trxA (STM3915)																				
yigC (STM3978)																				
dcuR (STM4303)																				
yjeA (STM4344)																				
vacB (STM4368)																				
ytfE (STM4399)																				
STM4411																				
STM4427																				
yjgM (STM4474)																				
yaeT (STM224)																				
cyoD (STM0439)																				
acrB (STM0475)																				
STM1129																				
STM1253																				
ydiN (STM1360)																				
STM2913																				
STM2986																				
yhcK (STM3340)																				
rfaL (STM3713)																				
STM4262																				
nrfC (STM4279)																				
yjyY (STM4599)																				

Tabelle 6: Ergebnis der Untersuchung von essentiellen *S. typhimurium* Proteinen auf Homologie zu Proteinen von anderen Mikro-Organismen.

So konnte festgestellt werden, dass die im Screening als essentiell für die Vitalität von *S. typhimurium* identifizierten, unbekannt Proteine STM0557, STM1552 und STM1637 *Salmonella*-spezifisch sind, während sich die anderen Proteine in zwei Klassen aufteilen: Proteine, die innerhalb der Gram negativen und Gram positiven Bakterien hoch konserviert sind und Proteine, die nur zu einigen wenigen anderen Bakterienarten Homologie aufweisen.

3.2.4 Regulation der Expression der identifizierten essentiellen Gene

Um die Essentialität der durch IDM identifizierten Gene in *S. typhimurium* 14028 zu bestätigen, wurden Insertionsmutanten konstruiert, in welchen der native Promotor der potentiell essentiellen Genen durch einen regulierbarer Promotor ersetzt wurde (Freiberg *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2000). In diesen regulatorischen Mutanten konnte so die Expression des potentiell essentiellen Gens durch Induktion oder Repression des vorgeschalteten Promotors kontrolliert und moduliert werden und dadurch ein konditional lethaler Phänotyp geschaffen werden.

Zu diesem Zweck wurde der Vektor pIDM4 kloniert (T. M. Fuchs in Knuth *et al.*, 2004). Dieses Derivat von pIDM1 kodiert neben dem Temperatur-sensitiven Replikationsprotein RepA_{ts} und der Tetrazyklin-Resistenz den Promotor P_{lac} und den Repressor LacI. Eine zusätzlich eingeführte *Bgl*II Restriktionsschnittstelle ermöglicht außerdem die Fusion von Genen oder Gen-Fragmenten an P_{lac}. In diesen Vektor wurden über die *Bgl*II Schnittstelle die 5' Fragmente (Bereich Startcodon bis 186-429 bps) von 17 putativ essentiellen Genen und zwei Kontrollgenen von *S. typhimurium* 14028 kloniert (T. M. Fuchs in Knuth *et al.*, 2004) (siehe Tabelle 7). Als Kontrollen fungierten die Gene *def*, das für eine Polypeptid-Deformylase kodiert und bereits als essentiell für das Überleben von *E. coli* beschrieben ist (Chang *et al.*, 1989) und STM3738, das für ein nicht-essentielles, putatives Membranprotein kodiert. Durch Insertion dieser Vektor-Konstrukte ins Chromosom von *S. typhimurium* 14028 bei nicht-permissiver Temperatur kam es zu einer genetischen Situation, in der die zu untersuchenden Gene jeweils unter die Transkriptionskontrolle von P_{lac} gestellt worden waren (siehe Abbildung 17, Seite 99). Der native Promotor der Gene war durch P_{lac} ersetzt worden. Für 15 der 17 pIDM4 Konstrukte konnte dieser Insertionsschritt vollzogen werden, in zwei Fällen (STM0268 und STM1707) war die Insertion jedoch für das Bakterium lethal, was ev. darauf zurückzuführen ist, dass die Annotierung in diesen Bereichen sehr ungenau, da noch vorläufig, war.

Gen- Nummer	Gen, Genfunktion	regulierbar lethal	Anmerkung
STM3406	<i>def</i> , Peptid-Deformylase	ja	Positiv-Kontrolle
STM3738	hypothetisches Protein	nein	Negativ-Kontrolle
STM0268	hypothetisches Protein	n. d.	pIDM4-Insertion lethal
STM1129	homolog zu N-Acetylmannos-amin-6-P-Epimerase	nein	
STM1133	putative Dehydrogenase	ja	nicht essentiell in <i>E. coli</i>
STM1144	<i>csgA</i> , hypothetisches Protein	ja	nicht essentiell in <i>E. coli</i>
STM1157	<i>yceI</i> , hypothetisches Protein	ja	nicht essentiell in <i>E. coli</i>
STM1552	hypothetisches Protein	ja	<i>Salmonella</i> -spezifisch
STM1707	<i>pyrF</i> , Orotidin-5'-P-Decarboxylase	n. d.	pIDM4-Insertion lethal, essentiell in <i>E. coli</i>
STM1754	<i>yehK</i> , homolog zu Esterase der Alpha/Beta Hydrolase Familie	ja	essentiell in <i>E. coli</i>
STM1845	<i>prc</i> , periplasmatische Protease	ja	nicht essentiell in <i>E. coli</i>
STM2291	<i>yfaW</i> , O-Succinylbenzoat Synthetase	ja	essentiell in <i>E. coli</i>
STM2496	<i>yfgE</i> , ATPase der DNA Replikation	ja	essentiell in <i>E. coli</i>
STM2619	hypothetisches Protein	ja	
STM3012	putativer Transkriptionsregulator	ja	essentiell oder Wachstums-assoziiert in <i>H. influenzae</i>
STM3713	<i>rfaL</i> , O-Antigen Lyase	ja	
STM3978	<i>yigC</i> , homolog zu 3-Polyprenyl-4-Hydroxybenzoat Decarboxylase	ja	nicht essentiell in <i>E. coli</i>
STM4303	<i>dcuR</i> , putativer Response Regulator des Citrat/Malat Metabolismus	ja	essentiell in <i>E. coli</i>
STM4399	<i>yftE</i> , putativer Regulator der Zellmorphogenese und des NO <i>signalling</i>	ja	nicht essentiell in <i>E. coli</i> , essentiell oder Wachstums-assoziiert in <i>H. influenzae</i>

Tabelle 7: Übersicht über die Gene von *S. typhimurium* 14028, für die mit Hilfe des pIDM4/pBad24-*lacI* Systems regulierbar lethale Mutanten konstruiert wurden. In Spalte 3 ist angegeben, ob für eine spezifische Mutante eine Abhängigkeit vom Inducer Arabinose und dadurch ein konditional lethaler Phänotyp festgestellt werden konnte. Die Expression der aufgeführten Gene stand jeweils unter der Kontrolle des Promotors P_{lac} und wurde durch die Menge an vorhandenem Repressor LacI reguliert, welcher wiederum in Abhängigkeit von Arabinose exprimiert wurde.

Zunächst wurde die Idee verfolgt, die Regulation der Expression der potentiell essentiellen Gene mit Hilfe des Inducers IPTG vorzunehmen, der die Repression der Transkription durch LacI aufhebt. Durch die Insertion von pIDM4+Fragment sollte ein *S. typhimurium* 14028 Phänotyp entstanden sein, dessen Lebensfähigkeit strikt an die Zugabe von IPTG gekoppelt ist. Jedoch wuchsen alle regulatorische Mutanten in Flüssigkulturtests auch in Abwesenheit von IPTG genau so gut wie die Negativ-Kontrolle 14028::*STM3738'*-pIDM4, mit Ausnahme der Positiv-Kontrolle 14028::*yigC'*-pIDM4. Für diese Mutante war ein von IPTG-abhängiges Wachstum zu verzeichnen (siehe Abbildung 11, Seite 47). Es musste daher angenommen werden, dass die Repression durch LacI selbst in Abwesenheit des Inducers IPTG nicht vollständig ist (aufgrund von nur einer einzigen Gen-Kopie von *lacI* auf pIDM4), was in einer kontinuierlichen, wenngleich schwachen Expression der untersuchten Gene resultiert. Aus diesem Grund wurde dann die Strategie gewählt, die Regulation der Genexpression über die Regulation der Menge an Repressor LacI vorzunehmen. Zu diesem Zweck wurde der Vektor pBad24-*lacI* kloniert (T. M. Fuchs in Knuth *et al.*, 2004), der die Transkriptionsfusion P_{BAD}-*lacI* kodiert (Guzman *et al.*, 1995). pBad24-*lacI* wurde in die o.g. pIDM4 Mutanten transformiert. Damit war ein System geschaffen worden, in dem über die Menge an Inducer Arabinose die Menge an Repressor LacI reguliert wird, welcher wiederum den Promotor P_{Iac} und damit die Synthese von jenen nachgeschalteten Genen kontrolliert, die ev. für das Überleben von *S. typhimurium* essentiell sind. Allerdings war auf LB-Agarplatten die Genexpression selbst im nicht-induzierten System (Abwesenheit von Arabinose) noch so stark, dass keine Wachstumsunterschiede für die verschiedenen *S. typhimurium* 14028 Mutanten mit oder ohne Arabinose zu verzeichnen waren. Daher wurden die Stämme fortwährend auf Minimalmedium Agarplatten kultiviert, die suboptimale Konzentrationen an Arabinose und den entsprechenden Antibiotika enthielten. Für eine *time course* Untersuchung der Abhängigkeit des Wachstums und der Vitalität der Mutantenstämme von der Arabinose-Konzentration wurden ÜNK der entsprechenden 15 Stämme in MM mit 0,002 %, 0,008 % oder 0,02 % Arabinose inokuliert und bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Stündlich wurde die Zellzahl in der Kultur durch Messen der optischen Dichte gemessen. Es war deutlich zu erkennen, dass Wachstum und Lebensfähigkeit der untersuchten, regulatorischen Mutaten in allen Fällen mit Ausnahme der *STM1129* Mutante (14028::*STM1129'*-pIDM4) strikt davon abhängig war, in welcher Konzentration sich Arabinose im MM befand (siehe Abbildung 11, Seite 47). Und damit konnte gezeigt werden, dass diese Gene bzw. ihre Produkte für das Überleben von *S. typhimurium* essentiell sind.

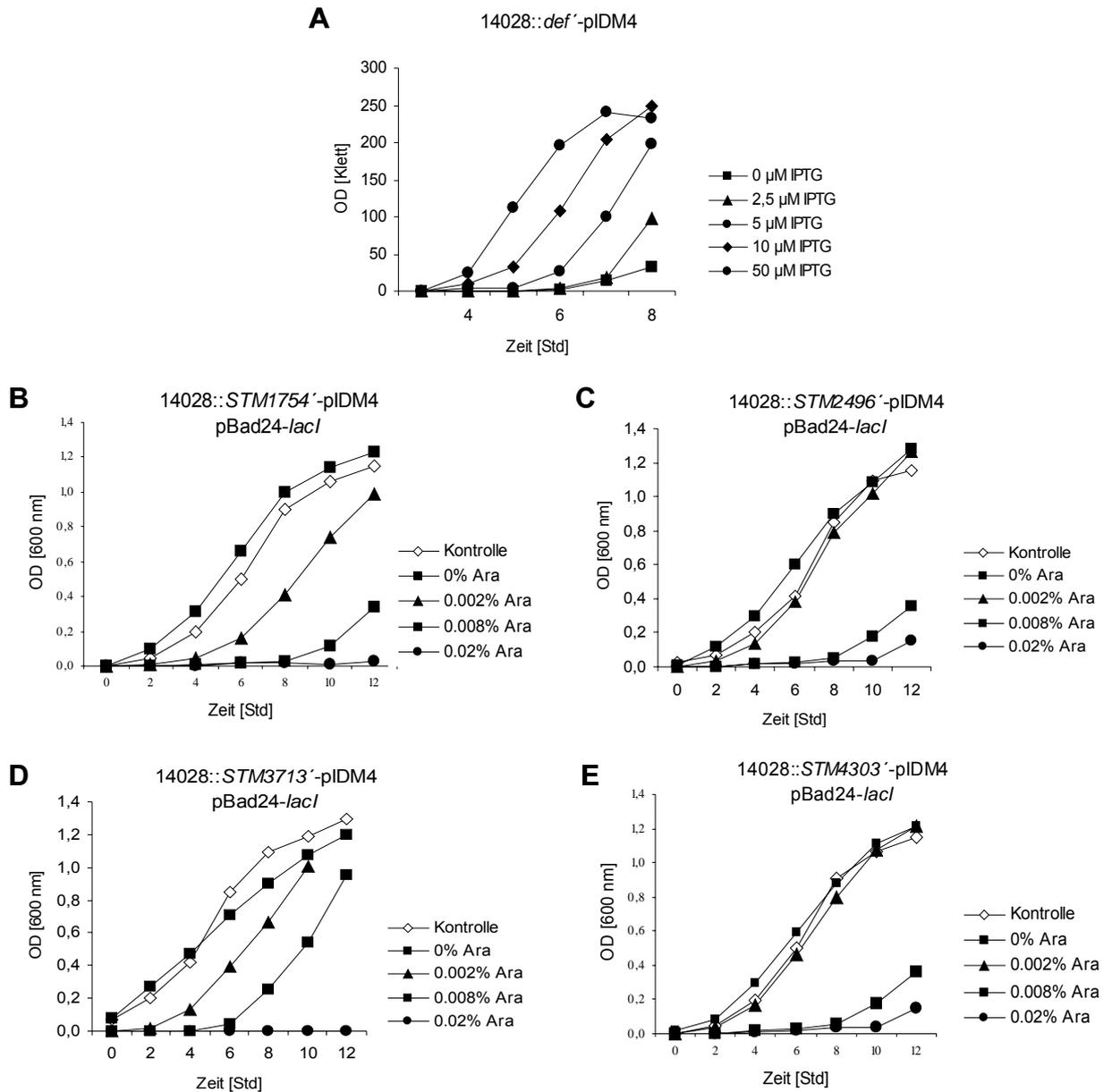


Abbildung 11: Exemplarische, grafische Darstellung der Abhängigkeit des Wachstums und der Vitalität der regulatorischen *S. typhimurium* 14028 Mutanten von Arabinose (B-E) bzw. der Positiv-Kontrolle von IPTG (A). (A) Wachstum von 14028::*def*'-pIDM4 in LB Medium in Abhängigkeit von der Konzentration des Inducers IPTG. (B-E) Die regulatorischen Mutanten 14028::*STM1754*'-pIDM4, 14028::*STM2496*'-pIDM4, 14028::*STM3713*'-pIDM4 und 14028::*STM4303*'-pIDM4 wurden mit pBad24-*lacI* transformiert und auf MM mit 0,004 % Arabinose und Tetracyclin (17,5 $\mu\text{g/ml}$) und Ampicillin (50 $\mu\text{g/ml}$) angezogen. Inducer-abhängiges Wachstum wurde dann in MM mit Ampicillin und mit verschiedenen Konzentrationen von Arabinose beobachtet. Als Negative-Kontrolle fungierte die Mutante 14028::*STM3738*'-pIDM4, die in MM mit Ampicillin und 0,02 % Arabinose wuchs.

3.2.5 Berechnung der Sättigung der Mutantenbank und des essentiellen Gen-Sets von *S. typhimurium*

Mit Hilfe der von Lee *et al.* (1998) beschriebenen Formel konnte für die in dieser Arbeit beschriebene *S. typhimurium* 14028 Fragment- bzw. Mutantenbank eine Genomsättigung von ca. 62 % berechnet werden. Der Rechnung wurde zugrunde gelegt, dass das Genom von *S. typhimurium* $4,8 \times 10^6$ bps groß ist und 4600 Gene kodiert, die eine durchschnittliche Länge von 900 bps aufweisen, wobei jedoch 770 Gene kleiner als die durchschnittliche IDM-Fragmentgröße von 450 bps sind (McClelland *et al.*, 2001) und daher nicht von einer IDM Insertion betroffen sein konnten. Außerdem wurde berücksichtigt, dass die aus 14000 Klonen bestehende Fragmentbank eine gewisse Redundanz aufweist (ca. 15 %), so dass von nur 11900 diversen *S. typhimurium* 14028 Fragmentbank-Klonen ausgegangen wurde. Der errechnete Genomsättigungsgrad von 62 % korreliert mit der Identifizierung von 13 (57 %) der 23 essentielle tRNA Synthetasen kodierenden Gene im IDM Screening auf lethale Insertionen.

Da aufgrund der Größe der IDM Fragmente (450 bps) nur 3830 Gene für einen Knockout durch Insertion zugänglich waren, errechnet sich basierend auf den identifizierten 264 essentiellen Genen unter Berücksichtigung der Mutagenese-Sättigung von 62 % eine Gesamtzahl von 511 essentiellen Genen im Genom von *S. typhimurium* 14028. Dies bedeutet, dass 11 % der Gene des Gesamt-Genoms das essentielle Gen-Set konstituieren, das für das Überleben von *S. typhimurium* 14028 unter optimalen Wachstumsbedingungen notwendig ist. 52 % dieses essentiellen Gen-Sets konnten mit Hilfe des IDM Verfahrens in dieser Arbeit identifiziert werden.

3.3 Anwendung von IDM auf *Listeria monocytogenes* EGD

Anders als bei der Anwendung von IDM auf *S. typhimurium* sollte hier der Fokus auf der Identifizierung von Virulenz-assoziierten Genen liegen. Im Infektionszyklus von *L. monocytogenes* gilt die Phase der freien Replikation des Bakteriums im Wirtszell-Zytosol als entscheidender Schritt für die Ausprägung einer Listerien-Infektion. Es sollte daher im Zellkultur-System nach Insertions-Mutanten gescreent werden, die eine Defizienz in der intrazellulären Replikation aufweisen und sich daher attenuiert verhalten.

3.3.1 Generierung der Mutantenbank von *L. monocytogenes*

Ausgehend von den 3648 *L. monocytogenes* EGD Fragmentbank-Klonen, die pLSV101+Fragment *in trans* tragen und bei permissiver Temperatur angezogen worden waren (siehe 3.1.2.2, Seite 37), wurden die entsprechenden Insertionsmutanten generiert.

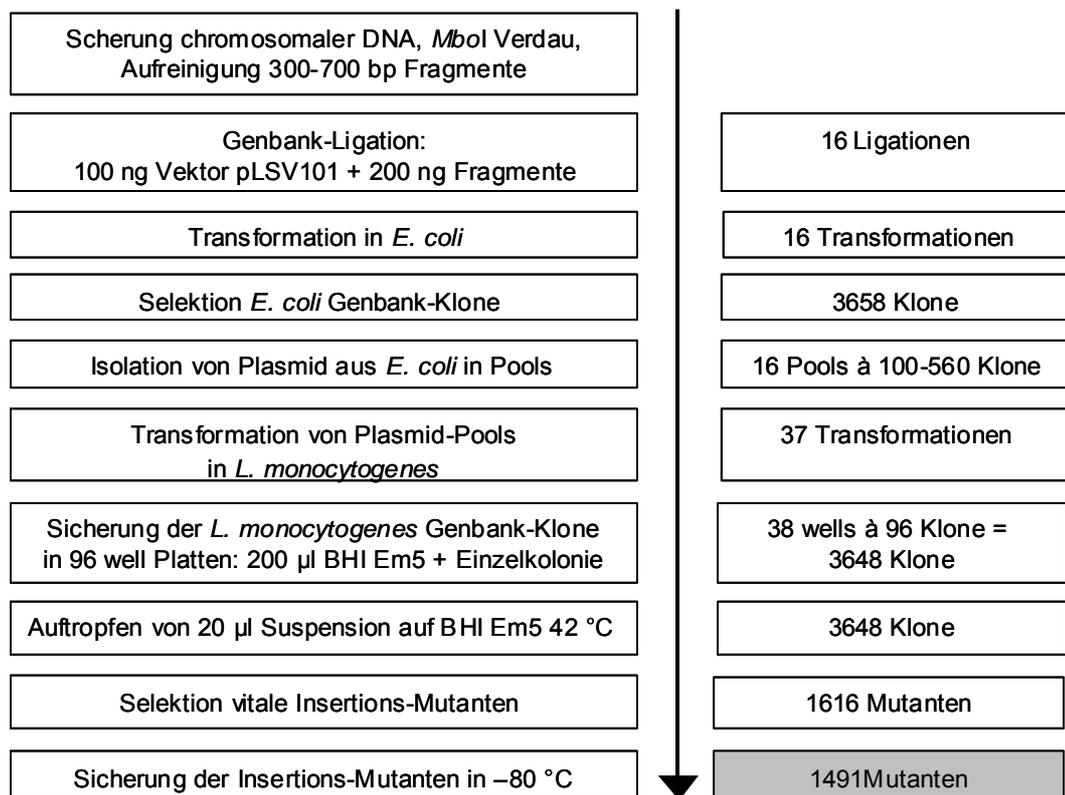


Abbildung 12: Fließschema zur Darstellung der Konstruktion einer Mutantenbank von *L. monocytogenes* EGD nach dem Prinzip der IDM Mutagenese.

Hierfür wurde jeweils eine Einzelkolonie, die durch Ausstreichen der Fragmentbank-Klone auf BHI Agarplatten mit Erythromycin bei 30 °C erhalten wurden, in einem well einer 96-well-Mikrotiter-Platte in 200 µl BHI-Medium (mit 5 µg/ml Erythromycin) suspendiert und daraus wurden 20 µl auf eine vorgewärmte BHI Agarplatte (mit 5 µg/ml Erythromycin) aufgetropft. Die nach 2 Tagen bei 42 °C gewachsenen Klone,

die sogenannte Integranten, wurden einzeln gepickt und wiederum im 96-well-Format in BHI mit 5 µg/ml Erythromycin bei 42 °C üN angezogen und in –80 °C mit 20% Glycerin eingefroren. Insgesamt konnten ausgehend von 3648 Fragmentbank-Klonen 1616 vitale Insertions-Mutanten generiert werden, wobei nur 1491 davon erneut in Kultur anwachsen, als die Mutanten in –80 °C im 96 well Format als Mutantenbank eingelagert wurden.

3.3.2 Reversion der Mutation

Bevor die *L. monocytogenes* EGD Insertionsmutanten in ein Screening eingesetzt wurden, sollte sichergestellt werden, dass ein in einem Screening selektionierter Phänotyp ausschließlich auf die Insertionsmutation zurückzuführen ist und nicht weitere Effekte, wie beispielsweise spontane Mutationen, das Ergebnis verzerren. Aus diesem Grund wurde für 20 verschiedene Insertionsmutanten die Integration rückgängig gemacht, indem sie mehrmals bei permissiver Temperatur (30 °C) auf Agar ohne Erythromycin ausgestrichen und passagiert wurden. So wurde die Exzision und schließlich auch der Verlust des Vektors pLSV101+Fragment induziert. In diesem Zusammenhang konnte festgestellt werden, dass Exzision und Reversion in den unterschiedlichen Klonen unterschiedlich schnell vonstatten geht. Nach der 14. Passage auf BHI Agarplatten ohne Erythromycin hatten 13 der 20 getesteten Stämme den Vektor verloren. Dies wurde festgestellt, indem die bei den Passagen angewachsenen Klone wieder auf BHI Agar mit Erythromycin (5 µg/ml) ausgestrichen und bei 30 °C inkubiert wurden und so überprüft werden konnte, ob diese Klone noch resistent sind, d.h. pLSV101+Fragment noch tragen oder ob sie aufgrund von Plasmidverlust sensitiv geworden sind. Die so generierten Revertanten wurden dann im Zellkultursystem und *in vitro* untersucht und mit dem *L. monocytogenes* EGD Wildtypstamm verglichen. Abbildung 13 zeigt exemplarisch das Ergebnis einer Caco-2 Infektion mit drei unterschiedlichen Insertionsmutanten und den spezifischen Revertanten. In allen drei Fällen ist ersichtlich, dass die Insertionsmutanten in einem Zeitraum von 7 Stunden schlechter in Caco-2 Zellen replizieren als der Wildtyp und dass jedoch die Reversion wildtypisches Replikationsverhalten wieder herstellen kann.

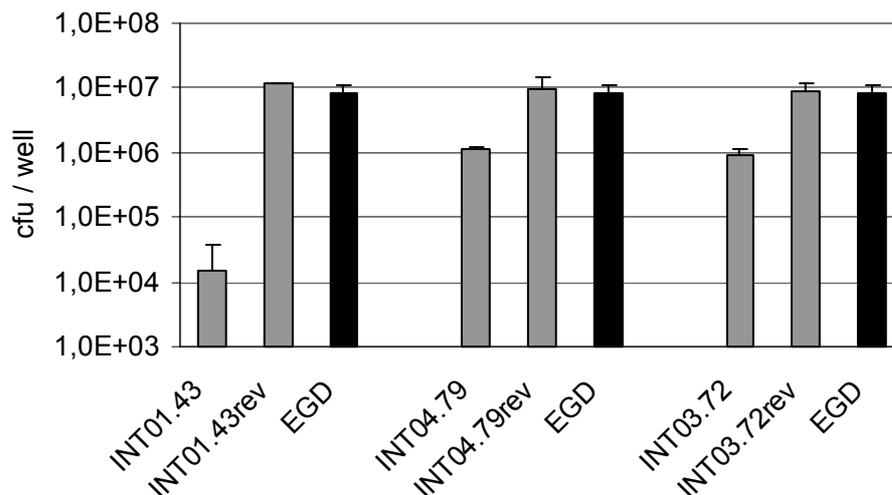


Abbildung 13: Grafische Darstellung des Wachstums- und Replikationsverhalten von *L. monocytogenes* Revertanten im Vergleich zum Wildtyp und den entsprechenden Integranten in Caco-2 Zellen. Die Caco-2 Zellen wurden mit den Revertanten (INT01.43rev, INT04.79rev und INT03.72 rev), den Integranten (INT01.43, INT04.79 und INT03.72) und dem Wildtyp-Stamm EGD für eine Stunde mit einer MOI von 5-10 infiziert und dann für sieben Stunden mit 10 µg/ml Gentamycin in RPMI-Medium inkubiert. Die Lyse erfolgte mit 1 ml 0,1 %igem Triton-X100.

Selbiges Ergebnis konnte *in vitro* erzielt werden. Drei exemplarische Integrantenstämme wuchsen in BHI Vollmedium bei 42 °C schlechter als die Wildtypkontrolle, wohingegen die entsprechenden Revertanten wieder wildtypisches Wachstum zeigten, wie dargestellt in Abbildung 14.

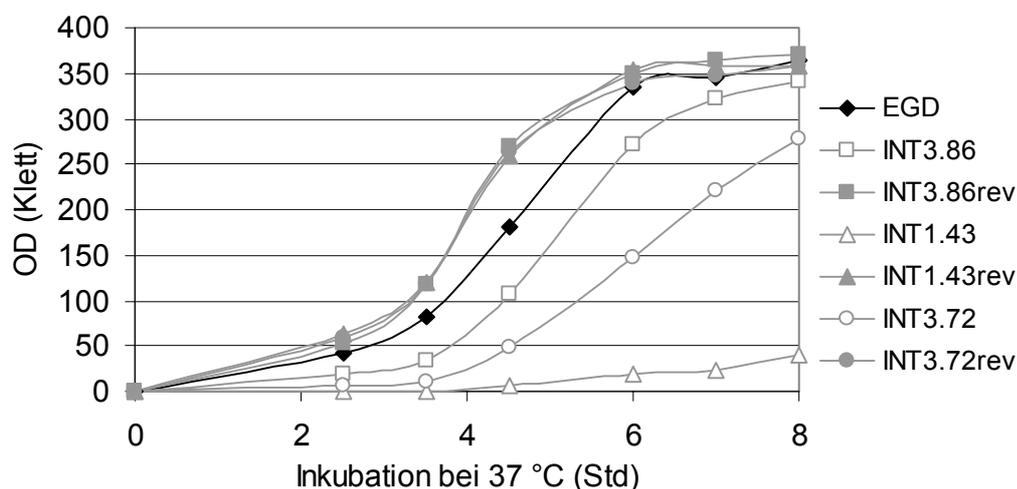


Abbildung 14: Grafische Darstellung des *in vitro* Wachstumsverhalten von *L. monocytogenes* Revertanten im Vergleich zum Wildtyp und den entsprechenden Integranten in BHI Vollmedium bei 37 °C. Je 1 ml ÜNK der Revertanten (INT03.86rev, INT01.43rev und INT03.72rev), der entsprechenden Integranten (INT03.86, INT01.43 und INT03.72) und des Wildtyp EGD wurden in 10 ml Medium (mit 5 µg/ml Erythromycin im Falle der Integranten) inokuliert und die Kulturen wurden bei 37 °C schüttelnd (190 rpm) inkubiert. Stündlich wurde die optische Dichte (OD) der Kulturen in einem Klett Summerson Photometer gemessen.

Die Schlussfolgerung aus diesen Versuchen war, dass in der IDM Mutagenese durchaus gewährleistet ist, dass die Mutation durch Integration des Vektors ins Chromosom die einzige Mutation ist und dass nicht weitere, spontane Mutationen induziert werden. Es konnte also im nachfolgenden Screening der *L. monocytogenes* EGD Insertionsmutanten-Bank angenommen werden, dass ein selektionierter Phänotyp ausschließlich durch die spezifische Insertions-Mutation bedingt ist.

3.3.3 Identifizierung von attenuierenden Mutationen im Zellkultursystem

Für das Screening der *L. monocytogenes* EGD Mutantenbank im Zellkultur-System wurde die Epithel-Zelllinie Caco-2 ausgewählt, da speziell nach Mutanten gescreent werden sollte, die in nicht-professionell phagozytischen Zellen attenuiert sind. Außerdem sind u.a. Epithelzellen auch die natürlichen Wirtszellen für *Listeria* im Verlauf eines Infektions-Zyklus. Das Screening wurde in einem Einzelklon-Ansatz in Form eines *Gentamycin Protection Assays* (Jones *et al.*, 1994) durchgeführt.

3.3.3.1 Screening auf verminderte intrazelluläre Replikation in Caco-2 Zellen

Wie unter 5.2.3.3, Seite 104, beschrieben, wurden die Caco-2 Zellen hierfür am Tag vor der Infektion in 24-well-Kulturplatten mit einer Dichte von $2,5 \times 10^5$ Zellen/well ausgesät. Die Zellzahl direkt vor der Infektion betrug dann $2,8\text{--}3,2 \times 10^5$ Zellen/well. Da in einem Einzelklon-Screening nicht für jede Mutante einzeln die *multiplicity of infection* (MOI) in Form von Glycerin-stocks definierter Zellzahl exakt eingestellt werden kann, wurde in Vorversuchen getestet, wie viele μl ÜNK eingesetzt werden müssen, um zu erreichen, dass in der Infektion 10 Bakterienzellen auf eine Epithelzelle kommen (MOI=10). Es stellte sich heraus, dass die Inokulation von drei μl ÜNK in 1 ml RPMI-Medium und anschließend die Infektion von einem well mit 500 μl dieses Infektionsansatzes reproduzierbar eine MOI von ca. 6–14 ergab. Zur Überprüfung wurde jedoch in jeder Infektionsrunde die Bakterienzahl in den Infektionsansätzen von mindestens vier Mutanten-Stämmen und dem Wildtyp bestimmt. Außerdem wurde vor Infektionsbeginn die Zahl der Caco-2 Zellen pro well für zwei der 24 wells bestimmt und mit der Bakterienzahl später zur MOI verrechnet. Versuche, in denen die MOI stark von 10 abwich, wurden nicht ausgewertet und wurden wiederholt.

Nach diesem Protokoll wurden zunächst in Vorversuchen 50 *L. monocytogenes* EGD Insertionsmutanten untersucht. Und es konnte festgestellt werden, dass sich diese bezüglich der Replikation in Caco-2 Zellen durchaus unterschiedlich verhalten: es waren Mutanten zu finden, die ein genau so starkes intrazelluläres Wachstum aufwiesen wie der Wildtypstamm und daher als nicht-attenuiert angesehen wurden, während bei anderen Mutanten eine intrazelluläre Replikation zu verzeichnen war, die im Vergleich zum Wildtypstamm um den Faktor 1–200 vermindert war (siehe Abbildung 15).

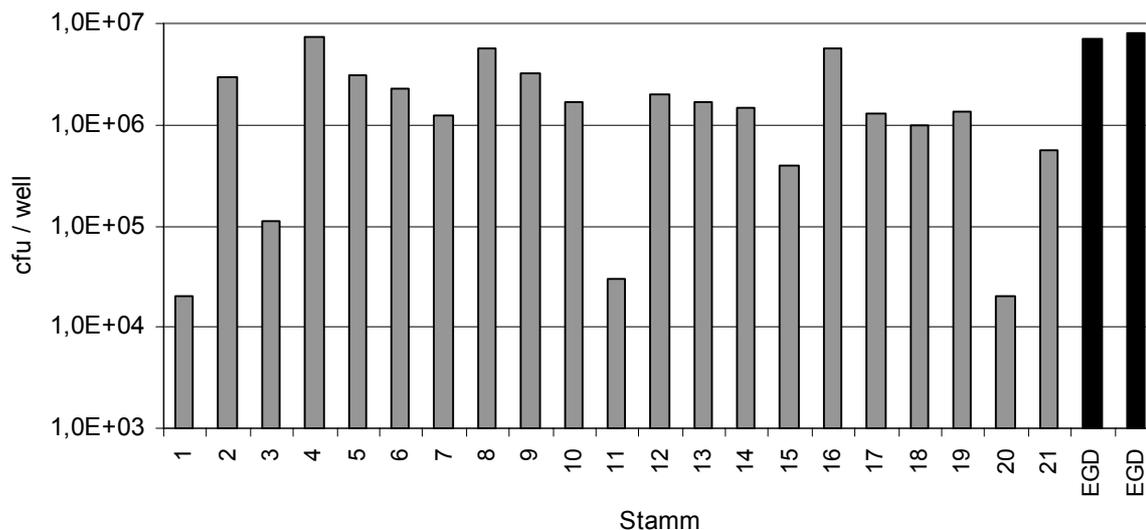


Abbildung 15: Grafische Darstellung des Wachstums- und Replikationsverhalten von 21 verschiedenen *L. monocytogenes* EGD Integranten im Vergleich zum Wildtyp in Caco-2 Zellen. Die Caco-2 Zellen wurden mit den Integranten 1-21 und dem Wildtyp-Stamm EGD für eine Stunde mit einer MOI von 5-10 infiziert und dann für sieben Stunden mit 10 µg/ml Gentamycin in RPMI-Medium inkubiert. Die Lyse erfolgte mit 1 ml 0,1 %igem Triton-X100.

Dieses Ergebnis bestätigte, dass nach dem oben beschriebenen Protokoll Mutanten selektioniert werden können, für die ein vermindertes intrazytosolisches Wachstum charakteristisch ist. Als Selektions-Kriterium wurde festgelegt, dass eine Mutante um mindestens Faktor vier in der ersten Infektion vermindert sein muss im Vergleich zum Wildtyp, um zur Reproduzierbarkeit in eine zweite und dritte Infektionsrunde eingesetzt zu werden. Erst wenn eine Mutante in mindestens drei unabhängigen Infektionen einen Verminderungsfaktor von mindestens vier zeigte, wurde sie als attenuiert angesehen und weiter charakterisiert.

Von den insgesamt 1491 generierten, vitalen *L. monocytogenes* EGD Insertions-Mutanten wurden bis zum gegenwärtigen Zeitpunkt 720 im Zellkultursystem gescreent (siehe auch Stühler, 2004). Hierfür waren insgesamt 1702 Infektionsansätze nötig. Aus 720 Mutanten konnten so 90 selektioniert werden, die auch in wiederholten Ansätzen starke Defekte in der Replikation im Zytosol der Wirtszelllinie Caco-2 aufwiesen.

3.3.3.2 Charakterisierung der replikations-defizienten *L. monocytogenes* Mutanten

Für die 90 selektionierten *L. monocytogenes* EGD Insertions-Mutanten wurde durch Ansequenzierung des in pLSV101 klonierten, homologen Fragments der chromosomale Insertionslocus bestimmt. Mit den Primern LSV3 und LSV-4380rev wurde entweder aus den Integranten, die mehrmals auf Erythromycin-haltigen BHI Agarplatten bei 30 °C (→ Exzision) passagiert worden waren, oder aber direkt aus den entsprechenden 30 °C Fragmentbank-Klonen (siehe 3.1.2.2, Seite 37) das Fragment

amplifiziert. Nach Aufreinigung dieser PCR wurde eine Thermocycling-Reaktion mit dem Primer LSV3 durchgeführt und dieses Produkt für die Sequenzierungsreaktion an Silke Fregin abgegeben. In *blast searches* wurde anschließend die erhaltene Sequenz gegen die annotierte *L. monocytogenes* EGDe Gesamt-Sequenz des Institut Pasteur (<http://www.genolist.pasteur.fr/ListiList/>) abgeglichen und so der Locus, in dem durch homologe Rekombination die Insertion vonstatten gegangen war, präzise festgemacht. Desweiteren konnten so die Insertionsmutanten klassifiziert werden, indem die vom Institut Pasteur vorgegebenen Genklassen beibehalten wurden, d.h. eine Mutante wurde jener Klasse zugeteilt, welcher das von der Insertion betroffene Gen angehörte. Durch die Sequenzierungen stellte sich heraus, dass von den 90 selektierten Mutanten 69 singularär waren. Folglich konnten insgesamt 69 individuelle Genloci identifiziert werden, deren Produkte in die intrazelluläre Replikation von *L. monocytogenes* EGD involviert sind. Diese sind in Tabelle II im Anhang aufgelistet. Die verbleibenden 21 Mutanten wiesen Insertionen auf, die identisch waren mit Insertionen aus bereits sequenzierten Klonen oder sie betrafen Genloci, die schon durch andere Fragmente identifiziert worden waren. Von den 69 individuellen Insertionen waren 67 wiederum intragenisch, während zwei einen Gen-Anfang oder ein Gen-Ende überlappten.

3.3.3.3 Klassifizierung der replikations-defizienten *L. monocytogenes* Mutanten

Die Klassifizierung der durch IDM mutierten Gene basierend auf ListiList sieht die folgenden 13 Klassen vor: (a) DNA Rekombination, (b) DNA- und RNA-Modifizierung, (c) Protein-Modifizierung, (d) Metabolismus von Nukleotiden und Nukleinsäuren, (e) Metabolismus von Aminosäuren und ähnlichen Molekülen, (f) Metabolismus von Coenzymen und Vitaminen, (g) Regulation, (h) Transport- und Bindeproteine, (i) Protein-Sekretion, (j) Zelloberfläche, (k) spezifische Pathways, (l) unbekannte Proteine und (m) Gemischtes. Durch Zuordnung aller 69 *L. monocytogenes* Insertionsmutanten zu je einer spezifischen Gen-Klasse entsprechend des mutierten Gen-Locus konnte ein Gesamtbild des Ergebnisses des Screenings auf verminderte intrazelluläre Replikation in Caco-2 Zellen gewonnen werden. Es fiel auf, dass die meisten der 69 als attenuiert identifizierten Mutanten in die Klassen „unbekannte Proteine“ (18) und „Transport- und Bindeproteine“ (11) gruppiert werden konnten. Interessanterweise konnte innerhalb der Klasse „Transport- und Bindeproteine“ zusätzlich die Tendenz festgestellt werden, dass im Screening bevorzugt IDM Insertionen in *ATP binding cassette* Transportsystemen, kurz ABC Transportern, selektiert wurden. In sieben der insgesamt 11 Mutanten war eine Komponente eines solchen ATP-abhängigen Aufnahmesystems durch die Insertion ausgeknockt worden. Für zwei dieser ABC-Transporter-Mutanten hatte dies zur Folge, dass ihre Fähigkeit im Zytosol von Epithelzellen wachsen zu können, sogar stärker als Faktor

10 vermindert war. Desweiteren waren dieser Mutanten-Klasse zwei Insertionen in Phosphotransferase-Systemen und je eine Insertion in einem Aminosäure-Transporter und in einem Zucker-Transporter zugeordnet.

Die Analyse der Situierung der Insertionen ergab darüber hinaus, dass die zwei Mutanten, in denen die Insertion den Anfang oder das Ende eines kodierenden Bereiches überlappte, der Klasse „Transport- und Bindeproteine“ angehörten. Die Mutanten aller anderen Klassen wiesen dementsprechend ausschließlich intragenische Insertionen auf.

Die Klassifizierung der verbleibenden durch Insertion mutierten Genloci ist in Tabelle 8 ersichtlich. Die Klassen, denen die wenigsten der 69 selektionierten Mutanten zugeordnet werden konnten, waren die Klassen „Protein-Modifizierung“ (1), „Metabolismus von Nukleotiden und Nukleinsäuren“ (1) und „Protein-Sekretion“ (1).

Mutantenklasse	Anzahl Mutanten	% Mutanten	davon % Mutanten mit Verminderungsfaktor >10
DNA Rekombination	3	4	67*
DNA und RNA-Modifizierung	4	6	0
Protein Modifizierung	1	1	100*
Metabolismus von Nukleotiden und Nukleinsäuren	1	1	100
Metabolismus von Aminosäuren und ähnlichen Molekülen	7	10	43*
Metabolismus von Coenzymen und Vitaminen	3	4	67
Regulation	2	3	0
Transport- und Bindeproteine	11	16	27
Proteinsekretion	1	1	0
Zelloberfläche	3	4	33
Spezifische Pathways	8	12	25
Unbekannte Proteine	18	26	33
Gemischtes	7	10	43*

Tabelle 8: Klassifizierung der 69 in Caco-2 Zellen als replikations-vermindert identifizierten *L. monocytogenes* EGD Insertionsmutanten und Darstellung der Abhängigkeit des Verminderungsfaktor von der Mutantenklasse. *Verminderungsfaktor beruht ausschließlich auf allgemeinem Wachstumsdefekt.

Bezüglich des Attenuationsgrades der klassifizierten *L. monocytogenes* Insertionsmutanten war generell festzustellen, dass für Mutanten, die zahlenmäßig weniger umfangreichen Klassen angehörten, oftmals charakteristisch war, dass sie sehr viel stärker als Faktor 10 attenuiert waren. Dies war in den Klassen „DNA Rekombination“, „Protein-Modifizierung“, „Metabolismus von Nukleotiden und Nukleinsäuren“ und „Metabolismus von Coenzymen und Vitaminen“ für 50–100 % der

Mutanten der Fall (siehe Tabelle 8). Allerdings war für alle Mutanten in vier der genannten Klassen diese detektierte verminderte intrazelluläre Replikationsfähigkeit auf einen allgemeinen Wachstumsdefekt zurückzuführen. Außerdem muss angemerkt werden, dass die Gesamtzahl an selektionierten Mutanten, die diesen Klassen zugeordnet wurden, teilweise sehr klein war und daher die Aussagekraft dieser Prozentzahlen eingeschränkt ist. Dennoch waren gewisse Trends zu erkennen, wie ebenfalls in Tabelle 8 zu sehen ist. So hat es also den Anschein, dass Insertionen in Genen, die für Proteine kodieren, die in den Metabolismus von Nukleotiden und Nukleinsäuren oder in den Metabolismus von Coenzymen und Vitaminen involviert sind, zu stärkerer Attenuation in Bezug auf die Vermehrung im Zytosol von Caco-2 Zellen führen als andere Insertionen.

3.3.3.4 Validierung der replikations-defizienten *L. monocytogenes* Mutanten

Die 69 im Zellkultursystem selektionierten und bereits klassifizierten Mutanten wurden einer weiteren Charakterisierung unterworfen. Um ausschließen zu können, dass die potentiell attenuierten Mutanten aufgrund eines allgemeinen Wachstumsdefekts als replikationsdefizient angesehen werden, wurde das *in vitro* Wachstum der Mutanten in Vollmedium (BHI Em5 µg/ml) bei 37 °C untersucht. Durch Messung der Trübungszunahme wurde über einen Zeitraum von mindestens 8 Std eine Wachstumskurve für die spezifischen Mutanten im Vergleich zum Wildtyp erstellt. 53 der 69 Insertionsmutanten wuchsen reproduzierbar wie der Wildtypstamm, die anderen Mutanten kamen, wenn überhaupt dann stark zeitverzögert in das logarithmische Wachstum. In diesen Fällen muss angenommen werden, dass die Insertion ein Gen ausgeknockt hat, dessen Produkt nicht spezifisch für die intrazelluläre Replikation essentiell ist, sondern dass das entsprechende Protein vielmehr allgemein für das Wachstum des Bakteriums von Bedeutung ist.

Von weiterem Interesse war dann die genetische Organisation der Gene, die durch die IDM Mutagenese mutagenisiert worden waren. Mit Hilfe der annotierten Gesamtsequenz von *L. monocytogenes* EGDe (<http://www.genolist.pasteur.fr/ListiList/>) konnte festgestellt werden, ob die betroffenen Gene jeweils in einem Operon liegen und daher polycistronisch transkribiert werden oder ob sie monocistronisch abgelesen werden. Die Analyse der co-transkribierten Gene im Operon sollte Aufschluß darüber geben, ob das Operon eine funktionale Einheit darstellt. Im Falle von identifizierten Genen, die als unbekannt oder hypothetisch annotiert sind, konnte dadurch ein erster Hinweis auf die putative Funktion des Gens gewonnen werden. Allerdings kann für eine Operonstruktur nicht ausgeschlossen werden, dass die Insertion in einem Gen nicht die Transkription von *downstream* im gleichen Operon gelegenen Genen negativ beeinflusst. Zur Untersuchung dieses Problems wurden von Claudia Stühler im Rahmen ihrer Diplomarbeit Reverse Transkriptase- und Real-time-PCRs durchgeführt. Sie konnte an drei unabhängigen Beispielen zeigen, dass

durch die intragenische Insertion des Vektors pLSV101 in Folge von homologer Rekombination die Expression der *downstream* gelegenen Gene des gleichen Operons nicht beeinträchtigt ist, unabhängig davon, in welcher Orientierung der Vektor ins Chromosom integriert ist (Daten nicht gezeigt). Es hat also den Anschein, dass plasmid-ständige Promotoren die Transkription der co-exprimierten Gene des Operons gewährleisten.

Ein weiterer Ansatz zur Validierung der aus dem Caco-2 Screening erhaltenen *L. monocytogenes* EGD Mutanten war die Untersuchung des Adhäsions- und Invasionsverhaltens an Caco-2 Zellen. Es sollte dadurch genauer analysiert werden, ob der in Epithelzellen beobachtete Attenuations-Effekt tatsächlich auf einem Defekt in der intrazytosolischen Replikation beruht oder ob die Mutanten vielmehr schon in ihrer Fähigkeit, an die eukaryontischen Zellen zu adhären und in diese zu invadieren beeinträchtigt sind. Für 12 der 69 untersuchten Insertionsmutanten war dies der Fall.

Abschließend wurde überprüft, ob für die im Screening identifizierten Gene aus Microarray Studien bekannt ist, dass ihre Expression im Zytosol von Caco-2 Zellen verstärkt induziert wird. Diese Studien waren bereits von Dr. Biju Joseph vom Lehrstuhl für Mikrobiologie der Universität Würzburg durchgeführt und ausgewertet worden. Laut diesen Daten wird die Transkription von vier der 69 im Caco-2 Screening identifizierten Gene während der intrazellulären Lebensphase von *L. monocytogenes* EGD hochreguliert. Diese Gene sind *clpE* (INT08.27), *Imo1538* (INT05.28), *Imo1971* (INT06.65) und *ilvD* (INT07.90).

In Tabelle II im Anhang, die alle in Caco-2 Zellen als replikations-vermindert identifizierten *L. monocytogenes* EGD Insertionsmutanten enthält, ist für jede Mutante angegeben, ob sie wildtypisches *in vitro* Wachstum zeigte oder nicht.

3.3.4 Vergleich von Insertions- und Deletionsmutanten von *L. monocytogenes* EGD

Als zusätzlicher Nachweis, dass durch die Insertion von pLSV101 in der IDM Mutagenese das spezifische Gen ausgeknockt worden war, sollte exemplarisch ein Vergleich von Insertions- und Deletionsmutanten bezüglich ihrer Fähigkeit im Zytosol von Caco-2 Zellen zu replizieren und bezüglich des *in vitro* Wachstums durchgeführt werden. Zu diesem Zweck wurde die Mutante EGD Δ *glpD* kloniert.

3.3.4.1 Konstruktion der Deletionsmutante EGD Δ *glpD*

Nach der unter 5.2.2.22, Seite 100, beschriebenen Methode wurde eine *L. monocytogenes* EGD Mutante hergestellt, in der das Gen *glpD* *in frame* deletiert ist (EGD Δ *glpD*). Die *glpD* flankierenden Fragmente AB und CD wurden mit den Primern *glpDa* und *glpDb2* (Fragment AB) bzw. *glpDc2* und *glpDd* (Fragment CD) generiert

(Primer-Sequenzen siehe 5.1.6, Seite 84) und über eine künstliche *Bgl*I Schnittstelle ligiert. Dieses Ligationsprodukt wurde mit den Primern *glpD*-nested1 und *glpD*-nested3 in einer *nested* PCR erneut amplifiziert und schließlich über *Bam*HI und *Eco*RI in den Vektor pLSV101 kloniert, wobei ca. 70 ng Vektor-DNA und 360 ng Fragment-DNA eingesetzt wurden. Nach Transformation in den Klonierungszwischenwirt XL2-blue konnte aus einer Gruppe von 36 in der PCR untersuchten Klonen (Primer LSV3 und LSV-4380rev) ein positiver Klon identifiziert werden. 300 ng des aus XL2-blue isolierten Deletionsplasmid pLSV101-*glpD*-del wurden dann in *L. monocytogenes* EGD transformiert und ausgehend von einer Transformanten-Einzelkolonie wurde dann die Integration induziert. Es wuchsen nach zwei Tagen bei 42 °C 12 vitale Integrianten an, von denen fünf in einer PCR untersucht und genotypisch als Integrianten bestätigt wurden. Dabei war auffällig, dass vier der fünf Integrianten pLSV101-*glpD*-del in ihr Chromosom über Fragment AB, d.h. über das *upstream* von *glpD* flankierende Fragment inseriert hatten. Ausgehend von einem dieser Klone wurde die Exzision von pLSV101-*glpD*-del und damit die Deletion von *glpD* eingeleitet. Nach der fünften Passage der Deletionskultur bei 30 °C ohne Erythromycin wurde eine 10⁻⁶ Verdünnung ausplattiert und es wurden die angewachsenen Klone auf Erythromycin-Sensitivität untersucht. Von 100 untersuchten Klone waren sechs bereits Em-sensitiv. Und wie sich dann in einer PCR mit den Primern *glpDa* und *glpDb* herausstellte, hatte in fünf dieser sechs Em-sensitiven *L. monocytogenes* EGD Klonen die zweite homologe Rekombination, d.h. die Exzision des Plasmids pLSV101-*glpD*-del, über das Fragment CD stattgefunden, wodurch das Gen *glpD* korrekt *in frame* deletiert wurde. Die Sequenzierung von sowohl dem Deletionsplasmid als auch von der Deletionsmutante selbst bestätigte dies.

3.3.4.2 Vergleich von Insertions- und Deletionsmutanten

Für den direkten Vergleich von Insertions- und Deletionsmutanten von *L. monocytogenes* EGD standen folgende Stämme zur Verfügung:

Insertionsmutante	Deletionsmutante
INT02.03 = EGD:: <i>glpD</i> -pLSV101	EGDΔ <i>glpD</i>
INT05.07 = EGD:: <i>lmo0051</i> -pLSV101	EGDΔ <i>lmo0051</i>

Die Mutante EGDΔ*glpD* wurde speziell für diesen Vergleich konstruiert, während die Mutante EGDΔ*lmo0051* für die Untersuchung der Rolle von Zwei-Komponenten-Systemen in der Virulenz von *L. monocytogenes* von Susanne Bauer (Lehrstuhl für Mikrobiologie, Universität Würzburg) kloniert wurde (siehe Dissertation Tatjana Williams, Lehrstuhl für Mikrobiologie, Universität Würzburg). Die beiden entsprechenden Insertionsmutanten waren im Screening der *L. monocytogenes* EGD IDM Mutantenbank in Caco-2 Zellen als replikations-vermindert identifiziert worden

(siehe 3.3.3, Seite 52ff). Für beide ist charakteristisch, dass der Mutagenesevektor pLSV101 intragenisch und weder relativ nahe am 5' Ende, noch nahe am 3' Ende der o.g. Gene inseriert ist.

Es wurde das Wachstum der Insertions- und Deletionsmutanten im Zytosol der nicht-professionell phagozytischen Zelllinie Caco-2 verglichen. Die Versuchs-Bedingungen waren dabei exakt die gleichen wie im Screening selbst (siehe 5.2.3.3, Seite 104), d.h. die Epithelzellen wurden für eine Stunde mit den Bakterien-Infektionsansätzen inkubiert, dann wurden die Bakterien abgewaschen und es folgten weitere sieben Stunden Inkubation mit Gentamycin (10 µg/ml), in denen sich die Bakterien, die in die eukaryontischen Zellen invadiert waren, vermehren konnten. Sowohl EGD::*glpD*-pLSV101 als auch EGD::*lmo0051*-pLSV101 zeigten unter diesen Versuchs-Bedingungen eine deutlich verminderte intrazelluläre Replikationsrate im Vergleich zur Wildtyp-Kontrolle (Verminderungsfaktor 7-12). Anders als erwartet wuchsen die Deletionsmutanten hingegen intrazellulär gleich gut wie der Wildtyp (siehe Abbildung 16).

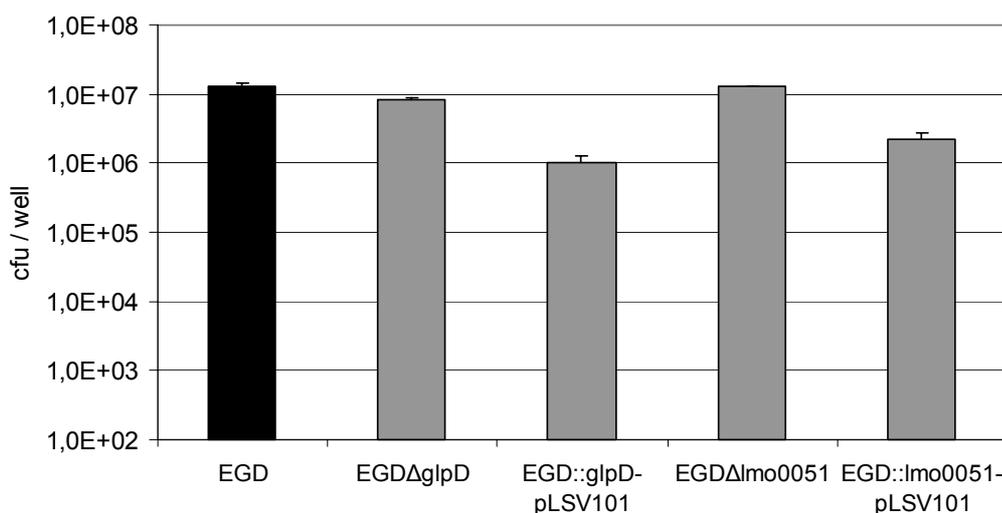


Abbildung 16: Grafische Darstellung des Wachstums- und Replikationsverhaltens von *L. monocytogenes* Insertions- und Deletionsmutanten im Zytosol von Caco-2 Zellen im Vergleich zum Wildtyp EGD. Die Caco-2 Zellen wurden mit einer MOI von 10 für eine Stunde mit der Kontrolle EGD, den Insertionsmutanten EGD::*glpD*-pLSV101 und EGD::*lmo0051*-pLSV101 und den Deletionsmutanten EGDΔ*glpD* und EGDΔ*lmo0051* infiziert. Die Inkubation in RPMI-Medium mit 10 µg/ml Gentamycin erfolgte für sieben Stunden, bevor dann durch Zugabe von 1 ml 0,1 %igem Triton-X100 die Lyse der Zellen induziert wurde.

3.3.5 Screening der Mutantenbank auf Defekte in der Induktion der Differenzierung von T-Zellen zu Typ 1 T-Zellen

In einer Kooperation mit dem Department of Immunology and Host Defenses der Ehime University School of Medicine in Ehime (Japan) unter der Leitung von Prof. Yoshihiro Asano wurde die *L. monocytogenes* EGD Mutantenbank auf Klone untersucht, die nicht mehr die für bakterielle Infektionen typische Differenzierung der T-Zell Vorläuferzellen zu Typ I T-Zellen induzieren konnten.

Durch eine bakterielle Infektion wird in dem spezifischen Wirt eine Immunantwort ausgelöst, die zur Eliminierung des pathogenen Erregers führt. Wie die Arbeitsgruppe von Prof. Asano zeigen konnte, kommt es dabei durch einen zwei-Stufen-Prozess zu einer Induktion der T-Zell-Differenzierung in Richtung Typ I T-Zellen (Th1) (Kanoh *et al.*, 2002). Der erste und für die Th1 Dominanz verantwortliche Schritt ist eine Antigen-unabhängige und durch Makrophagen oder dendritische Zellen vermittelte Modulation der Anzahl an Typ I und Typ II T-Zell-Vorläuferzellen (pTh1 und pTh2). Eine Infektion mit *L. monocytogenes* EGD bewirkt im angeborenen Immunsystem einer Maus einen shift in der ausgewogenen T-Zell-Vorläuferpopulation zu Gunsten von Typ I Vorläufern (pTh1). Im zweiten Schritt reifen die Vorläufer pTh1 und pTh2 in strikter Abhängigkeit von der Präsentation eines Antigens durch Makrophagen und der Ausschüttung der Interleukine IL-12 und IL-4 zu T-Zellen vom Typ I (Th1) oder Typ II (Th2) heran. Dabei bleibt das prozentuale Verhältnis von pTh1 zu pTh2 erhalten, d.h. in einer mit *L. monocytogenes* EGD infizierten Maus überwiegen schließlich Typ I T-Zellen (Th1), da bereits die Anzahl an pTh1 größer war als an pTh2.

In einem T-Zell-Assay wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Asano bereits untersucht, ob die Produkte bekannter Virulenzgene von *L. monocytogenes* EGD, wie Hpt, p60, InlA+InlB, Hly oder ActA in die Induktion des shifts der T-Zellpopulation zu einer Th1 Dominanz involviert sind. Jedoch zeigte sich keines der genannten Gene verantwortlich für diesen Phänotyp (Daten Prof. Asano, unveröffentlicht). Der Assay beruht auf der Messung der Cytokine IFN- γ und IL-4, die spezifisch von Th1 bzw. Th2 Zellen produziert werden. Für diesen Assay wurden zunächst Antigen-präsentierende Zellen (APC) aus der Leber von OVA-TCR transgenen Mäusen isoliert und im 48-well-Format mit *L. monocytogenes* Stämmen mit einer MOI von zwei eine Stunde lang infiziert. Dann wurden die Bakterien abgewaschen bzw. verbleibende Bakterien wurden mit Gentamycin abgetötet. Schließlich wurden die zuvor infizierten APCs mit T-Zellen aus ebenfalls OVA-TCR transgenen Mäusen und mit Ovalbumin für fünf Tage bei 37 °C inkubiert. Es folgte eine weitere Zwischen-Kultivierung für zwei Tage nach Zugabe von frischen APCs und frischem Ovalbumin, bevor dann die IFN- γ bzw. IL-4 Konzentration des Überstandes im Elisa Reader gemessen wurde.

Eine Kopie der aus 1491 vitalen Insertionsmutanten bestehenden *L. monocytogenes* EGD Mutantenbank (siehe 3.3.1, Seite 49) wurde in 17 Mikrotiterplatten à 96 wells, die mit BHI (+5 µg/ml Erythromycin) Agar gefüllt waren („Stichagar“), nach Ehime (Japan) überführt. In Vorversuchen war festgestellt worden, dass die *L. monocytogenes* EGD Insertionsmutanten in dieser Art von Stichagar selbst nach einer Woche Inkubation bei nicht-selektierenden Temperatur wieder auf BHI Agarplatten mit 5 µg/ml Erythromycin bei 42 °C angezogen werden können. Diese Mutanten wurden schließlich von der Arbeitsgruppe von Prof. Asano in dem oben beschriebenen Assay-System auf Defizienz in der Th1 Induktion untersucht. Dabei konnte eine Mutante identifiziert werden (INT07.86), die weder IFN-γ noch IL-4 produzieren konnte, d.h. die wie erwünscht keine Th2 Differenzierung zuließ und gleichzeitig aber in der ansonsten für *L. monocytogenes* charakteristischen Th1 Induktion defizient war. Durch Sequenzierung des in pLSV101 klonierten homologen Fragments, über das die Integration ins Chromosom vonstatten gegangen war, konnte der in dieser Mutante mutierte Genlocus identifiziert werden. In INT07.86 war das Gen *Imo0587*, das für ein hypothetisches, putativ sekretiertes Protein kodiert, ausgeknockt worden. In Blast searches konnte herausgefunden werden, dass das Protein Lmo0587 Ähnlichkeit zu einem putativen Autotransporter von *Yersinia pestis* bzw. einem extrazellulären Protein von *Lactobacillus plantarum* besitzt. Die gleiche Mutante war interessanterweise bereits im Screening in Caco-2 Zellen identifiziert worden (siehe 3.3.3.1, Seite 52), da sie um Faktor fünf schlechter intrazytosolisch replizieren konnte als der Wildtyp. Ihre Invasion- und Adhäsionsfähigkeit war jedoch nicht beeinträchtigt, genau so wenig wie das *in vitro* Wachstum in BHI Vollmedium.

Die Arbeitsgruppe von Prof. Asano ist derzeit dabei, eine $EGD\Delta Imo0587$ Deletions-Mutante zu konstruieren und deren Verhalten mit dem der Insertionsmutante INT07.86 bezüglich Th1 Induktion zu vergleichen.

4 Diskussion

4.1 Etablierung der Insertions-Duplikations-Mutagenese IDM

Die Insertions-Duplikations-Mutagenese IDM basiert auf einem konditional replizierenden Vektor, in den spezifische oder zufällige DNA-Fragmente kloniert werden, die homolog sind zu Genbereichen des zu mutagenisierenden Wirts-Mikroorganismus. Unter Bedingungen, die die Replikation des Vektors nicht erlauben, können Klone selektiert werden, in denen die entsprechenden Gene durch Insertion des Vektors aufgrund von Rekombination zwischen den homologen Bereichen mutiert sind. Diese Klone sind sogenannte Insertionsmutanten bzw. Integrianten.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Vektorsysteme, deren Replikation von der Temperatur abhängig ist, für die IDM Mutagenese geeignet sind. Die Temperatur-Sensitivität solcher Systeme wird durch mutierte essentielle Replikationsproteine wie RepA_{ts} oder RepF_{ts} vermittelt. In PCR-Untersuchungen wurde deutlich, dass die Insertion des Vektors sehr spezifisch und ausschließlich nach Klonierung eines DNA-Fragments, das homolog ist zu einem chromosomalen Genlocus, vonstatten geht und dass dieser Rekombinationsschritt strikt temperaturabhängig ist. Dennoch ist in solchen Vektorsystemen auch gewährleistet, dass nach Generierung der Insertion der Gen-Knockout selbst ohne Temperatur- und Antibiotikumsselektion stabil erhalten bleibt, was Untersuchungen der so konstruierten Mutanten in der Zellkultur ermöglichte.

Das IDM Mutageneseverfahren wurde exemplarisch auf einen Gram-negativen und einen Gram-positiven Keim angewandt. Für beide Applikationen wurde zunächst auf Vektoren zurückgegriffen, die in der Literatur als funktional temperatur-sensitiv beschrieben waren und diese wurden dann modifiziert und optimiert. Für die Mutagenisierung von *S. enterica* Serovar Typhimurium wurde der Vektor pIDM1 kloniert, für *L. monocytogenes* EGD der Vektor pLSV101. Die Temperatur-Sensitivität von pIDM1 wird durch das Replikationsprotein RepA_{ts} vermittelt, das aus dem Vektor pVE6007 stammt und aufgrund von vier Transitionen nur noch bei einer Temperatur von 30 °C seine Funktion als Aktivator der Plasmid-Replikation ausüben kann (Maguin *et al.*, 1992). Bei Temperaturen >37 °C ist RepA_{ts} und folglich die Replikation von pIDM1 inhibiert. pLSV101 kodiert ebenfalls ein mutiertes Replikationsprotein, RepF_{ts}, dessen Funktionalität in Folge von zwei Transitionen von der Temperatur abhängig wurde (Wuenscher *et al.*, 1990). Die permissive Temperatur für RepF_{ts} und damit für die Replikation von pLSV101 liegt bei 30 °C, die nicht-permissive bei 42 °C. Beide Vektoren erfüllen neben des konditionalen Replikationsverhaltens auch ein weiteres wichtiges Kriterium für eine Anwendung in der IDM Mutagenese: sie weisen sowohl

für den Klonierungszwischenwirt *E. coli* als auch für den jeweiligen Zielorganismus eine Transformationsrate auf, die es ermöglicht, ausreichend viele Transformanten für eine saturierende Genom-Mutagenisierung zu generieren. Für beide Vektoren wurde darüber hinaus die Sequenz ermittelt, wodurch die einzelnen Eigenschaften bestätigt und auf dem Plasmid lokalisiert werden konnten.

Die Generierung von homologen DNA-Fragmenten für die Klonierung von Fragmentbanken wurde nach zwei verschiedenen Methoden durchgeführt. Für die *S. typhimurium* Fragmentbank wurden die Fragmente mit Hilfe von Random-Primern und dem Klenow-Enzym und anschließender Amplifikation in einer PCR generiert (Froussard, 1992). Im Gegensatz dazu wurde für die *L. monocytogenes* Fragmentbank nach dem Protokoll von Lee *et al.* (1999) vorgegangen. Dieses basiert auf der Scherung von chromosomaler DNA durch Ultraschall. Vergleicht man die beiden Vorgehensweisen, kann festgehalten werden, dass es in dem PCR-basierten Protokoll von Froussard von Nachteil ist, dass nicht ausgeschlossen werden kann, dass die Random-Primer OL30-N8 Bindepräferenzen aufweisen können und dadurch nach Amplifikation mit OL30 schließlich bestimmte Fragmente in der Fragmentbank überdurchschnittlich oft repräsentiert sein können. Dies kann in der Mutantenbank dann zu sogenannten *hot spots* führen, ähnlich wie in der Transposon-Mutagenese. Dieses Problem wurde in der hier vorliegenden Arbeit so gelöst, dass die Anzahl an singulären Klenow-Reaktionen auf 70 erhöht wurde, so dass für jede nachfolgende PCR mit OL30 ein anderes Aliquot an Klenow-Reaktion als *template* zur Verfügung stand. Wie sich in der Charakterisierung der *S. typhimurium* Fragmentbank herausstellte, konnte dadurch die Redundanz der Fragmente auf 10 % minimiert werden. Ebenfalls problematisch ist an diesem Protokoll, dass vor der Ligation der Fragmente in den Vektor zwei Aufreinigungsschritte notwendig sind, was mit einem methodisch bedingten Verlust eines gewissen Prozentsatzes an Fragmentmenge einhergeht. Andererseits bietet der PCR-Schritt in dieser Methode die Möglichkeit, über das 5' Ende von OL30 jene Restriktionsschnittstelle einzufügen, die für die Klonierung der Fragmente in den spezifischen Vektor optimal ist. In der Vorgehensweise von Lee *et al.* müssen nach Scherung und Fragmentierung der DNA die Fragmente *blunt* in den Vektor kloniert werden, was eine Verminderung der Ligationseffizienz bedeutet. Oder aber die Fragmente werden zusätzlich mit einer Restriktionsendonuklease hydrolisiert, die in einer *multiple cloning site* (mcs) auf dem Vektor kodiert wird, was jedoch mit sich bringen kann, dass genau dieses Enzym die Fragmente häufiger oder seltener schneidet als erwünscht. In dieser Arbeit wurden die durch Scherung erhaltenen *L. monocytogenes* DNA-Fragmente mit *Mbol* (= *Sau3A*) hydrolisiert, da *Mbol* relativ häufig schneidet und *BamHI* kompatibel ist, so dass die entstanden *sticky ends* mit dem *BamHI* gespaltenen Vektor pLSV101 ligiert werden konnten.

Ausgehend von den so konstruierten Fragmentbank-Klonen wurden die *S. typhimurium*- und *L. monocytogenes*-Mutantenbanken generiert und einem Screening unterworfen. Die Insertions-Duplikations-Mutagenese IDM erwies sich dabei als ein Verfahren, das prinzipiell eine homogene und zufällige Mutagenisierung des gesamten Genoms eines Mikro-Organismus ermöglicht. Wie die Charakterisierung der Mutantenbanken zeigte, waren die Insertionen nach dem Zufallsprinzip über das ganze Genom verteilt. Die Identifizierung der mutierten Gen-Loci in den selektionierten Mutanten ging dabei sehr schnell vonstatten, da nach Induktion der Exzision des Vektors direkt das klonierte, homologe Fragment, über welches die Rekombination erfolgt war, sequenziert werden konnte. Die in dieser Arbeit beschriebenen, mittels IDM generierten Mutanten wurden bislang nur im *in vitro*-Infektionsmodell analysiert. Für spätere *in vivo*-Untersuchungen wurden Deletionen von den entsprechenden Genen konstruiert. Jedoch gibt es Hinweise, dass IDM Mutanten prinzipiell auch *in vivo* untersucht werden können. Rea *et al.* (2004), die *L. monocytogenes* Insertionsmutanten von diversen Genloci konstruiert hatten, konnten zeigen, dass die Insertion des Vektors pORI19 auch während einer mehrere Tage andauernden Mausinfektion stabil ist und sich eine Insertionsmutante im Mausmodell gleich verhält wie die entsprechende Deletionsmutante. Es muss also spezifisch für jeden Vektor, der für die Mutagenisierung eines pathogenen Keims nach dem IDM Prinzip eingesetzt wird, untersucht werden, ob er nach homologer Rekombination auch ohne Selektionsdruck stabil im Chromosom inseriert bleibt.

4.2 Anwendung der Insertions-Duplikations-Mutagenese IDM auf *S. typhimurium*

Für die Mutagenisierung von *S. typhimurium* 14028 nach dem IDM Prinzip wurde mit *S. typhimurium* DNA-Fragmenten eine Bank in pIDM1 konstruiert, die aus insgesamt 28000 *E. coli* Klonen bestand. Die entsprechende Fragmentbank wurde dann in Form von isolierten Plasmid-Pools durch Transformation in *S. typhimurium* überführt. Zur Vermeidung von Redundanz wurde die Anzahl an *S. typhimurium* Fragmentbank-Klonen, die in $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gesichert und für Screening-Untersuchungen herangezogen wurden, auf 14000 reduziert. In Form von 14000 Klonen sind ca. 62 % des Genoms von *S. typhimurium* in der Fragmentbank repäsentiert.

Das Ziel der Anwendung von IDM auf *S. typhimurium* war in dieser Arbeit die Selektion von lethalen Insertionsereignissen und damit der Identifizierung von Genen, die essentiell sind für das Überleben dieses pathogenen Keims unter Labor-Bedingungen. Hierfür wurden im *high-throughput*-Verfahren von den 14000 *S. typhimurium* Klonen die entsprechenden Integranten konstruiert und dabei beobachtet, ob die Insertion des Vektors in den spezifischen Genlocus einen vitalen oder einen lethalen Phänotyp generierte. Von 14000 untersuchten Insertionsereignissen waren 459 lethal für den Organismus. Die Auswertung dieser 459 lethalen Mutationen resultierte in der Identifizierung von 262 verschiedenen Genloci, die zur Überlebensfähigkeit von *S. typhimurium* in Vollmedium beitragen. Die weitere Analyse dieser Loci erbrachte, dass bereits 55 % (143) davon als bekannt essentiell beschrieben sind. Folglich konnten in der hier beschriebenen IDM Anwendung 116 neue essentielle Gene identifiziert werden.

Zur Bestätigung dieses Ergebnisses und des Verfahrens selbst wurden von 17 identifizierten Genloci und zwei Kontroll-Loci konditional lethale Mutanten konstruiert, indem der native Promotor dieser Gene durch einen induzierbaren Promotor ersetzt wurde und damit die Expression des neu-essentiellen Gens steuerbar wurde. Mit diesem System konnte für alle bis auf eines der untersuchten Gene gezeigt werden, dass diese für die Vitalität von *S. typhimurium* essentiell sind. Die Inhibition der Expression dieser Gene resultiert in einem lethalen Phänotyp, während unter Induktionsbedingungen ein wildtypisches Wachstum zu verzeichnen ist.

Eine weniger experimentelle denn theoretische Bestätigung für die auf *S. typhimurium* angewandte IDM Mutagenese stellen die Daten von Rea *et al.* (2004) dar. Sie haben mit Hilfe des Zwei-Vektoren-Systems pORI19+pVE6007 definierte Insertionsmutanten von *L. monocytogenes* konstruiert, die sie u.a. auf Virulenz-Attenuation untersucht haben. Der entscheidende Punkt ist, dass sie die mit diesen Mutanten generierten Ergebnisse mit Deletionsmutanten reproduzieren konnten und darüber hinaus feststellten, dass die Insertion des Vektors und damit der Gen-

Knockout sehr stabil ist. Sie haben daher die Insertionsmutanten direkt in Maus-Infektionen eingesetzt und konnten erneut feststellen, dass sich Insertions- und Deletionsmutanten gleich verhalten. Darüber hinaus konnten sie polare Effekte einer Insertion auf die Transkription von *downstream* gelegenen Genen im Operon ausschließen. Da der für die Mutagenisierung von *S. typhimurium* eingesetzte Vektor pIDM1 das Produkt einer Vereinigung von pORI19 und pVE6007 ist, können deren Eigenschaften auch auf pIDM1 übertragen werden. Die Daten von Rea *et al.* (2001) stützen demnach die Funktionalität von pIDM1 und die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse der IDM-Mutagenisierung von *S. typhimurium*.

Die *S. typhimurium* Insertionsmutantenbank, deren Konstruktion und Untersuchung auf lethale Mutationen in dieser Arbeit beschrieben wurde, wurde im Rahmen der Doktorarbeit von Heide Niesalla (Niesalla, 2002) auch auf attenuierende Mutationen untersucht. Hierfür wurde ein *high-throughput*-Makrophagen-Infektionstest etabliert, der in der Identifizierung von 223 attenuierten *S. typhimurium* Insertionsmutanten resultierte. Für 42 der identifizierten Mutationen war bereits in der Literatur ein attenuierendes Phänotyp beschrieben worden. Die Validierung und Charakterisierung der potentiell neuen Virulenzgene zeigte auf, dass der größte Teil dieser Gene bzw. deren Genprodukte eine Funktion im Stoffwechsel und in der Nährstoff- und Energiebereitstellung inne haben. Diese Feststellung, dass für das Überleben von *S. typhimurium* in eukaryontischen Zellen und daher für die Ausprägung der Virulenz neben den „klassischen“ Virulenzfaktoren auch Proteine essentiell sind, die die Ernährung und den Stoffwechsel in dieser Lebensphase sichern, deckt sich mit dem Ergebnis der Anwendung von IDM auf *L. monocytogenes*.

4.2.1 Identifizierung von essentiellen Genen in *S. typhimurium* durch IDM

Zur weiteren Charakterisierung der identifizierten essentiellen Gene wurde eine Klassifizierung ihrer Funktionen mit Hilfe der *cluster of orthologous groups* (COG, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) vorgenommen. Dadurch wurde deutlich, dass für das Überleben eines Mikro-Organismus unter definierten Bedingungen wie erwartet hauptsächlich Genprodukte notwendig sind, die die Weitergabe der genetischen Information sichern. 31 % der 262 Gene, denen durch das IDM Screening eine essentielle Funktion für das Überleben von *S. typhimurium* zugewiesen wurde, sind in die „Informationsspeicherung und –verarbeitung“ involviert (COG J, K, L) und dort hauptsächlich in die Translation (22 %) (COG J). Neben 13 tRNA Synthetasen wurden u.a. 15 rRNA kodierende Gene und 14 Gene für ribosomale Proteine identifiziert. Alle dieser Unterkategorie zugeordneten, im Screening identifizierten Gene sind bereits als bekannt essentiell beschrieben (Gerdes *et al.*, 2003; www.shigen.nig.ac.jp). 3 % der identifizierten Proteine haben eine wichtige Funktion

in der Transkription inne (COG K). Für drei dieser Gene ist bislang nicht bekannt, dass sie eine essentielle Funktion für das Überleben von *S. typhimurium* besitzen. *rnb* kodiert für eine Exoribonuklease, die in die Degradation von mRNA involviert ist. *vacB*, ebenfalls für eine Exoribonuklease kodierend, wurde bereits von Cheng *et al.* (1998) näher untersucht. Sie konstruierten eine *E. coli* CF881 Δ *vacB* Mutante, die sie als vital beschreiben. Andererseits war eine *E. coli* CF881 Δ *vacB* Δ *pnp* Mutante nicht lebensfähig, während auch CF881 Δ *pnp* vital war. Dies deutet darauf hin, dass VacB eine essentielle Funktion besitzt. Als drittes neues essentielles Gen dieser Unterkategorie wurde ein ORF identifiziert, der Homologie aufweist zu einem Transkriptionsregulator. Jedoch ist seine Funktion bisher noch nicht weiter charakterisiert. In die DNA-Replikation (COG L) sind schließlich 6 % der identifizierten Gene bzw. deren Produkte involviert. Aus dieser Gruppe wurden drei Gene im IDM Screening erstmalig als essentiell identifiziert: die beiden Gene *sbcB* und *recC*, die jeweils eine Exonuklease kodieren und *ung*, eine Uracil-DNA-Glycosylase.

22 % der 262 charakterisierten Genprodukte spielen eine wichtige Rolle im allgemeinen Nährstoff- und Energie-Haushalt der Bakterienzelle und gehören der Klasse „Metabolismus“ (COG C, G, E, F, H, I, Q) an. Obwohl die Integriergen-Generierung auf LB Vollmedium durchgeführt wurde und somit Substrate für Energiegewinnung und Wachstum reichhaltig zur Verfügung standen, wurden auch neun Transportsysteme identifiziert. Acht davon werden im Rahmen dieser Arbeit erstmalig als essentiell beschrieben. Dazu zählen die drei ABC-Transporter *yecS*, *hisM* und *STM4262*. *YecS* und *HisM* sind in den Transport von Aminosäuren involviert und *STM4262* ist als Transportprotein in einem putativen Bacteriocin/Lantibiotica Exporter annotiert. Hinzu kommen der Aminosäure-Transporter *YeeF*, ein H⁺/Gluconat-Transporter, ein Na²⁺/Alanin-Transporter, ein Na²⁺/H⁺-Antiporter und die Kationen/*multidrug* Efflux-Pumpe *AcrB*. Weitere neue essentielle Gene des Metabolismus sind die Isocitrat-Dehydrogenase *IcdA*, die in den Zitronensäure-Zyklus involviert ist, die putative Succinat-Semialdehyd-Dehydrogenase *YneI*, die im Tryptophan-Metabolismus eine Rolle spielt und *NrfC*, eine putative Nitrit-Reduktase. Für das Enzym *AdhE*, eine Alkohol-Dehydrogenase, beschrieben Echave *et al.* (2003) eine protektive Rolle gegen oxidativen Stress in *E. coli*. Sie berichten außerdem, dass eine *adhE* Deletionsmutante in Minimalmedium und unter oxidativem Stress lethal war. Das Ergebnis des IDM Screenings spricht auch *CitE*, der putativen Beta-Untereinheit der Citrat-Lyase und *RfbK*, einer Phosphomannomutase, eine essentielle Rolle für die Vitalität von *S. typhimurium* in Vollmedium zu. Turner *et al.* (1998) hatten eine *rfbK* *S. typhimurium* Transposon-Mutante bereits in einem Screening als virulenz-attenuiert identifiziert. Diese Mutante fiel durch eine stark verminderte intestinale Kolonisierung im Hühnchen-Modell auf. In Anbetracht

der IDM Ergebnisse könnte diese Attenuation auch auf einem generellen Wachstumsdefekt beruhen. *napH* kodiert für eine Untereinheit der Nitrat-Reduktase, die zusammen mit der Untereinheit NapG in *E. coli* als essentiell beschrieben ist für die Ubiquinol-Oxidation, da sie in den Transport von Elektronen von Ubiquinol auf NapAB involviert sind (Brondijk *et al.*, 2002). Aus dem Glutamat-Metabolismus wurden ebenfalls zwei Gene bzw. Proteine als neu essentiell identifiziert: GshA, eine Gamma-Glutamat-Cystein-Ligase, die den ersten Schritt in der Synthese von Glutathion katalysiert und GlnA, eine Glutamin-Synthetase. Die Deletion von *gshA* in *S. typhimurium* und von *glnA* in *Mycobacterium tuberculosis* führte zu auxotrophen Stämmen (Gralnick *et al.*, 2000; Tullius *et al.*, 2003). Zur Lethalität führten ebenfalls Mutationen in Genen des Folat-Metabolismus und der Folat-Biosynthese: *folD* kodiert eine Methylentetrahydrofolat-Dehydrogenase und *pabB* eine Aminobenzoat-Synthetase. Für beide Proteine ist bislang noch keine essentielle Rolle für das Überleben von *S. typhimurium* beschrieben. Aus dem Histidin-Metabolismus wurde das Gen *hisI* identifiziert. Es kodiert eine Phosphoribosyl-AMP-Cyclohydrolase, die nach diesen Daten zum Überleben von *S. typhimurium* in Vollmedium beiträgt. Neben diesen als neu essentiell deklarierten Gen-Loci konnten Gene zur Aufrechterhaltung des bakteriellen Metabolismus identifiziert werden, die in der Literatur als bekannt essentiell beschrieben sind, wie beispielsweise *lpdA*, *pyrF*, *pyrG*, *pyrH*, *dapE*, *metK*, *fabI*, *fabB*, *fabG* und andere.

Weitere 22 % der Gene, denen durch die Ergebnisse der IDM Anwendung eine wichtige Rolle für das Überleben von *S. typhimurium* zugesprochen werden kann, kodieren für Proteine, die zelluläre Prozesse steuern, wie zum Beispiel in der Modifizierung von Proteinen, in der Zellwand-Biogenese, in der Zell-Bewegung, in der Sekretion, in der Signaltransduktion und anderen. Proteasen gewährleisten, dass in der Zelle nur diejenigen Proteine vorhanden und aktiv sind, die für das Überleben und die Funktionalität der Zelle unter bestimmten Bedingungen notwendig sind (Gottesman, 1996). Kritische Regulatoren werden daher durch Proteolyse vollständig inaktiviert und abgebaut, sobald sie nicht mehr gebraucht werden und fehl-gefaltene Proteine werden entweder ebenfalls abgebaut oder es wird durch Chaperone ihre richtige dreidimensionale Struktur und damit ihre Aktivität wiederhergestellt. Mittels dieser Enzyme werden die Prozesse in der Zelle im Gleichgewicht gehalten. Es ist daher nicht verwunderlich, dass im IDM Screening für *S. typhimurium* 10 Proteasen und Chaperone identifiziert wurden, darunter ClpX, Yca und HflK, für die eine essentielle Funktion für das Überleben der Zelle bisher noch nicht bekannt war. ClpX war bereits für *Streptococcus pneumoniae* (Robertson *et al.*, 2003), für *Caulobacter crescentus* (Jenal *et al.*, 1998) und für *Synechococcus* (Schelin *et al.*, 2002) als essentielle Protease beschrieben worden, da für diese Organismen keine vitale *clpX* Mutanten generiert werden konnte. Yamamoto *et al.* (2001) berichten allerdings von

der Konstruktion einer vitalen *S. typhimurium* *clpX* Insertionsmutante. Dieses Ergebnis widerspricht dem Ergebnis der IDM Mutagenese, die zu einem lethalen *clpX* Phänotyp führte. Zwei Proteine, die in die Biosynthese von Lipopolysacchariden involviert sind wurden ebenfalls erstmalig als essentiell definiert: RfaB, eine Glycosyltransferase und *rfaL*, eine O-Antigen-Ligase. Auch das putative Membran-Lipoprotein YebW und das Porin OmpN wurden durch IDM als obligat essentiell identifiziert. Gene der Klasse „zelluläre Prozesse“, die in der Literatur schon als essentiell bekannt waren und für die die Essentialität durch IDM bestätigt werden konnte sind hauptsächlich Gene, die für Enzyme der Zellwand-Synthese kodieren (*ftsI*, *murE*, *murD*, *murG*, *murC*, *murB* u.a.), für Proteasen und Chaperone (*dnaK*, *hsiJ*, *yeaZ*, *clpB*, *grpE*, *hflB*, *mopA*) oder für Proteine, die an der Zellteilung beteiligt sind (*ftsW*, *ftsA*, *ftsZ*, *ftsZ* u.a.).

Die verbleibenden 25 % der 262 identifizierten Genprodukte sind Proteine mit gemischten Funktionen bzw. größtenteils unbekannte und hypothetische Proteine. Interessanterweise sind unter den als essentiell für die Vitalität von *S. typhimurium* identifizierten, hypothetischen Proteinen auch drei, die *Salmonella*-spezifisch sind (STM0557, STM1552, STM1637). Dies konnte durch Abgleich der Proteinsequenzen gegen die Gesamtsequenz von diversen klinisch-relevanten Keimen festgestellt werden. Die Tatsache, dass ein großer Teil der lethalen IDM Insertionen in Genen gefunden wurden, die für hypothetische Proteine kodieren, zeigt nochmals auf, dass durchaus ein Bedarf besteht an Mutagenesen und Screening-Methoden für die funktionale Charakterisierung unbekannter Gene und zellulärer Prozesse. Denn trotz großer Fortschritte in der Erforschung bakterieller Genome durch Sequenzierung und *high-throughput*-Untersuchungen ist der Charakterisierungsprozess verhältnismäßig langsam. Serres *et al.* bezifferten im Jahre 2001 den Anteil an unbekanntem Genen in *E. coli* sogar noch mit 20 % (Serres *et al.*, 2001).

4.2.2 Definition des essentiellen Gen-Sets

Die in dieser Arbeit beschriebene IDM Anwendung auf *S. typhimurium* erlaubte es, Gene zu identifizieren, die essentiell sind für das Überleben dieses Keims in Vollmedium unter Laborbedingungen. Als Ergebnis dieses *high-throughput*-Screenings können ca. 511 Gene, d.h. 11 % des Gesamt-Genoms, als das essentielle Gen-Set von *S. typhimurium* definiert werden. Das essentielle Gen-Set von *E. coli* wird auf 713 Gene und damit auf 17 % der gesamten Gene beziffert (Gerdes *et al.*, 2003). Für *B. subtilis* gelten 271 Gene, d.h. 7 %, als obligat essentiell (Kobayashi *et al.*, 2003), während es für *S. aureus* 658 Gene, d.h. 24 %, sind (Forsyth *et al.*, 2002). Die Identifizierung von 265-350 (55-79 %) essentiellen Genen in *Mycoplasma* durch Transposon-Mutagenese (Hutchison *et al.*, 1999) korreliert mit der Angabe von 256 (15 %) essentiellen Genen für *H. influenzae*, die durch Abgleich der *H. influenzae*

Sequenz gegen das kleinste bislang sequenzierte Genom von *M. genitalium* ermittelt wurden (Mushegian *et al.*, 1996). Allerdings konnten Akerley *et al.* (2002) durch Transposon-Mutagenese 644 Gene und damit 37 % des Gesamt-Genoms von *H. influenzae* als minimale Gen-Ausstattung für das Überleben der Bakterienzelle ausmachen (siehe Tabelle 9).

Verfahren	Organismus	Anzahl			
		kodierende Gene	analysierte Gene	essentielle Gene	essentielle Gene im Genom
IDM ¹	<i>S. typhimurium</i>	4600	2393	264	511 (11 %)
site specific Knockout ²	<i>B. subtilis</i>	4101	4101	271	271 (7 %)
Transposon-Mutagenese ³	<i>E. coli</i>	4291	3746	620	713 (17 %)
Transposon-Mutagenese ⁴	<i>H. influenzae</i>	1714	1272	478	644 (37 %)
Transposon-Mutagenese ⁵	<i>M. genitalium</i> / <i>M. pneumoniae</i>	480	480	351	265-350 (55-79 %)
antisense RNA Ansatz ⁶	<i>S. aureus</i>	2714	2714	658	658 (24 %)
comparative genomics ⁷	<i>H. influenzae</i>	1714	1714	256	256 (15 %)
comparative genomics ⁸	100 bakterielle Genome	480- 35000	480- 35000	63	63

Tabelle 9: Übersicht über die Verfahren und Ergebnisse zur Definition des essentiellen Gen-Sets, das für das Überleben einer Bakterienzelle essentiell ist. Quellen: ¹diese Arbeit; ²Kobayashi *et al.*, 2003; ³Gerdes *et al.*, 2003; ⁴Akerley *et al.*, 2002; ⁵Hutchison *et al.*, 1999; ⁶Forsyth *et al.*, 2002; ⁷Mushegian *et al.*, 1996; ⁸Koonin, 2003.

Die Diskrepanzen zwischen den einzelnen Angaben beruhen zum einen auf den unterschiedlichen angewandten Methoden. Die Transposon-Mutagenese tendiert dazu, die Anzahl an essentiellen Genen zu überschätzen, dadurch dass sie nicht zwischen obligat essentiellen Genen und Wachstumsgenen, deren Mutation lediglich zu einem verzögerten Wachstumsverhalten der Zelle führt, differenzieren kann (Kobayashi *et al.*, 2003). Auch das antisense-RNA-Verfahren besitzt nur eine eingeschränkte Aussagekraft, da diese Methode auf Gene limitiert ist, von denen ausgehend mit dem gewählten System eine antisense RNA generiert werden kann (Ji *et al.*, 2001). Im Gegensatz dazu muss angenommen werden, dass bioinformatische Ansätze das essentielle Gen-Set als zu klein einschätzen, da orthologe Gene, deren Homologie sich im Laufe der Evolution stark vermindert hat, nicht erkannt werden (Kobayashi *et al.*, 2003). Zum anderen können unterschiedliche Ergebnisse zu der Größe des essentiellen Gen-Sets auch durch die Verwendung unterschiedlicher Medien und Kulturbedingungen bedingt sein. Koonin (2003) betonte, dass nur dann

von einem essentiellen Gen-Set gesprochen werden kann, wenn gleichzeitig die Versuchsbedingungen aufgezeigt werden, unter denen die Untersuchungen durchgeführt wurden. Demzufolge ist die Zusammensetzung und Größe des essentiellen Gen-Sets strikt abhängig von den angelegten Bedingungen. Daraus ergibt sich wiederum, dass das essentielle Gen-Set nicht zwangsläufig auch das minimale Gen-Set ist und dass das essentielle Set das minimale Set impliziert. In der experimentellen Herangehensweise entspricht das essentielle Gen-Set nur unter optimalen Nährstoff-Bedingungen und unter Ausschluß jeglicher Stress-Faktoren dem minimalen Gen-Set. Koonin definiert das minimale Genom mit Hilfe von Sequenzdaten und setzt dieses aus den Genen, die innerhalb der verglichenen Organismen konserviert sind zuzüglich der *non-orthologous gene displacement* Gene zusammen, so dass er schließlich auf 63 Gene kommt, mit denen eine Zelle mindestens ausgestattet sein muss, um vital zu sein (Koonin, 2003).

Zusammenfassend kann dennoch festgehalten werden, dass es die hier aufgeführten Methoden ermöglichen, Gene zu identifizieren und zu charakterisieren, die für das Überleben einer Bakterienzelle unter definierten Bedingungen unverzichtbar sind. Das IDM-Verfahren weist dabei gegenüber anderen Methoden den Vorteil auf, dass es prinzipiell eine genom-sättigende Mutagenisierung des Genoms gewährleisten kann. Mit IDM steht eine Mutagenese zur Verfügung, die sowohl in Gram-negativen als auch in Gram-positiven Bakterien für Genfunktionsanalysen und –charakterisierungen eingesetzt werden kann.

4.3 Anwendung der Insertions-Duplikations-Mutagenese IDM auf *L. monocytogenes*

Nach Etablierung von IDM für *S. typhimurium* 14028 wurde das Verfahren auch auf *L. monocytogenes* EGD übertragen. Das Ziel der Anwendung war jedoch nicht wie im Falle von *S. typhimurium* die Identifizierung von obligat essentiellen Genen sondern von Genen, die für das Wachstum von *L. monocytogenes* im Zytosol von eukaryontischen Zellen relevant sind.

Durch Scherung von chromosomaler DNA wurden DNA-Fragmente von *L. monocytogenes* generiert, die in den IDM Mutagenese-Vektor pLSV101 kloniert wurden. Die entsprechende *L. monocytogenes*-Fragmentbank in *E. coli* bestand aus 3658 Klonen. Die Mutagenese-Plasmide aus diesen Klonen wurden in Pools in den Zielorganismus transformiert, so dass die Fragmentbank schließlich 3648 singuläre *L. monocytogenes* Klone umfasste. Durch shift der Temperatur auf nicht-permissive Replikationsbedingungen konnten ausgehend von diesen Klonen 1491 vitale *L. monocytogenes* Insertionsmutanten erzeugt und in $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gesichert werden. In Form dieser Mutantenbank sind 25 % des Gesamt-Genoms von *L. monocytogenes* mutagenisiert.

4.3.1 Identifizierung von virulenz-assoziierten Genen in *L. monocytogenes*

Die *L. monocytogenes* Insertionsmutanten wurden im Zellkultursystem gescreent. Zu diesem Zweck wurde jede *L. monocytogenes* Integrierte einzeln in einem *Gentamycin Protection Assay* in der nicht-professionell phagozytischen Zelllinie Caco-2 untersucht. Bislang wurden nach diesem Prinzip 720 verschiedene Klone der Mutantenbank in insgesamt 1702 Infektionsansätzen auf Defizienzen in der intrazellulären Replikation in Caco-2 Zellen gescreent. Das Screening resultierte in der Identifizierung von 90 *L. monocytogenes* Insertionsmutanten, deren Fähigkeit, sich intrazellulär zu vermehren um mindestens Faktor vier im Vergleich zum Wildtyp verringert war. Durch Sequenzierung und Homologie-Abgleiche der entsprechenden 90 homologen, im Zuge der Fragmentbank-Generierung in pLSV101 klonierten DNA-Fragmente konnte der durch Insertion mutierte Genlocus auf dem Chromosom eindeutig bestimmt werden. Die Analyse der Sequenzen erbrachte 69 singuläre Genloci, deren Genprodukte offensichtlich in das intrazytosolische Wachstum von *L. monocytogenes* involviert sind. Acht dieser Gene sind bereits als virulenz-assoziiert beschrieben. Von den „klassischen“ Virulenzfaktoren von *L. monocytogenes* wurde nur InlA im IDM Screening identifiziert. Dies ist zunächst einmal dadurch begründet, dass die Mutantenbank nur eine Genom-Sättigung von 25 % aufweist. Eine weitere Erklärung ist, dass für die Klonierung der *L. monocytogenes*

Fragmentbank in pLSV101 chromosomale DNA des *L. monocytogenes* Stamms PKP1 verwendet wurde, der genotypisch ein *L. monocytogenes* EGD Stamm ist, dem das Virulenzgencluster *plcA/hly/mpl/actA/plcB* deletiert wurde. Als Wirt für die Fragmentbank und für die Insertionsmutagenese wurde allerdings *L. monocytogenes* EGD verwendet, so dass sicher gestellt ist, dass die untersuchten Mutanten alle wild-typischen Virulenzeigenschaften besitzen, natürlich mit Ausnahme der Auswirkung der spezifischen Insertion. Die in dieser Arbeit vorgestellte *L. monocytogenes* EGD Mutantenbank umfasst also nach dem Zufallsprinzip generierte, über das Chromosom verteilte Insertionen in *L. monocytogenes* EGD Genen – *plcA*, *hly*, *mpl*, *actA* und *plcB* ausgenommen.

Um die in der IDM Mutagenese identifizierten Gene von *L. monocytogenes* weiter zu charakterisieren, wurde eine funktionale Klassifizierung basierend auf den Protein-Klassen von ListiList (www.genolist.pasteur.fr/ListiList) vorgenommen. 43 % der identifizierten Gene sind Gene, die in die Energie-Synthese und –umwandlung involviert und die für grundlegende Stoffwechselfunktionen und Nährstoffbereitstellung verantwortlich sind. Hierzu gehören u.a. 11 Transportsysteme. Dass Transporter eine wichtige Rolle in der Virulenz von *L. monocytogenes* spielen, konnten bereits Chico-Calero *et al.* (2002) mit der *L. monocytogenes* Mutante EGD Δ *hpt* zeigen. Mit Hilfe der Translokase Hpt nimmt die Bakterienzelle Hexose-Phosphat aus dem Wirtszell-Zytosol auf, welches dann als Kohlenstoff-Quelle für Syntheseprozesse und Energiegewinnung fungiert. Die Mutante EGD Δ *hpt* ist sowohl im Zellkultur- als auch im Mausmodell attenuiert. Im Screening der IDM Mutantenbank wurden sieben ABC-Transporter identifiziert. *lmo2192* kodiert für das ATP-Bindeprotein eines Oligopeptid-Transporters. Durch Sequenzabgleich konnte Lmo2192 als OppF bestätigt werden, das die Aufnahme von Deka- und Penta-peptiden vermittelt (Borezee *et al.*, 2000). Borezee *et al.* beschreiben, dass eine Deletion des im gleichen Operon situierten *oppA*, das für das Substrat-Binde-Protein dieses ABC-Transporters kodiert, lediglich zu einer schwachen Attenuation in der Infektion von Markophagen und Mäusen führt. Jedoch konnte durch elektronenmikroskopische Aufnahmen gezeigt werden, dass eben jene *oppA* Deletionsmutante nur halb so gut aus dem Phagosom entkommen kann wie der Wildtyp (Borezee *et al.*, 2000). Die weiteren durch IDM identifizierten ABC Transporter sind bezüglich ihres Substrats – mit Ausnahme von Lmo2124, das die Aufnahme von Maltodextrin vermittelt – nicht weiter spezifiziert (Lmo1431, Lmo1652, Lmo2192, Lmo1652, Lmo1636). Eine ebenfalls wichtige, bislang unbekannte Rolle in der Virulenz von *L. monocytogenes* kommt dem Aminosäure-Transporter Lmo0787 und den beiden Phosphotransferase-Systemen Lmo1971 und Lmo1003 zu. Lmo1003 kodiert eine Phosphoenolpyruvat-Phosphatase, die ein Schlüsselenzym der Katabolitrepression ist. Neben diesen Transportern wurden einige Proteine als virulenz-assoziiert

identifiziert, die diverse Abbaureaktionen für die Energiegewinnung katalysieren, darunter Lmo0978, IlvD, Lmo2770, Lmo2434 und Lmo2051. Das Gen *Imo2694*, das eine Lysin-Decarboxylase kodiert, ist an der Synthese von Cadaverin beteiligt, welches als Bestandteil des Peptidoglykans ein wichtiger Baustein während des bakteriellen Wachstums ist (Takatsuka *et al.*, 1999). Ausserdem scheint die Lysin-Decarboxylase eine zusätzliche Rolle in der Virulenz von enteroinvasiven *E. coli* (EIEC) und *Shigella* zu spielen. Für diese beiden virulenten Stämme ist charakteristisch, dass sie kein Cadaverin synthetisieren können (Casalino *et al.*, 2003). *thiD*, das für eine 4-Amino-5-Hydroxymethyl-2-Methylpyrimidin-Pyrophosphatase kodiert, ist ein essentielles Gen im Syntheseweg von Thiamin-Pyrophosphat, das als Cofaktor für viele Enzyme wie beispielsweise die Pyruvat-Dehydrogenase, die Transketolase und die α -Ketoglutarat-Dehydrogenase fungiert (Petersen *et al.*, 1997). Die Isochorismat-Synthetase MenF katalysiert einen zentralen Schritt im Syntheseprozess von Menaquinon (Vitamin K₂) (Daruwala *et al.*, 1996). Menaquinon ist ein wichtiges Enzym in der Synthese von ATP durch Elektronentransport-Phosphorylierung (oxidative Phosphorylierung). Es dient als Wasserstoffakzeptor und Elektronendonator in der Elektronentransportkette. Durch Mutation von MenF kann die oxidative ATP-Gewinnung nicht mehr oder nur mangelhaft vonstatten gehen. Die Tatsache, dass die *menF* Insertionsmutante nicht spezifisch intrazellulär sondern auch extrazellulär, d.h. *in vitro* schlechter wächst als der Wildtyp, passt zu der Hypothese, dass die intrazelluläre Energie-Gewinnung von *L. monocytogenes* nicht oxidativ als Atmung sondern als Gärung abläuft. Ein weiteres identifiziertes Protein, das an der Energiesynthese und -umwandlung beteiligt ist, ist die Aspartat-Oxidase NadB, die in die Biosynthese von NAD eingebunden ist. Heusipp *et al.* (2003) zeigten, dass *nadB* in *Yersinia enterocolitica* während der Infektion von Mäusen verstärkt exprimiert wird. Auch für das Protein PurA war bisher in *L. monocytogenes* keine virulenz-assoziierte Funktion bekannt. Der Knockout dieser Adenylosuccinat-Synthetase, die in den Metabolismus von Purinen involviert ist, führt in *E. coli* zu einer verminderten Invasivität in HBMEC Zellen (Hoffman *et al.*, 2001). Ausserdem wird die Expression von *purA* in *E. coli* während der Invasion und Infektion von HBMEC Zellen induziert (Hoffman *et al.*, 2001). Desweiteren wurde *eutB* als virulenz-assoziiert identifiziert. *eutB* kodiert für die Ethanolamin Ammonium Lyase, die die Spaltung von Ethanolamin in Acetaldehyd und NH₃ katalysiert. Ethanolamin fungiert dann als Kohlen- und/oder Stickstoffquelle für weitere Prozesse, wie bereits für *S. typhimurium* nachgewiesen wurde (Roof *et al.*, 1989). Lmo1244 spielt als Phospho-Glycerat-Mutase eine essentielle Rolle in der Glykolyse, was erklärt, warum eine solche Mutante in Caco-2 Zellen selektioniert wurde. Aus dem Glycerolipid-Metabolismus wurden sogar zwei Gene identifiziert (*glpD*, und *Imo1538*), was die Hypothese nahe legt, dass Glycerin als alternative Kohlenstoffquelle für *L. monocytogenes* während der intrazellulären Lebensphase fungieren könnte. Die Glycerin-

Kinase Lmo1538 phosphoryliert unter ATP-Verbrauch Glycerin zu Glycerin-3-Phosphat, welches dann von der Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase GlpD zu Glycerin-Aldehyd-3-Phosphat umgewandelt werden kann, das schließlich in die Glykolyse eingehen kann. Die verringerte Fähigkeit der *lmo1538* und *glpD* Insertionsmutanten, sich im Zytosol von Caco-2 Zellen zu vermehren (Verminderungsfaktor 7-9), steht in Einklang mit der Feststellung von Dr. Biju Joseph (Lehrstuhl für Mikrobiologie, Universität Würzburg, Daten nicht veröffentlicht), dass die Transkription von Genen des Glycero-Lipid-Stoffwechsels während der intrazellulären Lebensphase von *L. monocytogenes* verstärkt ist. Im Rahmen ihrer Diplomarbeit hat Claudia Stühler zu diesem Thema fortführende Untersuchungen durchgeführt. Es wurden außerdem eine Zucker-Hydrolase (Lmo2734) und zwei Phospho-Beta-Glucosidasen als virulenz-relevant identifiziert, die von den Genen *lmo0261* und *lmo0271* kodiert werden. Phospho-Beta-Glucosidasen sind Enzyme des Metabolismus von Aminosäuren und komplexen Kohlehydraten, wie Stärke und Sucrose. Die Selektion von einer solch großen Anzahl an Mutanten, in denen Gene des Metabolismus ausgeknockt sind, macht deutlich, dass die Nährstoff- und Energiebereitstellung ein essentielles Kriterium für die Replikationsfähigkeit von *L. monocytogenes* während der intrazellulären Phase des Infektionszyklus ist.

Weitere 20 % der Gene, für die in dieser Arbeit herausgefunden wurde, dass sie zum intrazellulären Wachstum von *L. monocytogenes* beitragen, sind Gene, deren Produkte eine Funktion in spezifischen zellulären Prozessen haben. Das Gen *fur* kodiert für einen Transkriptionsregulator, der die Aufnahme von Eisen in die Bakterienzelle steuert. Rea *et al.* (2004) konnten für eine *L. monocytogenes* EGD *fur* Insertionsmutante (basierend auf einem Zwei-Vektoren-System) und für eine *L. monocytogenes* EGD Δ *fur* Mutante feststellen, dass beide Mutanten im Mausmodell attenuiert sind, während sie sich im Makrophagen-Infektions-Assay gleich verhalten wie der Wildtyp. Als Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse im Maus- und Zellkultursystem führen Rea *et al.* an, dass Zellkultur-Assays stets mit sehr reichhaltigen Medien durchgeführt werden und daher der *in vivo* Situation in der Maus, wo Eisen- und Nährstoffaufnahme eine natürliche Barriere für die Bakterien darstellen, nicht gleichkommen. Als mögliche Erklärung für das unterschiedliche Verhalten der IDM *fur* Insertionsmutante und der in der Literatur beschriebenen *fur* Mutanten kann genannt werden, dass Infektionsuntersuchungen mit professionell phagozytierenden Zellen wie Makrophagen und nicht-professionell phagozytierenden Zellen wie Caco-2 Epithelzellen nicht direkt verglichen werden können. Neben *Fur* wurde ein weiterer Regulator im IDM Screening als relevant für das intrazelluläre Überleben von *L. monocytogenes* identifiziert. *AgrA* (Lmo0051) ist das Response Regulator Protein des Zwei-Komponenten-Systems *AgrA/AgrC*, das in *Staphylococcus aureus* die Expression von virulenz-assoziierten Proteinen, wie des Ober-

flächenproteins A, der Enterotoxine B, C und D u.a. reguliert. Eine *L. monocytogenes* EGD_e *agrA* Transposon-Mutante wurde bereits als Maus-attenuiert beschrieben (Autret *et al.*, 2003). Jedoch verhielt sich die gleiche Mutante in der Infektion von Caco-2 Zellen, HepG2 Zellen und Makrophagen wildtypisch. Dieses Ergebnis, das dem Ergebnis des IDM Screenings widerspricht, wurde von Tatjana Williams (Lehrstuhl für Mikrobiologie, Universität Würzburg) mit der *L. monocytogenes* EGD Δ *lmo0051* Mutante reproduziert. *gidA*, das „glucose-inhibited division gene“, wurde erst kürzlich in *Aeromonas hydrophila* (Sha *et al.*, 2004) und in *Pseudomonas syringae* (Kinscherf *et al.*, 2002) als Regulator der essentiellen Virulenzfaktoren Act bzw. SalA beschrieben. *gidA* Mutanten von *A. hydrophila* und *P. syringae* sind darüber hinaus in der Maus attenuiert (Sha *et al.*, 2004; Kinscherf *et al.*, 2002). Das für das Flagellen-Protein FlgK kodierende Gen *flgK* wurde im IDM Screening insgesamt drei Mal in Form von unabhängigen, genotypische jedoch identischen Insertionsmutanten identifiziert. FlgK ist das Verbindungsstück zwischen Flagellen-Haken und Flagellen-Filament und wird über den Haken selbst sekretiert (Kutsukake *et al.*, 1995). Die Begeißelung von *Listeria* gilt allerdings als temperatur-abhängig, wobei sie bei 37 °C nur polar angelegt ist und daher dem Bakterium nur schwache Beweglichkeit ermöglicht (Mielke *et al.*, 1999). *lmo0090* kodiert für eine weiter nicht charakterisierte ATP-Synthetase (Alpha-Kette) und *lmo0066* besitzt Homologie zu einer Toxin-Komponente. Das IDM Screening erbrachte auch für zwei Zellwand-assoziierte Proteine erste Hinweise, dass sie an der Virulenz-Ausprägung von *L. monocytogenes* beteiligt sind. *lmo2504* und *lmo0576* sind als putative Zellwand-Bindeproteine annotiert, jedoch noch nicht weiter charakterisiert. Proteasen ermöglichen ein schnelles Sich-Anpassen an Veränderungen in der Umgebung und ein Überleben unter extremen Bedingungen, wie es u.a. der für *L. monocytogenes* spezifische Lebenszyklus mit sich bringt (Nair *et al.*, 2000a). Für die Serin-Protease ClpP ist bereits bekannt, dass sie für das intrazelluläre Überleben von *L. monocytogenes* von großer Bedeutung ist (Gaillot *et al.*, 2000). Dies konnte durch die Identifizierung einer *clpP* Mutante im IDM Screening bestätigt werden. ClpE hingegen gilt nur unter nährstoff- und energiearmen Bedingungen und bei erhöhter Temperatur als Virulenzfaktor. Unter Laborbedingungen ist eine *L. monocytogenes* LO28 Δ *clpE* Mutante in ihrer intrazytosolischen Vermehrung in Caco-2 nicht beeinträchtigt (Nair *et al.*, 2000a). Dies widerspricht dem hier vorgestellten Ergebnis, wo eine *L. monocytogenes* EGD *clpE* Insertionsmutante in ihrer Fähigkeit sich intrazellulär zu vermehren, sehr stark vermindert war. Allerdings wies diese Mutante auch einen allgemeinen *in vitro* Wachstumsdefekt auf. Die Funktion der Signalpeptidase SipX ist es, das Signalpeptid von sekretierten Proteinen abzuspalten. Erst kürzlich wurde die Rolle von Signalpeptiden in der Virulenz von *L. monocytogenes* diskutiert. Bonnemain *et al.* (2004) beschreiben eine *L. monocytogenes* EGD Δ *sipX* Mutante als Maus-attenuiert, jedoch nicht attenuiert im Zellkultur-System. Die in

dieser Arbeit identifizierte *sipX* Insertionsmutante wuchs allerdings deutlich schlechter im Zytosol von Caco-2 Zellen als der Wildtyp.

Sehr viele Gene, die im IDM Screening der *L. monocytogenes* Mutantenbank auf verminderte intrazelluläre Replikation identifiziert wurden, sind Gene, die hypothetische, unbekannte Proteine kodieren. Ihr Anteil beläuft sich auf 26 %. Die Klasse der unbekannt Proteine umfasst sowohl hypothetische Proteine (50 %), d.h. Proteine, für die noch keine Funktion bekannt ist und für die aber ein Leseraster erkennbar ist, als auch Proteine, die Homologien zu Proteinen aus anderen Organismen aufweisen und aber in *L. monocytogenes* EGDe noch nicht funktional nachgewiesen sind (17 %). In diese Kategorie konnte interessanterweise eine Mutante eingeordnet werden, die in dem Gen *Imo0794* mutiert war, welches Homologie zu *ywnB* von *Bacillus subtilis* aufweist. Kazmericzak *et al.* (2003) hatten in Microarray-Studien *Imo0794* als Gen identifiziert, das in Abhängigkeit von dem alternativen Sigma-Faktor σ^B , der ein Stress-Antwort Sigma-Faktor ist, exprimiert wird. Des weiteren zählen zu dieser Gruppe Proteine, die homolog sind zu Proteinen unbekannter Funktion von anderen Organismen (33 %).

Nur 10 % der identifizierten Gene kodieren Proteine, die in Zusammenhang stehen mit Speicherung und Verarbeitung von Information, d.h. mit Protein-Biosynthese, DNA-Replikation, DNA-Rekombination und DNA-Reparatur. Dieses Ergebnis entspricht der Erwartung, dass die meisten Mutationen in Genen, deren Produkte die Weitergabe und Reparatur von DNA sichern, essentiell für das Überleben der Bakterienzelle sind und weniger eine Funktion in der Virulenz von pathogenen Keimen besitzen. IDM Mutanten dieser Klasse, die ein intrazytosolisches Wachstumsverhalten zeigten, das um mehr als Faktor 10 vermindert war im Vergleich zum Wildtyp (*addB* bzw. *recN* Mutante), wiesen alle in *in vitro* Wachstumsuntersuchungen einen allgemeinen Wachstumsdefekt auf, der teilweise auf UV-Sensitivität beruhte. Auch die *uvrA* Mutante ist UV-sensitiv (Hanna *et al.*, 2001). Nur Insertionen in *recS* und *Imo0157*, die beide für eine Helikase kodieren, in *Imo1751* und in *Imo2050* hatten keinen allgemeinen Wachstumsdefekt zur Folge.

Als Bestätigung für das IDM Screening kann die Identifizierung des Oberflächenproteins InIA angesehen werden. Dieses Internalin ist essentiell für die Invasion von *L. monocytogenes* in nicht-phagozytische Zellen (Bergmann *et al.*, 2002). Wie in der Validierung der *inIA* Insertionsmutante nachfolgend festgestellt werden konnte, beruhte das detektierte verminderte intrazytosolische Wachstum wie erwartet auf einem Defekt in der Adhäsions- und Invasionsfähigkeit. Die für jede selektionierte Mutante einzeln durchgeführten, umfangreichen Validierungsuntersuchungen erlauben es also, eindeutig zwischen Defekten in der Adhäsions-, der Invasions- und der intrazellulären Replikationsfähigkeit zu unterscheiden und Defekte im allgemeinen Wachstum (*in vitro* Wachstum) zu erkennen, wie speziell an diesem

Beispiel deutlich wurde. Im Gegensatz zu den bislang durchgeführten, in der Literatur beschriebenen Screenings, die auf Transposon-Mutagenese basieren, werden also im IDM Verfahren im Zuge der Validierung Mutanten ausselektioniert, bei denen die Mutation zu einem Wachstumsdefekt führt. Die Summe dieser Untersuchungen ermöglicht es also, erste Aussagen über die Funktion und Rolle eines Gens bzw. dessen Produkts in der Virulenz von *L. monocytogenes* zu machen.

Als weitere Bestätigung für das IDM Verfahren sollten die beschriebenen Ergebnisse des *L. monocytogenes* Screenings mit spezifischen Deletionsmutanten reproduziert werden. Hierfür wurden die *L. monocytogenes* Mutanten EGD Δ *glpD* (siehe 3.3.4.1, Seite 57) und EGD Δ *Imo1538* (Diplomarbeit Claudia Stühler) konstruiert. Ausserdem stand die Mutante EGD Δ *Imo0051* (von Susanne Bauer) zur Verfügung. Aus den Infektionsuntersuchungen, in denen Insertions- und Deletionsmutanten und der Wildtypstamm direkt verglichen wurden, resultierte allerdings, dass alle drei Insertionsmutanten, wie schon zuvor im Screening, schlechter replizierten als der Wildtyp, während für alle drei Deletionsmutanten die gleiche Wachstumsrate wie für den Wildtyp zu verzeichnen war. Als Erklärungsversuch für dieses Phänomen kann von vorneherein ausgeschlossen werden, dass der verwendete Vektor pLSV101 für eine solche Anwendung nicht geeignet ist. Seine Funktionalität wurde vor der Anwendung geprüft und bestätigt. Die Tatsache, dass von den untersuchten Insertionsmutanten nur 13 % als replikations-vermindert in Caco-2 Zellen identifiziert wurden und nicht alle 100 % spricht darüber hinaus dafür, dass wie erwartet eine Selektion der Mutanten im Zellkultur-System stattfand. Eine mögliche Erklärung für die Diskrepanz im Verhalten der Insertions- und Deletionsmutanten wäre eventuell, dass sich die chromosomale Vektor-Insertion auf die Transkription von Genen auswirkt, die im gleichen Operon *downstream* des mutierten Gens kodiert werden. Allerdings kann diese Hypothese von polaren Effekten für alle drei genannten Insertionsmutanten verworfen werden, da *glpD* monocistronisch transkribiert wird und *Imo1538* und *Imo0051* jeweils das terminale Gen des Operons sind. Außerdem konnte Claudia Stühler in ihrer Diplomarbeit durch *Real-time*-PCR und Reverse-Transkriptase-PCR Untersuchungen zeigen, dass solche polare Effekte ausgehend von pLSV101 generell nahezu ausgeschlossen werden können, da in allen untersuchten Fällen ein Transkript der nachfolgenden Gene detektiert werden konnte. Eine weitere mögliche Erklärung wäre die Inhibition der Translation eines zur Insertion benachbarten Gens durch die Synthese von antisense-RNA ausgehend von einem plasmid-kodierten Promotor. Diese Hypothese käme jedoch nur für die Gen-Loci *Imo1538* und *Imo0051* zum Tragen, da *glpD*, wie bereits beschrieben, nicht in einem Operon kodiert wird, sondern von zwei Terminatoren umgeben ist. Im Falle des *Imo1538* Locus wäre dann durch eine antisense-RNA die Translation des Gens *Imo1539* inhibiert, das für einen *glycerol uptake facilitator* kodiert. Die antisense-RNA, die ausgehend von der

Insertion in *lmo0051* gebildet würde, würde die Synthese von Lmo0050, der Histidin-Kinase des Zwei-Komponenten-Systems inhibieren. Eine andere Möglichkeit für die Erklärung dieses Ergebnisses wäre die Inhibition der Expression von Genen durch die Induktion von topologischen Effekten. In diesem Fall wären Gene für den selektierten Phänotyp verantwortlich, die nicht in unmittelbarer Nachbarschaft zum Insertionslocus auf dem Chromosom kodiert werden. Dementsprechend schwierig wäre es, basierend auf dieser Hypothese, das eigentliche Gen, das für das intrazelluläre Überleben von *L. monocytogenes* in Caco-2 Zellen essentiell ist, auszumachen. Als Vorgehensweise zur Klärung der Diskrepanz zwischen den IDM Ergebnissen und den Deletionen wird vorgeschlagen, zunächst weiterer Deletionen von Genen, die im IDM Screening basierend auf dem Vektor pLSV101 identifiziert wurden, zu konstruieren um eine größere Anzahl an Deletionsmutanten für einen Vergleich zur Verfügung zu haben. Des Weiteren sollten einige pLSV101 Insertionen mit dem von Rea *et al.*, (2004) beschriebenen Vektorsystem simuliert werden. Rea *et al.* konnten mit einem konditional replizierenden Zwei-Vektoren-System Insertionsmutanten von *L. monocytogenes* generieren, deren Infektionsverhalten dem der entsprechenden Deletionsmutanten entsprach. Damit konnten sie zeigen, dass die Insertions-Duplikations-Mutagenese prinzipiell ein geeignetes Verfahren zur Generierung von Mutanten und Mutantenbanken ist.

4.3.2 Ansätze zur Identifizierung von virulenz-assoziierten Genen

Für die Identifizierung von virulenz-assoziierten Genen von pathogenen Bakterien wurden bislang hauptsächlich Methoden eingesetzt, die auf Mutagenisierung durch Transposons basieren. Hierbei ist insbesondere die *signature tagged mutagenesis* STM hervorzugeben, da sie es ermöglicht, in Form von Pools gleichzeitig eine große Anzahl an Mutanten sowohl *in vitro* als auch *in vivo* auf Virulenzdefekte zu analysieren und dennoch ganz spezifisch einzelne Mutanten aus den Pools aufgrund der individuellen Markierung zu selektionieren. Beim Einsatz von Transposons ohne Markierung ist zu beachten, dass *high throughput*-Screenings zunächst nur *in vitro* durchgeführt werden können, da Einzelklon-Ansätze vonnöten sind. Nach dieser Vorselektion ist es aber durchaus möglich, einzelne Mutanten auch im *in vivo*-Modell auf Attenuation zu überprüfen und zu charakterisieren. Ein Nachteil der Transposon-basierten Verfahren ist allerdings, dass sogenannte *hot spots* auftreten können, d.h. Bereiche, in die die Transposons bevorzugt integrieren. Dadurch ist eine gleichmäßige, zufällige, genom-saturierende Mutagenisierung nicht gewährleistet. Die Insertions-Duplikations-Mutagenese IDM hingegen ermöglicht prinzipiell eine homogene und zufällige Mutagenisierung des gesamten Genoms eines Mikroorganismus. Wie die Charakterisierung der *S. typhimurium* und der *L. monocytogenes* Mutantenbank zeigte, waren die Insertionen nach dem Zufallsprinzip über das ganze Genom verteilt. Von Vorteil im IDM Verfahren ist auch die schnelle und

präzise Identifizierung des mutierten, für den selektionierten Phänotyp verantwortlichen Genlocus. Die Daten von Rea *et al.* (2004), die Insertionsmutanten auch im *in vivo* Modell untersucht haben, deuten darüber hinaus darauf hin, dass IDM Mutanten auch direkt *in vivo* gescreent werden können. Unter diesen Bedingungen stellt die Insertions-Duplikations-Mutagenese IDM eine Alternative und Ergänzung zu Transposon-Verfahren dar.

Die bislang einzige in der Literatur beschriebene genom-weite Mutagenisierung von *L. monocytogenes* zum Zweck der Identifizierung von Genen, die das intrazelluläre Wachstum ermöglichen, wurde von Autret *et al.* (2001) durchgeführt. Durch Anwendung von STM konnten 10 verschiedene Gene identifiziert werden, deren Mutation eine Attenuation um 75-100 % in Bezug auf den Wildtyp im Mausmodell bewirkte. Fünf dieser Loci kodieren für Zellwand-Komponenten, die anderen fünf für Proteine, die in verschiedene Prozesse im Metabolismus, in der Rekombination und in der Transkriptions-Regulation involviert sind. Da diese Mutantenbank aus nur 2304 Klonen bestand und die 10 identifizierten Gen-Loci durch 18 selektierte Mutanten repräsentiert wurden, wird auch hier das limitierte Potential von Transposon-Mutagenesen, was die Sättigungsrate und Zufälligkeit der Insertionen angeht, deutlich. Im Gegensatz dazu konnten mittels IDM aus einer Menge von 720 Mutanten 69 singuläre Mutanten identifiziert werden, die in Epithelzellen deutlich schlechter replizieren als der Wildtyp.

4.4 Anwendung von IDM auf weitere Organismen

Nachdem die IDM Mutagenese in dieser Arbeit für *S. typhimurium* und *L. monocytogenes* etabliert wurde, wurde ein Kriterienkatalog formuliert, der für eine erfolgreiche Übertragung des Systems auf andere Mikro-Organismen erfüllt sein muss. Grundlage der Mutagenese ist ein steuerbar konditional replizierender Vektor. Ein Vektor, dessen Replikation durch die Temperatur beeinflussbar ist, bietet sich hierfür an. Dieser muss mit einer gewissen Effizienz sowohl in den Klonierungszwischenwirt *E. coli*, als auch in den zu mutagenisierenden Endwirt transformierbar sein. Des Weiteren muss eine ausreichend hohe Rekombinations- bzw. Integrationsrate gegeben sein, um genügend viele vitale Insertionsmutanten generieren zu können bzw. um eindeutig zwischen einer Insertion, die einen lethalen Phänotyp und einer Insertion, die einen vitalen Phänotyp bewirkt, unterscheiden zu können (Screening auf lethale Mutationen). Rekombination darf allerdings erst nach Klonierung eines homologen DNA-Fragments in den Vektor und nach Transformation dieses Konstrukts in den Ziel-Organismus vonstatten gehen, d.h. illegitime Rekombination muss ausgeschlossen werden können.

Diese Kriterien wurden bereits für den Gram-positiven Keim *Streptococcus pneumoniae* erfüllt, dessen Genom mit dem thermo-sensitiven Plasmid pEVP3

mutagenisiert wurde und auf Gene untersucht wurde, die relevant sind für die Transformierbarkeit dieses Stammes (Lee *et al.* 1998, Lee *et al.* 1999). Weitere in der Literatur beschriebene temperatur-sensitive Vektoren, die für eine Anwendung von IDM auf *Streptococcus* in Frage kommen, sind Derivate von pWV101 (Framson *et al.* 1997), pG⁺host5 (Biswas *et al.* 1993) und pORI19 in Kombination mit pVE6007 (Labarre *et al.* 2001). Für die Mutagenese von *Staphylococcus* nach dem IDM Prinzip bieten sich die Vektoren pSAO802, pSAO803 und pSAO804 an, die alle Derivate von pC194 sind (Iordanescu *et al.* 1983), oder pPQ126 (Luchansky *et al.* 1989). Für *Enterococcus* sind ebenfalls zwei verschiedene Vektor-Systeme als funktional temperatur-sensitiv beschrieben: pTVts (Krah *et al.* 1989) und pAM401ts (Weaver *et al.* 1998). Auf *Lactococcus* könnte IDM mit dem Zwei-Vektoren-System pORI+pVE6007 (Law *et al.* 1995) oder mit pG⁺host5 (Biswas *et al.* 1993) angewandt werden. pG⁺host5 erwies sich allgemein bei Biswas *et al.* (1993) als Vektor mit einem sehr breiten Wirtsspektrum unter den Gram-positiven Bakterien. Er ist neben *Lactococcus* und *Streptococcus* ebenfalls funktional in *Bacillus* und in *Listeria*. Erst kürzlich wurde auch für *Lactobacillus* eine potentieller IDM Vektor beschrieben: pTN1 wurde für die Konstruktion von Insertionsmutanten von *Lactobacillus gasseri* erfolgreich eingesetzt (Neu *et al.* 2003). Sollen hingegen Insertionsmutanten von *Mycobacterium* generiert werden, kann auf die pAL5000-Derivate pCG59 und pCG63 zurückgegriffen werden (Guilhot *et al.* 1992). Die IDM Mutagenese sollte darüber hinaus mit einem Vektor wie pME487 auch auf *Pseudomonas* anwendbar sein (Reimann *et al.* 1988). Und selbst für *Streptomyces* ist mit pFRECD3 ein thermosensitiver Vektor verfügbar (Muth *et al.* 1997).

5 Material und Methoden

5.1 Material

5.1.1 Bakterienstämme

Escherichia coli Stämme

Name	Genotyp	Referenz
DH5 α	<i>deoR, endA1, gyrA96, hsdR17(r_k-m_k+), recA1, relA1, supE44, λthi-1, Δ(lacZYA-argFV169)</i>	Hanahan, 1983
EC101	PEC:: <i>repA</i> , Kan ^r	Law <i>et al.</i> , 1995
XL2-Blue	<i>recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac, [F', proAB, lacIqZΔM15Tn10(Tet^r), Amy, Cam^r]</i>	Stratagene

Salmonella Stämme

Name	Genotyp	Referenz
ATCC 14028	<i>Salmonella choleraesuis</i> Subsp. <i>choleraesuis</i> Sv. Typhimurium, Wildtyp	ATCC

Listeria Stämme

Name	Genotyp	Referenz
EGD Sv. 1/2a	<i>Listeria monocytogenes</i> Wildtyp	S. H. E. Kaufmann
EGD Δ glpD	<i>Listeria monocytogenes</i> EGD Deletionsmutante Δ glpD	diese Arbeit
EGDe Δ hpt	<i>Listeria monocytogenes</i> EGDe Deletionsmutante Δ hpt	M. Beck (unveröffentlicht)
EGD Δ inIA	<i>Listeria monocytogenes</i> EGD Deletionsmutante Δ inIA	Bergmann <i>et al.</i> (2002)
EGD Δ inIAB	<i>Listeria monocytogenes</i> EGD Deletionsmutante Δ inIAB	Bergmann <i>et al.</i> (2002)
EGD Δ inIACGHE	<i>Listeria monocytogenes</i> EGD Deletionsmutante Δ inIACGHE	Bergmann <i>et al.</i> (2002)
EGDe Δ lmo0051	<i>Listeria monocytogenes</i> EGDe Deletionsmutante Δ lmo0051	S. Bauer (unveröffentlicht)
Pkp1	<i>Listeria monocytogenes</i> EGD Mutante Δ plcA/hly/mpl/actA/plcB, Kan ^r	Engelbrecht <i>et al.</i> , 1996

5.1.2 Nährmedien und Agarplatten für Bakterien

<i>E. coli</i> und <i>Salmonella</i>	Luria Bertani (LB)	10 g Trypton bzw. Pepton, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl, dH ₂ O ad 1000 ml, autoklavieren
	Minimalmedium (MM)	50 ml 10x M9, 20% (w/v) Glucose, 1 M MgSO ₄ , 0.1M CaCl ₂ , 20% (w/v) CAA
<i>Listeria</i>	Brain heart infusion (BHI)	37 g BHI (Difco), dH ₂ O ad 1000 ml, autoklavieren
Allgemein	Agar-Selektionsplatten	LB- bzw. BHI- bzw. Minimal-Medium, 15 g Agar / l, Antibiotikum (siehe 5.1.9)

Bei der Herstellung von Agarselektionsplatten wurde stets so vorgegangen, dass das mit Agar versetzte Medium autoklaviert und dann im Wasserbad auf ca. 50 °C abgekühlt wurde. Erst dann wurden Zusätze wie Antibiotika oder andere Marker (in den Endkonzentrationen wie unter 5.1.9 beschrieben) zugegeben.

5.1.3 Zelllinien

Alle verwendeten Zelllinien wurden von der *American Type Culture Collection* ATCC bezogen und sind wie folgt charakterisiert:

Name	Bezugsquelle	Charakterisierung
Caco-2	ATCC HTB-37	Humane Kolon-Darmepithelzellen, 1972 isoliert aus dem Kolon-Adenokarzinom eines 72 Jahre alten Mannes
J774	ATCC TIB-67	Murine Monozyten-Makrophagen

5.1.4 Medien und Zusätze für die Zelllinien

Medien und häufig bei der Zellkultur verwendete Reagenzien:

RPMI	RPMI 1640 mit L-Glutamin (Gibco)
FCS	Fetales Kälberserum (Biochrom KG)
iFCS	Durch 35 Minuten bei 65°C inkubiertes, inaktiviertes FCS
Trypsin/EDTA	Gibco
Gentamycin	10 mg/ml (Sigma)
DMSO	Sigma

5.1.5 Plasmide

Name	Charakterisierung	Referenz
pBluescriptKS	Amp ^r , <i>lacZ</i>	Stratagene
pIDM1	Mutageneseplasmid für Gram-negative, Tet ^r , Ori _{ts} (Gram-negative), <i>repA_{ts}</i>	diese Arbeit
pIDM4	Derivat von pIDM1, zusätzlich P _{lac} und <i>lacI</i>	Knuth <i>et al.</i> , 2004
pBad24- <i>lacI</i>	pBad24 mit <i>lacI</i> , Amp ^r	Knuth <i>et al.</i> , 2004
pLSV1	Mutageneseplasmid für Gram-positive, Em ^r , Ori (Gram-negative), Ori _{ts} (Gram-positive), <i>repF_{ts}</i>	Wuenscher <i>et al.</i> , 1990
pLSV101	Verkleinertes pLSV1 Plasmid	diese Arbeit
pORI(3)	Tet ^r , Ori (RepA-abhängig, Gram-negative)	T. M. Fuchs (unveröffentlicht)
pVE6007	Cam ^r , Ori (RepA-abhängig, Gram-negative und Gram-positive), <i>repA_{ts}</i>	Maguin <i>et al.</i> , 1992

5.1.6 Primer

Name	Sequenz 5' – 3'
AroAfor1	GCTGTCGACATGCAGCGTGGTGAGGGG
AroArev1	GGATCTAGAAACCCACAGACTGGCCGTGG
GlpDa	CTGGATCCGTGGCTGAGAGATTTAAATCC
GlpDb2	GAAGATCTTGAAAATAATTGTACCATTTTG
GlpDc2	GAAGATCTGATGCTAGAGAACCGGC
GlpDd	CTGGATCCGTGCCTTATCTTCGCTTACG
GlpD-nested1	CTGGATCCGTCCCTACCGCCAAACTAGC
GlpD-nested3	GGAATTCTTTCCGCCAACAATAATTGG
IDM42	GGCAATTATCAGTGTGG
InIC1	TGGAATTCGCAGTAATAGCAATGCTAG
InIC2	TGGAATTCCTCTCGTGATTATACGAG
LacZ1	CATGCCATGGAAGAGCGCCCCAATAC
LacZ2	CATGCCATGGCTGCGCGTAACCACC
LM1	ACTCATTCGTTCCGGAGG
LSV3	AGTACCATTACTTATGAG
LSV-4380rev	AGGGTTTTCCCAGTCACG
MSLmethylase1	TGCGAAGCTTCGTGCTGACTTGCACC
MSLmethylase2	TGCGAAGCTTCCTACAAGGGGTCC
OL30-N8	AAGTCGACGGATCCGGTACCTNNNNNNNN
OL30	AAGTCGACGGATCCGGTACCT
PhoP3	CCCCAAAGCACCATAATCAACGC
RepAts4	TTGGCGCGCAGATCTCGCGTTTTTAGAAGG
RepAts5	CCATCGATCCATGGTACTTAATTCAACTTCC
SRMgb2	ATACCGTCGACCTCGAG

5.1.7 Enzyme und Standards

<i>Bam</i> HI	10 U/μl (MBI Fermentas), 10x Puffer BamHI+
<i>Eco</i> RI	10U/μl (MBI Fermentas), 10x Puffer EcoRI+ oder R+
<i>Hind</i> III	10U/μl (MBI Fermentas), 10x Puffer R+
<i>Kpn</i> I	10U/μl (MBI Fermentas), 10x Puffer KpnI+
<i>Nco</i> I	10U/μl (MBI Fermentas), 10x Puffer Y+/Tango
<i>Mbo</i> I= <i>Sau</i> 3A	10 U/μl (Pharmacia), 10x Puffer
<i>Sal</i> I	10U/μl (MBI Fermentas), 10x Puffer 0+
T4 Ligase	5 U/μl (Gibco BRL bzw. BioLabs)
SAP	Shrimp alkaline phosphatase (Boehringer Mannheim), 10x Puffer
CIAP	Calf intestine alkaline phosphatase (MBI Fermentas), 10x Puffer
Taq Polymerase	5 U/μl (Amersham Pharmacia Biotech), 10x Puffer 5 U/μl (Q-BIOgene) 10x Puffer
Pfu Polymerase	3 U/μl (Promega), 10x Puffer mit 20 mM MgSO ₄
Klenow-Enzym	MBI Fermentas
Peqlab Gold	Längenstandard für DNA (bps) in der Gel-Elektrophorese (Peqlab)
Generuler 1 kb	Längenstandard für DNA (bps) in der Gel-Elektrophorese (MBI Fermentas)
LMW	Marker für Proteine (kDa) in der SDS-Page (Amersham Pharmacia)

5.1.8 Häufig verwendete Lösungen und Puffer

50x TAE	242 g Tris-HCl 57,1 ml Essigsäure 100 ml 0,5 M EDTA pH8,0 dH ₂ O ad 1 l
10x TE	100 mM Tris-HCl pH 7,4 10 mM EDTA
20x PBS	160 g NaCl 4 g KCl 23 g Na ₂ HPO ₄ (wasserfrei) 4 g KH ₂ PO ₄ (wasserfrei) dH ₂ O ad 1 l
20x Mg ²⁺ Ca ²⁺	2 g MgCl ₂ x 6 H ₂ O 2 g CaCl ₂ x 2 H ₂ O dH ₂ O ad 1 l
2,5x Gel-Ladepuffer	3,6 g Harnstoff 7,5 g Saccharose 279 mg Na ₂ EDTA 15 mg Bromphenolblau 15 mg Xylencynol dH ₂ O ad 15 ml

6x Gel-Ladepuffer	37,5 mg Bromphenolblau 37,5 mg Xylencynol 6 g Saccharose dH ₂ O ad 15 ml
SOB Medium	20 g Bacto Tryptone 5 g Bacto Yeast Extrakt 500 mg NaCl 200 mg KCl dH ₂ O ad 1 l
SOC Medium	48 ml SOC 1 ml 1 M MgSO ₄ 1 ml 1 M Glucose
Sonication buffer	0,3 M Natrium Acetat 10 mM Tris-HCl pH 7.6 1 mM EDTA, 30% Glycerin
Ethidiumbromid	10 mg/ml in dH ₂ O

5.1.9 Antibiotika

Antibiotika wurden fast ausschliesslich von der Firma Sigma geliefert, in dH₂O oder 70 %igem Ethanol gelöst und bei -20 °C gelagert. Angegeben sind die eingesetzten Endkonzentrationen:

Ampicillin (50 µg/ml), Chloramphenicol (10 µg/ml), Erythromycin (5 µg/ml für Gram-positive, 300 µg/ml für Gram-negative), Kanamycin (25 µg/ml), Streptomycin (50 µg/ml), Tetrazyklin (17,5 µg/ml für Gram-negative, 7,5 µg/ml für Gram-positive).

5.1.10 Chemikalien

Sofern nicht ausdrücklich vermerkt, hatten alle Chemikalien p. A.-Qualität.

Bei der Creatogen AG: Chemikalien wurden bezogen von Merck, Roth oder Sigma, mit Ausnahme von: Agarose (Seakam, BMA), Agar (Remel), Bacti Casein Pepton (Remel), Hefeextrakt (Remel), Nukleotide (MBI Fermentas).

In der Universität Würzburg: Chemikalien wurden bezogen von Aldrich, Boehringer, Bio-Rad, Difco, Ferak, Gibco BRL, Merck, Roth, Serva, Sigma und USB.

5.1.11 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Für die Arbeiten bei der Creatogen AG Augsburg wurden folgende Geräte und Materialien (Bezugsquelle in Klammern) verwendet:

Agarose-Gel-Apparaturen (BioRad), Brutschränke und CO₂-Inkubatoren (Heraeus), *E. coli* Pulser (BioRad), Einmalküvetten (Roth), Eismaschine (Scotsman), Elektroporationsküvetten (BioRad), Elisa-Reader (Elx 800, Bio-Tek Instruments), Filter für Sterilabsaugeinheit (Sartorius), Gasbrenner (Integra Biosciences), Glaswaren (Schott), Hamilton-Spritzen (Hamilton Bonaduz AG), Heizblöcke (Grant), Hybridisierungsöfen (Stuart Scientific), Kanülen und Einmalspritzen (Braun, Terumo), Kühl- und Gefrierschränke (Heraeus, Liebherr, New Brunswick Scientific), 3 MM-Papier und GF-Filterpapier (Schleicher&Schuell), Lichtmikroskop invers (Wilovert A, Hund), Magnetrührer (Heidolph), Mehrkanalpipette (Brand, Eppendorf), Mikrowellenherd (Quelle), Milli-Q Ultra Pure Water System (Millipore), Parafilm (Roth), Pasteurpipetten (Volac), PCR Geräte (T3 und Uno von Biometra, Robocycler von Stratagene), Plastikwaren (Biozym, Brand, Eppendorf, Falcon, Greiner, Nunc, Sarstedt), pH-Meter (WTW), Pipetten (Eppendorf), Pipettierhilfen (Brand, Hirschman), Schüttelinkubator (New Brunswick Scientific), Spannungsgeräte (BioRad), Speedvac (Eppendorf), Sterilbänke (Heraeus), sterile Spritzenfilter (Roth), Thermopapier (Sony), Ultraschallhomogenisator Sonopuls (Bandelin), UV/VIS-Spektralphotometer (Ultrospec 3000, Amersham Pharmacia Biotech), UV-Transilluminator (Phero-Lum, Biotec-Fischer), VE-Anlage (Werner), Videodokumentationsanlage (Syngene), Vortex (Scientific Industries), Waagen (OHAUS), Wasserbäder (GFL), Zentrifugen und Zubehör (Eppendorf, Heraeus).

Für die Arbeiten in der Universität Würzburg wurden folgende Geräte und Materialien (Bezugsquellen in Klammern) verwendet:

Agarose-Gel-Apparaturen (BioRad), Autoklaven (Webeco, Münchener Medizin Mechanik), Brutschränke (Heraeus, Salvis), CO₂-Inkubatoren (Nunc Cellstar), *E. coli* Pulser (BioRad), Einmalfilter für Spritzen (Millipore), Einmalfiltriereinheit für 500 ml Volumen (Millipore), Einmalküvetten (Hartenstein), Einmalspritzen (Braun bzw. Henke Sass Wolf GmbH), Eismaschine (Scotsman), Elektroporationsküvetten (BioRad), Gasbrenner (Fireboy Eco, Tecnomara), Glaswaren (Schott), Heizblöcke (Liebisch bzw. Eppendorf), Kühl- und Gefrierschränke (diverse), Lichtmikroskop invers, Magnetrührer (Heidolph), Mehrkanalpipette (Brand, Eppendorf), Mikrowellenherd (Siemens), Parafilm (Roth), Pasteurpipetten (Brand), PCR Gerät (Applied Biosystems bzw. Perkin Elmer), Plastikwaren (Brand, Greiner, Laborcenter), pH-Meter (WTW), Pipetten (Eppendorf), Pipettierhilfen (Brand), Schüttelinkubator (Infors), Spannungsgeräte (BioRad), Speedvac (Eppendorf), Sterilbänke (Heraeus, NuAire, Flow Gelaire), Thermopapier (Mitsubishi), Tischzentrifuge (Heraeus), Ultraschaller (Branson), UV/VIS-Spektralphotometer (Ultrospec III Fa. Pharmacia

Biotech, Klett Summerson), Sequencer (XL2000, Beckman and Coulter), Sequencing Kit (DTCS Quickstart Kit, Beckman and Coulter), UV-Transilluminator (Desaga), Videodokumentationsanlage (Mitsubishi), Vortexer (Heidolph), Waagen (Sartorius), Wasserbad-Inkubatoren (Mettler), Zentrifugen und Zubehör (Eppendorf, Beckman), Zellkultur-Flaschen und –Schalen (Costar, Greiner).

5.1.12 Kits

GFX PCR DNA Purification Kit, Amersham Pharmacia Biotech	Aufreinigung von PCR DNA oder Restriktionen
GFX Micro Plasmid Prep Kit, Amersham Pharmacia Biotech	Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> im Mini-Maßstab
Midi Prep Kit AX100, Macherey-Nagel	Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> im Midi-Maßstab
QIAquick PCR Purification Kit, Qiagen	Aufreinigung von PCR DNA und Restriktionen

5.1.13 Software

Diese Arbeit wurde mit Hilfe von folgender Software erstellt:

Adobe Photoshop, CloneManager 5.0, Genomepaint, Literat, Microsoft Office

5.1.14 Datenbanken und Internetadressen

<http://www.genolist.pasteur.fr/ListiList/>

<http://www.genome.ad.jp/kegg/>

<http://www.genome.wustl.edu/>

<http://mbgd.genome.ad.jp/>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

<http://www.pedant.gsf.de/>

<http://www.sanger.ac.uk>

<http://shigen.nig.ac.jp>

5.2 Methoden

5.2.1 Mikrobiologische Methoden

5.2.1.1 Steriles Arbeiten

Die für das Arbeiten mit Bakterien verwendeten Materialien und Lösungen wurden stets sterilisiert – entweder durch Autoklavieren für 25 Minuten bei 121 °C und 100 kPa Druck, durch Filtration (Filter 0,2 oder 0,45 µm, von Sartorius bzw. Millipore) oder durch Hitzesterilisation für 4 Stunden bei 160 °C. Um Kontaminationen vorzuwirken, wurden Anzucht und Behandlung von Bakterien oder Zelllinien immer an einer Werkbank durchgeführt, die zuvor mit 70 %igem Ethanol gereinigt worden war. Ebenso wurden die Arbeits- und Inkubationsmaterialien, sofern möglich, vor und nach Behandlung der Bakterien an einem Bunsenbrenner abgeflammt.

5.2.1.2 Anzucht und Kultur von Bakterien

Salmonella, *E. coli* und *Listeria* Stämme wurden bei 37 °C in dem für sie adäquaten Medium oder den entsprechenden Agarplatten angezogen, mit Ausnahme von Stämmen, die in trans ein temperatursensitives Plasmid enthielten. Diese wurden bei der für die spezifischen Plasmide permissiven Temperatur von 30 °C inkubiert. Die Inkubationszeit variierte je nach Bakterienstamm und Vorhaben zwischen 1 und 6 Tagen.

5.2.1.3 Einfrieren von Bakterien

Für die Konservierung von Bakterienstämmen wurde eine ÜNK angezogen und 1 ml daraus mit 20% Glycerin (Endkonzentration) versetzt. Die Stämme wurden bei –80 °C gelagert. Anzucht aus und Überführung in diese Stammsammlung fanden stets unter sterilen Bedingungen statt.

5.2.1.4 Untersuchung des *in vitro* Wachstumsverhaltens von Bakterien

Ausgehend von einer ÜNK des zu untersuchenden Bakterienstammes wurde am Morgen die ÜNK 100fach verdünnt, indem 0,1 ml ÜNK in 10 ml frisches Medium in einen Klett-Kolben inokuliert wurden und die Kultur bei der adäquaten Wachstumstemperatur im Schüttler inkubiert wurde. Die Zunahme der Bakterienzahl und damit das Wachstum der Bakterien wurde alle 30–60 Min im Klett-Photometer als Trübungszunahme gemessen. Die grafische Auftragung der gemessenen Klett-Einheiten gegen die Zeit resultierte in einer Wachstumskurve.

5.2.2 Molekularbiologische Methoden

5.2.2.1 Allgemeine molekular- und zellbiologische Methoden

Bei den allgemeinen Arbeitstechniken wurde ausschließlich vollentsalztes Wasser verwendet, welches als dH₂O oder VE Wasser bezeichnet wird.

Für molekular- und zellbiologische Arbeiten, sowie für Puffer und Lösungen wurde sterilisiertes Wasser verwendet, welches entweder autoklaviert (25 Min bei 121 °C und 100 kPa Druck) oder filtriert (0,22 µm Filter, Sartorius bzw. Millipore) worden war.

5.2.2.2 Isolierung chromosomaler DNA aus *Salmonella*

1,5 ml einer ÜNK wurden für 5 Min bei 5500 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Bakterienpellet in 400 µl Lyse-Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von 100 µl Lysozym (10 mg/ml in Lyse-Puffer) folgte eine 15 minütige Inkubation auf Eis. Anschließend wurden 10 µl 10% (w/v) SDS und 5 µl Proteinase K (10 mg/ml) zugegeben, die Probe gemischt und über Nacht bei 55 °C im Hybridisierungsofen oder im Thermoblock inkubiert. Die Präzipitation der DNA erfolgte durch Zugabe von 500 µl Isopropanol. Mit Hilfe einer gelben Spitze wurde die DNA entnommen, in ein steriles, frisches Eppendorfgefäß überführt und anschließend je einmal mit 96 % (v/v) Ethanol und 70 % (v/v) Ethanol gewaschen. Nach dem Lufttrocknen der DNA wurde das Pellet in 500 µl TE-Puffer pH 7.4 mit 1 µl Rnase (10 mg/ml) gelöst und die Konzentration bestimmt.

Lyse-Puffer 100 mM Tris-HCl, pH 8.0, 5 mM EDTA, 200 mM NaCl

5.2.2.3 Isolierung chromosomaler DNA aus *Listeria*

Für die Isolierung chromosomaler DNA aus *Listeria* wurden 12 ml ÜNK für 15 Min bei 5500 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Bakterienpellet in 6 ml 0,1x SSC Puffer suspendiert. Diese Bakterienlösung wurde erneut zentrifugiert und schließlich das Pellet in 1,2 ml Resuspensionspuffer I (RP I) aufgenommen. Nach mehrstündiger Inkubation bei 37 °C (mit gelegentlichem Schütteln) wurden 9 ml Lysepuffer zugegeben. Das Lysat wurde dann über Nacht bei 37 °C im Hybridisierungsofen rotierend inkubiert. Anschließend wurde es durch Phenol-Chloroform-Extraktion aufgereinigt. Hierfür wurde die Lösung zwei Mal mit einem Volumen Phenol-Chloroform und ein Mal mit einem Volumen Chloroform gewaschen. Durch Zentrifugation (6000 rpm, 40 Min, 18 °C) wurde die wässrige, DNA-enhaltende Phase von der Chloroformphase getrennt und abpipettiert. Durch Zugabe von einem Volumen Isopropanol wurde die DNA ausgefällt und konnte der Lösung mit Hilfe einer Pipette entnommen werden. Die DNA-Fäden wurden abschließend in einer Ethanol-Präzipitation ein weiteres Mal gereinigt und gefällt, bevor sie dann in 100 µl

Resuspensionspuffer II (RP II) suspendiert und mit RNase behandelt wurden (Zugabe von 10 µl 10 mg/ml RNase und Inkubation bei 37 °C für 30 Min).

1x SSC, pH 7	3 M NaCl, 300 mM Na-Citrat
RP I, pH 7	20% Sucrose, 10 mM Natrium-Phosphat, 10 mg/ml Lysozym
Lysepuffer, pH 8	10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 1% SDS, 500 µg/ml Proteinase K
RP II, pH 8	40 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA

5.2.2.4 Isolierung von Plasmid-DNA (Mini-Maßstab)

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus Gram-negativen sowie aus Gram-positiven Bakterien im analytischen Maßstab erfolgte mit Hilfe des *GFX Micro Plasmid Preparation Kits* von Amersham Pharmacia Biotech, dem das Prinzip der alkalischen Lyse mit anschließender säulenchromatographischer Bindung der DNA zu Grunde liegt.

Zunächst wurden 3 ml einer ÜNK abzentrifugiert und das erhaltene Pellet oder aber direkt einige Impfösen voll Bakterienmaterial in 300 µl Lösung I suspendiert. Durch Zugabe von 300 µl Lösung II wurde die Zelllyse eingeleitet. Wichtig bei diesem und dem nachfolgenden Schritt ist, dass die Suspension nicht gevortext wird, was eine Kontamination der Plasmid-DNA-Lösung mit gescherter chromosomaler DNA verhindern soll. Anschließend wurden 600 µl Lösung III zupipettiert, was den pH Wert der Suspension neutralisierte. In einer 5 minütigen Zentrifugation (13000 rpm, 4 °C) wurden Zelldebris und chromosomale DNA sedimentiert und von der klaren Plasmid-DNA-Lösung getrennt. Letztere wurde auf die mitgelieferte Glasfibrermatrix-Säule pipettiert und durch Zentrifugation (1 Min, 13000 rpm, RT) an die Matrix gebunden. Mit 400 µl Waschpuffer wurde die DNA gewaschen und schließlich mit 30–50 µl dH₂O eluiert.

5.2.2.5 Isolierung von Plasmid-DNA (Midi-Maßstab)

Für die Isolierung von größeren Mengen Plasmid-DNA aus Gram-negativen und Gram-positiven Bakterien wurde der *Nucleobond AX100 Plasmid Midi Preparation Kit* von Macherey und Nagel verwendet. Hierbei wird die Plasmid-DNA nach Lyse der Bakterien über eine Anionenaustauschersäule säulenchromatographisch gereinigt.

Je nach Kopienzahl des Plasmids wurden 50–300 ml einer ÜNK abzentrifugiert und das Pellet in 4 ml Puffer S1 pro 50 ml ÜNK suspendiert. Durch Zugabe von 4 ml Puffer S2, mehrfaches Invertieren und Inkubation bei RT für 5 Min wurde die alkalische Lyse der Bakterienzellen eingeleitet. Es folgte die Zugabe von 4 ml Puffer S3, wiederum ein leichtes Schwenken der Suspension und eine Inkubation von 5 Min auf Eis. In der anschließenden 25 minütigen Zentrifugation bei 4500 rpm und 4 °C wurden Zelldebris und die chromosomale DNA sedimentiert. Der klare, die Plasmid-DNA enthaltende Überstand wurde auf die zuvor äquilibrierte (2,5 ml Puffer N2)

Nucleobond Ax100 Säule pipettiert. Die Säule wurde dann mit zwei Mal mit 4 ml Puffer N3 gewaschen und die Plasmid-DNA schließlich mit 5 ml Puffer N4 eluiert. Für die Präzipitation wurde die DNA-Lösung mit 0,7–0,8 Volumen Isopropanol versetzt und bei 14000 rpm, 4 °C für 30 Min zentrifugiert. Nach einem Waschschrift (200 µl 70% iger Ethanol) wurde die DNA getrocknet und in einem adäquaten Volumen dH₂O gelöst.

5.2.2.6 Ethanol-Präzipitation von DNA

Der zu fällenden DNA-Lösung wurden 1/10 Volumen 3 M Na-Acetat, pH 5,5 und 2,5 Volumen absoluter, kalter Ethanol zugegeben. Das Gemisch wurde dann für ca. 60 Min bei –20 °C inkubiert. Nach der Fällung durch Zentrifugation (14000 rpm, 20–30 Min, 4 °C) wurde das DNA-Pellet noch zwei Mal mit 70 %igem (v/v), kaltem Ethanol gewaschen. Nach Trocknung der pelletierten DNA in der Speed-Vac wurde sie in einem adäquaten Volumen von dH₂O aufgenommen.

5.2.2.7 PEG-Präzipitation von DNA

Die DNA-Lösung wurde mit 1x TE-Puffer auf ein Volumen von 50 µl aufgefüllt, mit 30 µl PEG versetzt und durch Invertieren gemischt. Nach einer 30 minütigen Inkubation auf Eis folgte eine Zentrifugation bei 14000 rpm, 4 °C, für 30 Min. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet mit ca. 200 µl 70 %igem (v/v) Ethanol gewaschen, um Salze zu entfernen. Anschließend wurde das Pellet getrocknet und in dH₂O oder TE-Puffer aufgenommen.

PEG 20% PEG 6000, 2,5 M NaCl

5.2.2.8 DNA Quantifizierung

Für die Ermittlung der Konzentration einer DNA-Lösung wurde ein Aliquot der entsprechenden Lösung mit dH₂O 30–100fach in einem Endvolumen von 100 µl verdünnt und in einer Quarzküvette im UV/VIS Spektrometer bei $\lambda = 260$ nm photometrisch untersucht. Die absolute DNA-Konzentration wurde nach Lambert-Beer ($E = d \cdot \epsilon \cdot C$) berechnet, wobei der molekulare Extinktionskoeffizient für DNA bei 50 µg/ml liegt. Der Quotient der DNA-Absorption bei $\lambda = 260$ nm und $\lambda = 280$ nm gab zusätzlich Aufschluß über die Reinheit der DNA-Lösung.

5.2.2.9 PCR-Amplifikation von DNA

Für die Amplifikation von DNA wurden Polymerase-Ketten-Reaktionen (PCR) in Thermocyclern durchgeführt. Als Matrize diente entweder Zelllysat, das durch Suspension einer Einzelkolonie in 100 µl dH₂O gewonnen wurde, oder gereinigte DNA. PCR-Amplifikate für Klonierungen wurden mit einer proof reading Polymerase (Deep Vent Polymerase, New England Biolabs bzw. Pfu Polymerase, Promega) generiert, Amplifikate zu Analysezwecken hingegen mit der thermostabilen Taq Polymerase

(Amersham Pharmacia Biotech bzw. Q-BIOgene). Nach einem ersten Denaturierungsschritt (94–96 °C, 5 Min) folgten 25–35 Zyklen von Denaturierung (94–96 °C, 25–30 Sek), Annealing der Primer (50–60 °C, 25–30 Sek) und Synthese von komplementären DNA-Strängen (72 °C, 60–120 Sek) an den 3'-OH-Enden der Primer durch die zugegebene Polymerase. In einer finalen Elongation (72 °C, 4–8 Min) wurden alle Synthesereaktionen abgeschlossen.

Ein PCR-Ansatz setzte sich in der Regel aus folgenden Komponenten zusammen:

DNA	20–100 ng bzw. 4 µl Zelllysat
PCR-Puffer	5 µl
dNTPs	125–200 µM
Primer 1	20–30 µM
Primer 2	20–30 µM
Polymerase	0,75–2 U
dH ₂ O	ad 50 µl

5.2.2.10 Sequenzierung von DNA

Sollte zu Zwecken der Überprüfung oder Identifizierung die Sequenz von spezifischen DNA-Abschnitten (PCR-Produkte, Ligations-Produkte, Vektor-Fragmente etc.) ermittelt werden, wurde ausschließlich automatisiert (XL2000, Beckman and Coulter) sequenziert. Dabei werden Didesoxyribonukleotide, die mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind und die den basenspezifischen Kettenabbruch bewirken, eingesetzt. Aus Kettenlänge und Fluoreszenzfarbe wird dann automatisch die DNA-Sequenz abgeleitet.

Das zu sequenzierende *template* wurde nach Anleitung des Herstellers vorbereitet und dann in eine Thermocycling-Reaktion eingesetzt. Entweder wurde ein PCR-Produkt generiert und aufgereinigt oder es wurde Plasmid-DNA aus Stämmen isoliert und ebenfalls aufgereinigt. Plasmid-DNA wurde vor Einsatz in die Thermocycling-Reaktion durch Hitze gesichert (96 °C, 3 Min).

Thermocycling: 1-2 µl aufgereinigtes, ev. hitzebehandeltes *template*
5 pmol Primer
4 µl Quickstart Mix
dH₂O ad 20 µl

PCR-Programm: 96 °C, 20 Sek, 50 °C, 20 Sek, 60 °C, 4 Min: 30x / 4 °C unbegrenzt

Anschließend wurden die Sequenzierproben wie von dem Hersteller angegeben, aufgereinigt. Hierfür wurden die Ansätze in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt und mit 5 µl Stopp-Lösung versetzt. Nach Zugabe von 60 µl kaltem (-20 °C), reinem EtOH wurden die Proben 1 Min mit 14000 rpm bei 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde dann zwei Mal mit ebenfalls kaltem, 70 %igem EtOH gewaschen und schließlich in der Speedvac getrocknet. Nach Suspension der gefällten und gewaschenen DNA in

40 µl SLS wurden die Proben an Fr. Silke Fregin vom Lehrstuhl für Mikrobiologie abgegeben, die die automatische Sequenzierung durchführte.

Stopp-Lösung 2 µl 3 M Na-Acetat (pH 5,2), 2 µl 100 mM EDTA,
 1 µl 20 mg/ml Glycogen

5.2.2.11 Restriktion von DNA mittels Restriktionsendonukleasen

Restriktionen, d.h. die Hydrolyse von Phosphodiesterbindungen doppelsträngiger DNA innerhalb bestimmter, palindromisch angeordneter Tetra-, Penta- oder Hexanukleotidsequenzen, erfolgte stets unter den vom Hersteller angegebenen Bedingungen und dem entsprechenden mitgelieferten Puffer.

Restriktionsansätze für nachfolgende molekulargenetische Arbeiten wurden in einem Gesamtvolumen von 30–50 µl durchgeführt, wobei 5–10 µg Plasmid-DNA mit 2–4 units Enzym/µg DNA in der Regel bei 37 °C für 2–5 Stunden inkubiert wurden. Der Reaktionsansatz wurde anschließend über Säulen des *GFX PCR DNA Purification Kits* oder des *QIAquick PCR Purification Kits* aufgereinigt (siehe 5.2.2.14) und Aliquots davon auf dem Agarosegel analysiert (siehe 5.2.2.16).

Analytische Restriktionen hingegen wurden in einem Gesamtvolumen von 15 µl durchgeführt. Die eingesetzte DNA-Menge betrug 0,2–1 µg, die Enzymmenge 3–4 units/µg DNA. Nach 1–2 stündiger Inkubation bei 37 °C wurde der gesamte Restriktionsansatz auf ein Agarosegel aufgetragen und analysiert (siehe 5.2.2.16).

5.2.2.12 Dephosphorylierung von linearer DNA

Im Falle dass ein durch eine singuläre Restriktionsendonuklease hydrolysiertes Plasmid mit einem Fragment ligiert werden sollte, wurde das linearisierte Plasmid einer Phosphatasebehandlung unterzogen, um eine Religation mit sich selbst, d. h. eine Rezirkularisation ohne Aufnahme des Fragments, zu verhindern. Hierfür wurde entweder die *Shrimp alkaline phosphatase* SAP oder die *Calf intestine alkaline phosphatase* CIAF entsprechend dem Protokoll des Herstellers verwendet. Im Anschluß an die Dephosphorylierung wurde das entsprechende Enzym stets durch Hitze inaktiviert und teilweise auch noch über eine Säule aufgereinigt (siehe 5.2.2.14).

Dephosphorylierung mit SAP:

DNA-Lösung	100–500 ng	Inkubation 37 °C 15 Min,
Dephosphorylierungspuffer (10x)	0,9 µl	anschließend 65 °C 20 Min
SAP (1 U/µl)	1 µl	(Hitzeinaktivierung)
dH ₂ O	ad 9 µl	

Dephosphorylierung mit CIAP:

DNA-Lösung	100–500 ng	Inkubation 37 °C 30 Min, anschließend 85 °C 15 Min (Hitzeinaktivierung)
Dephosphorylierungspuffer (10x)	0,9 µl	
CIAP (1 U/µl)	1 µl	
dH ₂ O	ad 9 µl	

5.2.2.13 Ligation von DNA

Mit Hilfe der T4 DNA Ligase, die unter ATP-Verbrauch die Kondensation einer 5'-P- mit einer 3'-OH-Gruppe katalysiert, wurden Vektor- und Fragment-DNA, die zuvor mit der bzw. den gleichen Restriktionsendonuklease(n) (siehe 5.2.2.11) hydrolysiert worden waren, miteinander ligiert, wobei ein Übermaß an Fragment-DNA (Faktor 2–4, in Abhängigkeit von seiner Länge) eingesetzt wurde. Im Falle dass über nur eine Restriktionsschnittstelle ligiert wurde, wurden die Ligationskomponenten in der Regel direkt in den hitzeinaktivierten Dephosphorylierungsansatz pipettiert. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei RT oder bei 16 °C im Wasserbad. Der Ligationsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

Linearisierte Plasmid-DNA (bzw. ggf. Dephosphorylierungsansatz)	100–500 ng (9 µl)
Fragment-DNA	100–1000 ng
5x Ligasepuffer	4 µl
T4 Ligase	1 µl
dH ₂ O	ad 20 µl

5.2.2.14 Säulenchromatographische Aufreinigung von DNA

DNA aus PCR- oder Restriktionsansätzen wurde mit Hilfe *des GFX PCR DNA Purification Kits* (Amersham Pharmacia) oder *des QIAquick PCR Purification Kits* (Quiagen) (siehe 5.1.12) aufgereinigt. Beide Protokolle beruhen auf dem Prinzip der Bindung von DNA an eine Glasmatrix und Elution mit dH₂O nach Entfernung von Salz und Proteinen.

GFX Protokoll:

Die zu reinigende DNA-Lösung wurde in 500 µl Capture Buffer aufgenommen und auf die mitgelieferte Säule pipettiert. Nach einer 1 minütigen Zentrifugation mit 12000 rpm, RT, wurden 500 µl Wash Buffer auf die Säule gegeben und wiederum zentrifugiert. Die Elution der DNA von der Säule erfolgte mit 30–50 µl dH₂O durch erneutes Zentrifugieren.

QIAquick Protokoll:

Der zu reinigenden DNA wurden 5 Volumen Puffer PB zugesetzt. Die Lösung wurde dann auf die mitgelieferte Säule gegeben und auf die Matrix zentrifugiert (1 Min, 12000 rpm, RT). Nach Zugabe von 750 µl Waschpuffer PE wurde wiederum zentrifu-

giert. Schließlich wurde die DNA mit 30–50 µl dH₂O von der Säule eluiert durch erneutes Zentrifugieren.

5.2.2.15 Aufreinigung von DNA mit Phenol und Chloroform

Im Anschluss an Elution von DNA aus einem Agarosegel (siehe 5.2.2.16) kann diese durch Phenol-Chloroform-Extraktion aufgereinigt werden. Zunächst wurden der DNA-Lösung 0,5 Volumen Phenol und 0,5 Volumen Chloroform zugegeben, der Ansatz wurde dann gevortext und 15 Min bei RT und 6000 rpm zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase wurde abpipettiert und erneut mit je 0,5 Volumen Phenol und Chloroform versetzt und zentrifugiert. Dieser Extraktionsschritt wurde noch ein drittes Mal wiederholt bevor die DNA-Lösung dann mit einem Volumen Chloroform auch vom Phenol gereinigt wird. Die DNA in der wässrigen Phase wurde abschließend durch EtOH-Fällung präzipitiert und in dH₂O gelöst (siehe 5.2.2.6).

5.2.2.16 Analytische und präparative Agarosegel-Elektrophorese

Für die Auftrennung von DNA-Fragmenten entsprechend ihrer Länge in Basenpaaren wurde die horizontale Gel-Elektrophorese angewandt, wobei 0,8–1,6 %ige (w/v) Agarosegele verwendet wurden. Die Agarose wurde in 120 ml 1x TAE Puffer (siehe 5.1.8) gelöst und aufgekocht und nach dem Abkühlen auf ca. 50 °C mit 10 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml stock) versetzt. Die noch flüssige Agarose wurde dann luftblasenfrei in den Gelträger gegossen, in den zur Formung der Probenaschen zuvor Kämme eingesetzt worden waren. Nach vollständiger Polymerisierung des Gels wurde die Gelkammer komplett mit 1x TAE Puffer gefüllt und die Kämme wurden entfernt. Die DNA-Fragmente wurden mit 2,5x oder 6x Laufpuffer (siehe 5.1.8) vermischt und aufgetragen. Parallel dazu wurde als Längenstandard eine DNA Leiter (siehe 5.1.7) mitaufgetragen, anhand derer die Länge der zu analysierenden bzw. zu präparierenden DNA-Fragmente bestimmt werden konnte. Die Elektrophorese erfolgte bei 80–100 V für 50–90 Minuten. Durch Bestrahlung mit UV-Licht ($\lambda=302$ nm) in einem Transilluminator wurde die Fluoreszenz des in die DNA interkalierten Ethidiumbromids angeregt und dadurch die DNA-Banden auf dem Gel sichtbar.

Für eine präparative Gel-Elektrophorese wurden größere Gel-Taschen geformt und es wurde mehr DNA aufgetragen. Die DNA-Bande von Interesse wurde im UV-Licht mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und in ein Eppendorf-Cap überführt. Zur Gelbande hinzu wurden dann pro 10 µg Gel 10 µl Capture Buffer aus dem *GFX PCR DNA Purification Kit* gegeben und das gevortexte Gemisch bei 65 °C so lange inkubiert, bis sich die Agarose aufgelöst hatte. Es folgte dann wie unter 5.2.2.14 beschrieben eine säulenchromatographische Aufreinigung dieser DNA mittels *GFX Kit* oder eine Aufreinigung per Phenol-Chloroform-Extraktion (siehe 5.2.2.15).

5.2.2.17 Elektroelution

Alternativ zur präparativen Gelelektrophorese wurden DNA-Fragmente, die in einem Agarosegel aufgetrennt und sichtbar gemacht worden waren, in einem Dialyseschlauch aus dem Gel eluiert. Der Schlauch wurde zunächst an einem Ende mit einer Klammer abgedichtet, dann mit ca. 400 µl TE-Puffer und dem Gelstück gefüllt und auch am anderen Ende, nach luftblasenfreier Minimierung des TE-Volumens durch Ausstreichen, abgedichtet. Der Schlauch wurde dann in eine mit 1x TAE-Puffer gefüllte Agarosegel-Apparatur gegeben und es wurde eine Spannung von ca. 100 V angelegt. Nach einer Elutionszeit von 30–90 Min wurde das elektrische Feld für 1 Min umgepolt, um die DNA von der Schlauchwand wieder zu lösen. Das Eluat mit den Fragmenten wurde dann in ein Eppendorf-Cap überführt und in einer Chloroform-Phenol-Extraktion aufgereinigt (siehe 5.2.2.15), bevor die Fragmente dann in Klonierungen oder Genbank-Konstruktionen eingesetzt wurden.

5.2.2.18 Herstellung elektrokompetenter Zellen von *E. coli* und *Salmonella*

Für die Präparation elektrokompetenter Zellen von *E. coli* und *Salmonella* wurde zunächst mit einer ÜNK eine Kultur des entsprechenden Stammes in 200–500 ml LB Medium (mit Antibiotikum falls nötig) angeimpft und bei der entsprechenden optimalen Wachstumstemperatur inkubiert. Die Zunahme der Bakteriendichte wurde photometrisch verfolgt und bei einer $OD_{600}=0,5-0,7$ wurden die Zellen in 50 ml Zentrifugationsröhrchen überführt und zum Abkühlen 15 Min auf Eis gestellt. Durch mehrere Wasch- und Zentrifugationsschritte (5500 rpm, 10 Min, 4 °C) wurde die Bakterienkultur von Salzen befreit und konzentriert, bevor sie dann in 50–100 µl Aliquots in –80 °C eingelagert wurde. Unten angeführte Tabelle zeigt die Waschschritte mit 5 %igem und 10 %igem Glycerin für eine 300 ml Ausgangskultur.

Zentrifugationsschritt	Suspension der Pellets
Zentrifugation I	6x 50 ml 5% Glycerin
Zentrifugation II	6x 20 ml 5% Glycerin → 3x 40 ml
Zentrifugation III	3x 2 ml 5% Glycerin → 1x 6 ml
Zentrifugation IV	1x 1,2 ml 10% Glycerin → Aliquots à 50 –100 µl

Tabelle 10: Protokoll zur Herstellung von elektrokompetenten Zellen von *E. coli* und *Salmonella*. Aufgelistet sind die einzelnen Zentrifugations- und Waschschritte ausgehend von einer 300 ml Kultur.

5.2.2.19 Herstellung elektrokompetenter Zellen von *Listeria*

Ausgehend von einer ÜNK wurde für die Präparation von elektrokompetenten Zellen von *Listeria* eine Kultur des entsprechenden Stammes in einem Volumen von 50–300 ml angeimpft und bei optimaler Wachstumstemperatur inkubiert. Die Zunahme der Bakteriendichte wurde photometrisch verfolgt, und als sich die Bakterien in der logarithmischen Wachstumsphase befanden ($OD_{550}=0,5-0,6$ bzw. 90 Klett), wurden

5 µg/ml Penicillin G zugesetzt und die Inkubation bis zu einer Bakteriendichte von $OD_{550}=0,69$ bzw. 120 Klett fortgeführt. Dann wurden die Zellen nach einer 10 minütigen Inkubation auf Eis in 50 ml Ansätzen abzentrifugiert (5500 rpm, 10 Min, 4 °C) und in 1/10 Volumen 1x SMHEM suspendiert. Dieser Waschschrift wurde wiederholt und nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen in 1/100 Volumen 1x SMHEM gelöst und in 200–250 µl Aliquots in –80 °C eingelagert.

1x SMHEM 272 mM Sucrose, 1 mM MgCl₂, 2 mM Hepes pH 7,2

5.2.2.20 Transformation durch Elektroporation

Transformation von *E. coli* und *Salmonella*:

10 µl Ligationsansatz bzw. 100–500 ng Plasmid-DNA wurden mit einem Aliquot frisch aufgetauter elektrokompenter Zellen gemischt, ev. mit dH₂O auf ein Endvolumen von 110 µl aufgefüllt und luftblasenfrei in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette mit einem Elektrodenabstand von 0,1 cm (BioRad) überführt. Nach Anlegung eines Spannungspulses von 1,25 kV an die Küvette in einem *E. coli* Pulser (BioRad) wurde die Zellsuspension in 1 ml SOC (siehe 5.1.8) überführt und für 45–60 Min (in Abhängigkeit von dem zu exprimierenden Resistenzgen) bei der optimalen Wachstumstemperatur schüttelnd inkubiert. Im Falle einer Ligation wurden nach dieser phänotypischen Genexpressionsphase 100 µl und 900 µl des Ansatzes auf die entsprechenden Selektionsagarplatten ausplattiert und unter optimalen Wachstumsbedingungen 1–2 Tage inkubiert. Wurde hingegen Plasmid-DNA transformiert, so wurden 100 µl Aliquots aus verschiedenen Verdünnungsstufen (10^{-1} – 10^{-4} , in Abhängigkeit von der Transformationsrate des Plasmids) auf Selektionsagarplatten ausgebracht und wie oben beschrieben inkubiert.

Transformation von *Listeria*:

300–1000 ng Plasmid-DNA wurden auf ein Aliquot elektrokompenter *Listeria* Zellen pipettiert, welches zuvor langsam auf Eis aufgetaut war. Nach gutem Durchmischen der Zellen und der DNA wurde das Gemisch luftblasenfrei in eine Elektroporationsküvette mit einem Elektrodenabstand von 0,5 cm überführt und in einem *E. coli* Pulser (BioRad) einem Spannungspuls von 2,25 kV ausgesetzt. Die Bakteriensuspension wurde dann in 1 ml BHI Medium aufgenommen und schüttelnd bei idealer Wachstumstemperatur für 1–6 Stunden (in Abhängigkeit von dem zu exprimierenden Resistenzgen) inkubiert. Nach dieser Inkubationsphase wurden je 300 µl Suspension auf die entsprechenden Selektionsagarplatten ausplattiert und unter optimalen Temperaturbedingungen 2–6 Tage inkubiert.

5.2.2.21 Konstruktion und *in vitro* Wachstum von regulierbar lethalen *S. typhimurium* Mutanten

Konstruktion von regulierbar lethalen *S. typhimurium* Mutanten:

Für die Konstruktion von regulierbar lethalen Phänotypen von *S. typhimurium* zum Nachweis der Essentialität eines bestimmten Gens wurde der temperatur-sensitive Vektor pIDM4 verwendet. Dieser kodiert u.a. den Promotor P_{lac} und den Repressor LacI. LacI fungiert als Inhibitor von P_{lac} . Durch homologe Rekombination zwischen einem in pIDM4 klonierten Fragment und dem homologen chromosomalen Locus kann das zu untersuchende Gen unter Kontrolle des plasmid-ständigen P_{lac} gebracht werden (siehe Abbildung 17). Schließlich wird zusätzlich in diese Mutante der Vektor pBad24-*lacI* transformiert, der in Abhängigkeit von Arabinose den Repressor LacI exprimiert. Damit wird ein Phänotyp generiert, der in Abhängigkeit von Arabinose das potentiell essentielle Gen transkribiert und der folglich bei hohen Arabinose-Konzentrationen (= hohe Repressor-Konzentration) nicht vital sein sollte, wenn das untersuchte Gen essentiell für das Überleben von *S. typhimurium* ist.

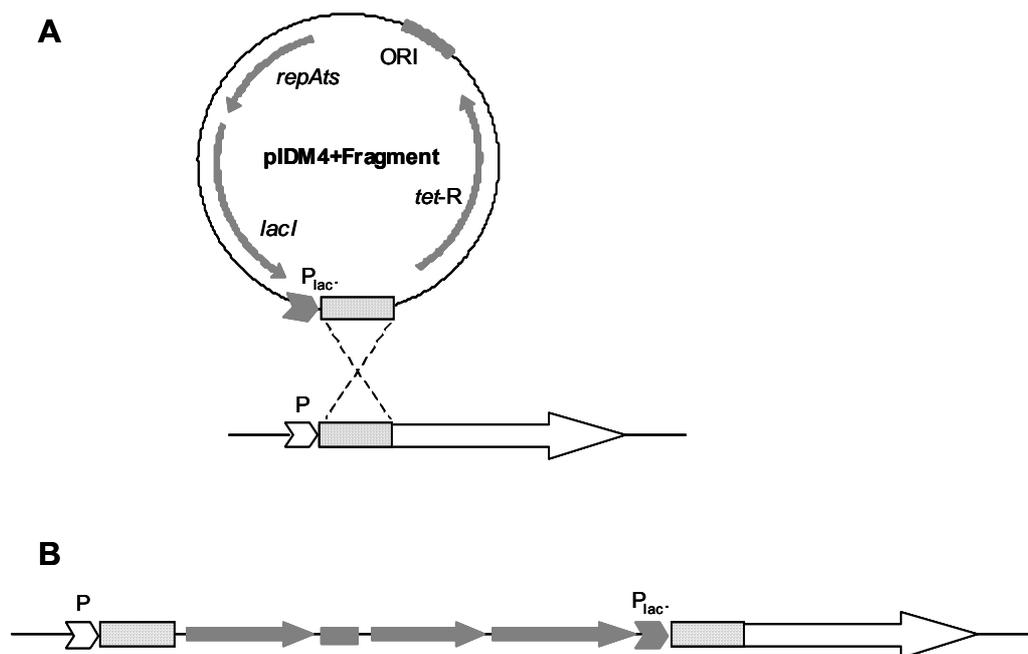


Abbildung 17: Schematische Darstellung der Vorgehensweise zur Konstruktion einer regulierbar lethalen Mutante. Gene sind durch Blockpfeile symbolisiert, Promotoren durch \triangleright . Das zu regulierende, potentiell essentielle Gen ist weiss dargestellt, Gene des Vektors pIDM4 sind grau. Gestrichelte Linien deuten Rekombinationsereignisse zwischen homologen Bereichen (gemustert) an. Größenverhältnisse sind nicht berücksichtigt. (A) Aus dem potentiell essentiellen Gen wurde zunächst ein Fragment, welches das Startcodon und weitere ca. 190-430 bp umfasst, in den Vektor pIDM4 kloniert. Nach Rekombination zwischen dem klonierten Fragment und dem homologen chromosomalen Genbereich kommt es zur Integration des Vektors ins Chromosom des Ziel-Organismus. (B) Die so generierte Insertionsmutante trägt das Zielgen unter der Kontrolle des Promotors P_{lac} . Der native Promotor P befindet sich *upstream* des Genfragments.

Zunächst wurde in einer PCR mit spezifischen Primern, die 5' terminal eine künstliche *Bgl*II Erkennungssequenz kodieren, ein 186-429 bps großes Fragment generiert, das zu jenem Bereich des zu untersuchenden Gens homolog ist, welcher

exakt das Startcodon und die nachfolgenden 186-429 bps umfasst. Das PCR-Produkt wurde wie beschrieben aufgereinigt und nach Hydrolyse mit *Bgl*II in den ebenfalls *Bgl*II gespaltenen, dephosphorylierten Vektor pIDM4 ligiert. Nach Transformation in den *E. coli* Klonierungszwischenwirt EC101 wurden in einer PCR mit dem plasmid-ständigen Primer IDM42 und dem entsprechenden Gen-spezifischen Gegen-Primer die Klone identifiziert, die den Vektor pIDM4+Fragment enthielten. pIDM4+Fragment wurde dann aus *E. coli* EC101 isoliert und in *S. typhimurium* 14028 transformiert, wobei die Transformanten bei permissiver Temperatur (30 °C) auf LB Agarplatten mit 17,5 µg/ml Tetrazyklin angezogen wurden. Die Rekombination zwischen dem in pIDM4 klonierten Fragment und dem homologen chromosomalen Bereich und dadurch die Insertion des Vektors ins Chromosom von *S. typhimurium* wurde wie unter 3.2.1, Seite 38 beschrieben, induziert. Die Insertionsmutanten wurden bei 38,5 °C auf LB Agarplatten mit 17,5 µg/ml Tetrazyklin und 0,2 % Arabinose selektioniert. Anschließend wurden die Insertionsmutanten mit pBad24-*lacI* transformiert und bei 38,5 °C auf Minimalmedium Agarplatten mit 17,5 µg/ml Tetrazyklin, 50 µg/ml Ampicillin und 0,02 % Arabinose selektioniert.

In vitro Wachstum von regulierbar lethalen *S. typhimurium* Mutanten

Für die Untersuchung des *in vitro* Wachstums der so konstruierten regulatorischen Mutanten in Abhängigkeit von Arabinose wurden die Stämme zunächst als ÜNK in Minimalmedium (MM) mit Tet17,5, Amp50 und zusätzlich 0,2 % Guucose bei 37 °C angezogen. Dann wurden die ÜNK in 5000facher Verdünnung in MM mit Antibiotika und 0,002 %, 0,008 % oder 0,02 % Arabinose inokuliert und das Wachstum der Stämme in Abhängigkeit von der Arabinose-Konzentration bei 37 °C durch Messen der optischen Dichte verfolgt.

5.2.2.2 Konstruktion von *L. monocytogenes* Deletionsmutanten

Für die Konstruktion von *in frame* Deletionen von Genen von *L. monocytogenes* EGD wurde nach dem Protokoll von Link *et al.* (1997) vorgegangen. In einem Prozess von zweimaliger homologer Rekombination werden mit Hilfe eines konditional replizierenden Vektors isogene Mutantenstämme konstruiert, in denen ein spezifisches Gen so deletiert wird, dass das Leseraster für die Transkription der *downstream* gelegenen Gene erhalten bleibt.

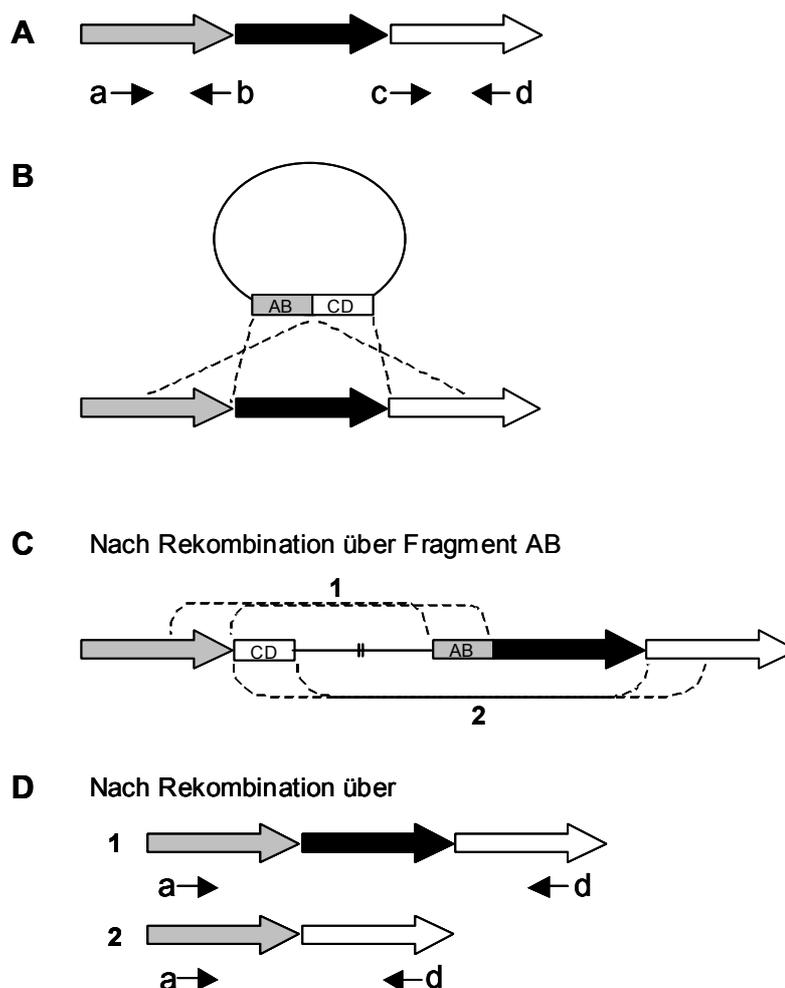


Abbildung 18: Schematische Darstellung der Vorgehensweise zur Konstruktion einer Deletionsmutante. Gene sind durch Blockpfeile symbolisiert. Das zu deletierende Gen ist schwarz dargestellt. Gestrichelte Linien deuten Rekombinationsereignisse zwischen homologen Bereichen an. Integration (= erste homologe Rekombination) und Exzision (= zweite homologe Rekombination) sind exemplarisch an Fragment AB dargestellt (C-D). (A) Lage der Primer zur Generierung der flankierenden Fragmente AB und CD. (B) Nach Klonierung der Fragmente AB und CD in einen konditional replizierenden Vektor wird dieses Konstrukt in den Wirt transformiert. Homologe Rekombination kann dann über Fragment AB oder Fragment CD erfolgen. (C) Genetische Situation nach Integration des Vektors über Fragment AB. (D) Genetische Situation nach der Exzision des Vektors über entweder Fragment AB (1) oder über Fragment CD (2). Nur wenn der zweite Rekombinationsschritt über das Fragment erfolgt, über welches die erste Rekombination nicht vonstattengegangen war, wird das Zielgen deletiert.

Zunächst wurden zwei DNA-Fragmente AB und CD aus *L. monocytogenes* EGD per PCR mit den Primern a und b bzw. den Primern c und d amplifiziert, die das zu deletierende Gen flankierten (siehe Abbildung 18). Die Primer a und b für die Generierung von Fragment AB waren so situiert worden, dass ein ca. 500 bps großes Produkt entstand, das an seinem 3' Ende das Startcodon +18 weitere *downstream* Basenpaare des zu deletierenden Gens kodierte. Das ebenfalls ca. 500 bps große Fragment CD kodierte den *downstream* Bereich des Zielgenes, wobei der 5' Bereich von Fragment CD das Stopcodon und 36 bps *upstream* des Stopcodons umfasste. Da die Deletionen mit dem Vektor pLSV101 durchgeführt wurden, boten sich zwei verschiedene Klonierungsstrategien an:

a) Es wurden zwei Einzelfragmente AB und CD generiert, die zunächst zusammengefügt wurden, bevor sie in den Vektor pLSV101 ligiert wurden. Die Primer b und c wurden in diesem Fall so geplant, dass ihre 5' Termini jeweils im nicht-homologen, „überhängenden“ Bereich die gleiche Schnittstelle kodierten, während die Primer a und d eine zweite und dritte, von b und c diverse Restriktionsstelle „im Überhang“ enthielten. Bei dem Design dieser Primer war es wichtig zu berücksichtigen, dass Sequenzen im 5' Überhang von den Primern b und c letztlich in der Deletionsmutante inseriert bleiben und daher in frame sein müssen. Als Schnittstellen boten sich in dieser Strategie an:

Primer a: *BamHI* Primer b: *BglII* → Fragment AB
Primer c : *BglII* Primer d : *EcoRI* → Fragment CD

b) Es wurden zwei Einzelfragment AB und CD generiert, die sukzessive einzeln in pLSV101 ligiert wurden. In diesem Fall kodierten die Primer a und b bzw. c und d 5'-terminal die gleichen Restriktionsstellen.

Primer a: *SalI* Primer b: *SalI* → Fragment AB
Primer c: *BamHI* Primer d: *BamHI* → Fragment CD

Diese Strategie war mit dem Vektor pLSV101 nur deshalb möglich, da auf dem Vektor zwischen den Restriktionsstellen *SalI* und *BamHI* eine Nukleotidanzahl vorliegt, die chromosomal, *downstream* des deletierten Locus zu keiner Veränderung des Leserasters führt (d.h. eine durch drei teilbare Zahl). Diese Vektorsequenz wird nämlich durch die doppelte Rekombination in das Chromosom der Deletionsmutante irreversibel eingefügt. Bei dieser Strategie ist es von Vorteil, dass die Einzelfragmente schnell in großen Mengen nach-amplifiziert werden können, wenn die Ligation in den Vektor nicht geklappt hat, während bei Strategie a) stets die Vor-Ligation der Einzelfragmente ein limitierender Schritt ist. Jedoch muss in der Methode b) nach erfolgreicher Ligation der Einzelfragmente in pLSV101 deren Orientierung im Vektor per PCR überprüft werden. Es muss dann ein Klon gefunden werden, in dem die Einzelfragmente so in pLSV101 vorliegen, wie es der Orientierung auf dem Chromosom entspricht.

PCR-Amplifikationen (5.2.2.9, Seite 92), Restriktionen (5.2.2.11, Seite 94) und Ligationen (5.2.2.13, Seite 95) wurden im Rahmen dieser Klonierungen so durchgeführt, wie sie bereits beschrieben wurden. Die Ligationsansätze wurden entweder komplett oder zur Hälfte in den *E. coli* Zwischenwirt XL2-blue per Elektroporation transformiert. Die Selektion der Transformanten erfolgte bei 37 °C auf BHI Agarplatten, die Erythromycin in einer Konzentration von 300 µg/ml enthielten (Inkubation 2-3 Tage). Nach Identifikation des richtigen Klons in einer PCR mit den pLSV101-spezifischen Primern LSV3 und LSV-4380rev und Kombinationen mit den Primern a/b/c/d wurde das Deletionsplasmid im Mini-maßstab isoliert und in *L. monocytogenes* EGD transformiert (Inkubation bei 30 C, Em5). Nach mehrmaligem Passagieren der *L. mono-*

cytogenes EGD Transformanten bei 30 °C auf Agarplatten mit 5 µg/ml Erythromycin, wurde die erste homologe Rekombination induziert, indem eine Einzelkolonie in 1 ml BHI Medium suspendiert wurde und indem 50-100 µl dieser Suspension auf vorgewärmte BHI Em5 Agarplatten ausplattiert und bei 42 °C für 1-2 Tage inkubiert wurden. Von den angewachsenen Kolonien, sog. Integranten, bei denen pLSV101 entweder über Fragment AB oder CD ins Chromosom von *L. monocytogenes* EGD integriert worden war, wurden einige mehrmals passagiert und per PCR mit einem plasmidständigen und chromosomalen Primer bestätigt, bevor dann die zweite homologe Rekombination und dadurch die Exzision des Plasmids bei gleichzeitiger Deletion des Zielgens eingeleitet wurde. Hierfür wurde eine Integranten-Einzelkolonie in 1 ml BHI Medium aufgenommen und dann in einen nachweislich sterilen Kolben (Vortest durch Inkubation des Kolben mit BHI-Medium bei 30 °C für mehrere Tage) in 10 ml BHI-Medium ohne Antibiotikum inokuliert und schüttelnd bei 30 °C für durchschnittlich 10-14 Stunden inkubiert. Dann wurden 100 µl entnommen und erneut als Inokulum für eine 30 °C BHI-Kultur ohne Antibiotikum verwendet. Nach ca. fünf Passagen wurde das erste Mal ein Aliquot aus dieser Exzisions- und Deletionskultur entnommen und in verschiedenen Verdünnungsstufen auf BHI Agarplatten ohne Erythromycin ausplattiert (Inkubation bei 30 °C). Die angewachsenen Klone wurde dann auf Erythromycin-Sensitivität untersucht, indem Einzelkolonien gepickt und gleichzeitig in ein nummeriertes Feld einer Agarplatte mit und einer Agarplatte ohne Erythromycin ausgestrichen wurden (Inkubation bei 30 °C). Durch Vergleich der gleichen Klon-Nummern auf den zwei unterschiedlichen Agarplatten konnten Klone identifiziert werden, die Erythromycin-sensitiv waren, d.h. pLSV101 bereits exzisiert und sezerniert hatten. Konnten nach der fünften Passage der Integranten in einer 30 °C Schüttelkultur noch keine Em-sensitiven Klone selektioniert werden, wurde so lange weiter passagiert, bis solche zu finden waren. Dies war in Abhängigkeit von dem zu deletierenden Gen-Locus nach ca. 5-20 Passagen der Fall.

Die Erythromycin-sensitiven Klone wurden dann einer PCR-Untersuchung unterworfen, um festzustellen, ob die zweite homologe Rekombination, d.h. die Exzision, über das gleiche Fragment von statten gegangen war wie die erste oder nicht. Im Falle, dass beide Rekombinationsschritte über das gleiche Fragment erfolgen, wird das Zielgen nicht deletiert, sondern der Wildtyp genotypisch wiederhergestellt. Für diese Untersuchung wurden Primer verwendet, die chromosomal ausserhalb der klonierten, flankierenden Bereiche binden. Konnte die entsprechende Deletionsmutante in dieser PCR und darüber hinaus durch Sequenzierung bestätigt werden, wurde dieser *L. monocytogenes* EGD Mutanten-Stamm in die -80 °C Stammsammlung eingelagert.

5.2.3 Zellkultur

5.2.3.1 Kultivierung von Zellen

Alle unter 5.1.3, Seite 83, genannten Zelllinien wurden in Glutamin-haltigem RPMI 1640 Medium (Gibco), das mit 10 % iFCS komplettiert wurde, in speziellen Zellkultur-flaschen kultiviert. Die Zelllinien wurden dabei alle bei 37 °C und 5 % CO₂ gehalten. Je nach Wachstum wurden die Zellen alle 3–5 Tage gesplittet und passagiert. Caco-2 Zellen wurden dafür mit PBS gewaschen, anschließend trypsinisiert und nach einer kurzen Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂ wieder in Medium aufgenommen und 1:4-1:10 in eine frische Kulturflasche inokuliert. J774 Makrophagen wurden nach dem Waschen mit PBS mit einem Glasspatel abgekratzt, in Medium aufgenommen und 1:4-1:10 in eine frische Kulturflasche verdünnt.

Alle für die Kultivierung oder Infektion von Zellen benötigten Medien und Reagenzien wurden stets im Wasserbad auf 37 °C vorgewärmt.

5.2.3.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Einfrieren von Zellen:

Die Zellen wurden hierfür zunächst wie unter 5.2.3.1 geschildert trypsinisiert und in frischem RPMI Medium aufgenommen. Mit Hilfe der Fuchs-Rosenthal-Zählkammer wurde die Zelldichte bestimmt und die Zellzahl durch Verdünnen bzw. Abzentrifugieren und Wiederaufnahme in weniger Medium auf ca. 2×10^6 eingestellt. Die Zellsuspension wurde dann in Aliquots à 1 ml in beschriftete Kryoröhrchen pipettiert, diese wurden auf Eis gestellt und DMSO in einer Endkonzentration von 10% zugegeben. Die Röhrchen wurden anschließend für 12–24 Std in –80 °C gelagert und dann in flüssigen Stickstoff überführt.

Auftauen von Zellen:

Zum Auftauen der Zellen aus dem Stickstofflager wurde das Kryoröhrchen im 37 °C Wasserbad erwärmt und die dann flüssige Zellsuspension in eine Kulturflasche mit 20–24 ml RPMI Medium inokuliert. Am nächsten Tag wurde das Medium bereits gewechselt, um das DMSO zu entfernen.

5.2.3.3 Untersuchung der intrazellulären Replikation von *L. monocytogenes* Insertionsmutanten

Aussäen der Caco-2 Zellen:

Für eine Infektion von Caco-2 Zellen mit *L. monocytogenes* EGD Mutanten wurde 21-24 Std vor Infektionsbeginn mit dem Aussäen der Zellen begonnen. Zunächst wurden die Zellen wie unter 5.2.3.1, Seite 104 beschrieben, vom Boden der Flasche gelöst und in einer Fuchs-Rosenthal-Kammer die Zelldichte bestimmt. Die Zellzahl wurde dann auf $2,5 \times 10^5$ Zellen/ml eingestellt. Anschließend wurde aus dieser Kultur

je 1 ml pro well einer 24 well Kulturflasche ausgesät. Die Zellzahl direkt vor der Infektion betrug dann durchschnittlich $2,8-3,2 \times 10^5$ Caco-2 Zellen/well.

In Fällen wo die *L. monocytogenes* EGD Mutanten auch in J774 Zellen untersucht wurden, wurde gleich vorgegangen wie hier beschrieben.

Vorbereiten der Bakterienstämme:

Die *L. monocytogenes* EGD Mutanten, deren intrazelluläres Replikationsverhalten untersucht werden sollte, wurden zunächst einige Tage vorher aus den in -80 °C gelagerten Mutantenstocks (3.3.1, Seite 49) auf BHI Agarplatten mit $5\text{ }\mu\text{g/ml}$ Erythromycin ausgestrichen und bei 42 °C inkubiert und dann am Tag vor Durchführung der Infektion zusammen mit dem Kontrollstamm *L. monocytogenes* EGD Wildtyp über Nacht in Kultur (BHI +/- Em 42 °C) angezogen. Für die Infektion wurden dann pro Ansatz $3\text{ }\mu\text{l}$ ÜNK in 1 ml RPMI Medium inokuliert, um eine MOI von ca. 10 zu erhalten. Sollte jedoch eine Infektion von J774 Makrophagen mit *L. monocytogenes* EGD Mutanten durchgeführt werden, wurde die MOI nicht auf 10 sondern auf eins eingestellt. Hierfür wurden dann nur $1,5\text{ }\mu\text{l}$ ÜNK in 1 ml RPMI inokuliert und als Infektionsansatz verwendet, was durchschnittlich in einer MOI von 2-6 resultierte.

Infektion:

In der Infektion selbst wurden die Caco-2 Zellen zwei Mal mit $500\text{ }\mu\text{l}$ PBS/ $\text{Mg}^{2+}\text{Ca}^{2+}$ gewaschen und mit $500\text{ }\mu\text{l}$ Infektionsansatz infiziert. Nach einer Infektionsdauer von 60 Min bei 37 °C und 5% CO_2 wurde das Medium abgenommen und wurden die Caco-2 Zellen 1-2 Mal mit $500\text{ }\mu\text{l}$ PBS/ $\text{Mg}^{2+}\text{Ca}^{2+}$ gewaschen. Um verbleibende, extrazelluläre Bakterien abzutöten wurde nun Gentamycin-haltiges RPMI ($10\text{ }\mu\text{g/ml}$ Gentamycin) zugegeben und wurden die Ansätze für weitere 7 Stunden bei 37 °C und 5% CO_2 inkubiert. Nach dieser Inkubation wurden die Caco-2 Zellen ein Mal mit $500\text{ }\mu\text{l}$ PBS/ $\text{Mg}^{2+}\text{Ca}^{2+}$ gewaschen und durch Zugabe von 1 ml sterilem, auf -20 °C abgekühltem $0,1\%$ igem Triton X-100 lysiert. Nach mehrmaligem Auf- und Abpipetieren, um alle Caco-2 Zellen vom Boden der Kulturplatte zu lösen, wurde das Lysat in ein Eppendorf-Cap überführt und 1 Min lang gevortext. Von den Lysaten wurden $100\text{ }\mu\text{l}$ aus verschiedenen Verdünnungsstufen auf Agarplatten mit Erythromycin ($5\text{ }\mu\text{g/ml}$) ausplattiert und für 2 Tage bei 42 °C inkubiert. Die anschließende Berechnung der pro ml Lysat angewachsenen *colony forming units* (cfu/ml) gab Aufschluß über die Fähigkeit dieses Stammes, sich in Epithelzellen zu vermehren.

In Fällen wo die *L. monocytogenes* EGD Mutanten auch in J774 Zellen untersucht wurden, wurde gleich vorgegangen wie hier beschrieben.

5.2.3.4 Untersuchung von Adhäsion und Invasion von *L. monocytogenes* Stämmen

Sowohl die Bakterien, als auch die Caco-2 Zellen wurden hierfür wie unter 5.2.3.3, Seite 104 beschrieben, vorbereitet.

Untersuchung der Adhäsion:

Nach zweimaligem Waschen der Caco-2 Zellen mit 500 µl PBS/Mg²⁺Ca²⁺ wurden sie mit 500 µl aus den Infektionsaliquots für 35 Min infiziert. Nach dieser Infektionszeit wurden die Zellen vier Mal mit 500 µl PBS/Mg²⁺Ca²⁺ gewaschen, um alle extrazellulären, nicht-adhärenen Bakterien zu entfernen. Die Lyse erfolgte wiederum mit 1 ml kaltem, 0,1%igem Triton X-100 und durch starkes Vortexen. Nach Ausplattieren von 100 µl Aliquots aus verschiedenen Verdünnungsstufen auf Agarplatten mit Erythromycin (5 µg/ml) wurde der cfu/well Wert für die Mutanten ermittelt und mit dem von den Kontrollstämmen verglichen. Als Kontrollen wurden hier die Stämme *L. monocytogenes* EGD und *L. monocytogenes* EGDΔinIACGHE mitgeführt. Letzterer gilt als adhäsions-attenuiert, da seine Adhäsion im Vergleich zum Wildtyp vermindert ist.

Untersuchung der Invasion:

Die Caco-2 Zellen wurden im Invasionsversuch zunächst zwei Mal mit 500 µl PBS/Mg²⁺Ca²⁺ gewaschen und mit 500 µl Infektionsansatz für 60 Min infiziert. Nach einem Waschschrift (mit 500 µl PBS/Mg²⁺Ca²⁺) wurde den infizierten Caco-2 Zellen 500 µl RPMI mit Gentamycin (10 µg/ml) zugesetzt, um extrazelluläre, nicht invadierte Bakterien abzutöten. Nach einer 60 minütigen Inkubation im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ wurde das Medium abgenommen und wurden die Zellen erneut mit 500 µl PBS/Mg²⁺Ca²⁺ gewaschen. Die Lyse erfolgte durch Zugabe von 1 ml kaltem, 0,1 %igem Triton X-100 und starkes Vortexen. Durch Ausplattieren von verschiedenen Verdünnungen auf Erythromycin-haltige Agarplatten wurde der cfu/well Wert der Mutanten ermittelt und mit den Werten der Kontrollen *L. monocytogenes* EGD und *L. monocytogenes* EGDΔinIAB verglichen.

6 Literatur

- Akerley, B. J., Rubin, E. J., Camilli, A., Lampe, D. J., Robertson, H. M., Mekalanos, J. J. (1998). Systematic identification of essential genes by *in vitro* mariner mutagenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 8927-8932.
- Akerley, B. J., Rubin, E. J., Novick, V. L., Amaya, K., Judson, N., Mekalanos, J. J. (2002). A genome-scale analysis for identification of genes required for growth or survival of *Haemophilus influenzae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99(2): 966-971.
- Arigoni, F., Talabot, F., Peitsch, M., Edgerton, M., D., Meldrum, E., Allet, E., Fish, R., Jamotte, T., Curchod, M. L., Loferer, H. (1998). A genome-based approach for the identification of essential bacterial genes. *Nature Biotechnology* 16: 851-856.
- Autret, N., Dubail, I., Trieu-Cuot, P., Berche, P., Charbit, A. (2001). Identification of new genes involved in the virulence of *Listeria monocytogenes* by signature-tagged mutagenesis. *Infect. Immun.* 69: 2054-2065.
- Autret, N., Paynaud, C., Dubail, I., Berche, P., Charbit, A. (2003). Identification of the *agr* locus of *Listeria monocytogenes*: role in bacterial virulence. *Infect. Immun.* 71(8): 4463-4471.
- Bartoleschi, C., Pardini, M. C., Scaringi, C., Martino, M. C., Pazzani, C., Bernardini, M. L. (2002). Selection of *Shigella flexneri* candidate virulence genes specifically induced in bacterial resident in host cell cytoplasm. *Cell. Microbiol.* 4(9): 613-626.
- Behlau, I., Miller, S. I. (1993). A PhoP-repressed gene promotes *Salmonella typhimurium* invasion of epithelial cells. *J. Bacteriol.* 175: 4475-4484.
- Benjamin, W. H. Jr., Hall, P., Roberts, S. J., Briles, D. E. (1990). The primary effect of the *lty* locus is on the rate of growth of *Salmonella typhimurium* that are relatively protected from killing. *J. Immunol.* 144(8): 3143-3151.
- Bergmann, B., Raffelsbauer, D., Kuhn, M., Goetz, M., Hom, S., Goebel, W. (2002). InIA- but not InIB-mediated internalization of *Listeria monocytogenes* by non-pathogenic mammalian cells needs the support of other internalins. *Mol. Microbiol.* 43(3): 557-570.
- Bielecki, J., Youngman, P., Connelly, P., Portnoy, D. A. (1990). *Bacillus subtilis* expressing a haemolysin gene from *Listeria monocytogenes* can grow in mammalian cells. *Nature* 345: 175-176.
- Bijlsma, J. J., Vandenbroucke-Grauls, C. M., Phadnis, S. H., Kusters, J. G. (1999). Identification of virulence genes of *Helicobacter pylori* by random insertion mutagenesis. *Infect. Immun.* 67(5): 2433-2440.
- Biswas, I., Gruss, A., Ehrlich, S. D., Maguin, E. (1993). High-efficiency gene inactivation and replacement system for Gram-positive bacteria. *J. Bacteriol.* 175(11): 3628-3635.
- Blanc-Potard, A. B., Solomon, F., Kayser, J., Groisman, E. A. (1999). The SPI-3 pathogenicity island of *Salmonella enterica*. *J. Bacteriol.* 181: 998-1004.
- Bonnemain, C., Raynaud, C., Réglie-Poupet, H., Dubail, I., Frehel, C., Lety, M. A., Berche, P., Charbit, A. (2004). Differential roles of multiple signal peptidases in the virulence of *Listeria monocytogenes*. *Mol. Microbiol.* 51(5): 1251-1266.

- Borezee, E., Pellegrini, E., Berche, P. (2000). OppA of *Listeria monocytogenes*, an oligopeptide-binding protein required for bacterial growth at low temperature and involved in intracellular survival. *Infect. Immun.* 68(12): 7069-7077.
- Borezee, E., Pellegrini, E., Beretti, J. L., Berche, P. (2001). SvpA, a novel surface virulence-associated protein required for intracellular survival of *Listeria monocytogenes*. *Microbiology* 147: 2913-2923.
- Boyd, E. F., Wang, F. S., Whittam, T. S., Selander, R. K. (1996). Molecular genetic relationship of the Salmonellae. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 804-808.
- Brondijk, T. H., Fiegen, D., Richardson, D. J., Cole, J. A. (2002). Roles of NapF, NapG and NapH, subunits of the *Escherichia coli* periplasmic nitrate reductase, in ubiquinone oxidation. *Mol. Microbiol.* 44(1): 245-255.
- Cabanes, D., Dussurget, O., Dehoux, P., Cossart, P. (2004). Auto, a surface associated autolysin of *Listeria monocytogenes* required for entry into eukaryotic cells and virulence. *Mol. Microbiol.* 61(6): 1601-1614.
- Camacho, L., R., Ensergueix, D., Perez, E., Gicquel, B., Guilhot, C. (1999). Identification of a virulence gene cluster of *Mycobacterium tuberculosis* by signature-tagged transposon mutagenesis. *Mol. Microbiol.* 34(2): 257-267.
- Camilli, A., Tilney, L. G., Portnoy, D. A. (1993). Dual roles of *plcA* in *Listeria monocytogenes* pathogenesis. *Mol. Microbiol.* 8: 143-157.
- Carter, P. B., Collins, F. M. (1974). The route of enteric infection in normal mice. *J. Exp. Med.* 139: 1189-1203.
- Casalino, M., Latella, M. C., Prosseda G., Colonna, B. (2003). CadC is the preferential target of a convergent evolution driving enteroinvasive *Escherichia coli* toward a lysine decarboxylase-defective phenotype. *Infect. Immun.* 71(10): 5472-5479.
- Chang, S. Y., McGary, E. C., Chang, S. (1989). Methionine aminopeptidase gene of *Escherichia coli* is essential for cell growth. *J. Bacteriol.* 171: 4071-4072.
- Cheng, Z. F., Zuo, Y., Li, Z., Rudd, K. E., Deutscher, M. P. (1998). The *vacB* gene required for virulence in *Shigella flexneri* and *Escherichia coli* encodes the exoribonuclease Rnase R. *J. Biol. Chem.* 273(23):14077-14080.
- Choi, J. Y., Sifri, C. D., Goumnerov, B. C., Rahme, L. G., Ausubel, F. M., Calderwood, S. B. (2002). Identification of virulence genes in a pathogenic strain of *Pseudomonas aeruginosa* by representational difference analysis. *J. Bacteriol.* 184(4): 952-961.
- Chico-Calero, I., Suarez, M, Gonzalez-Zorn, B., Scotti, M., Slaghuis, J., Goebel, W., The European *Listeria* Genome Consortium, Vazquez-Boland, J. A. (2002). Hpt, a bacterial homolog of microsomal glucose-6-phosphate translocase, mediates rapid intracellular proliferation in *Listeria*. *PNAS* 99(1): 431-436.
- Coffey, A., van den Burg, B., Veltman, R., Abee, T. (2000). Characteristics of the biologically active 35-kDa metalloprotease virulence factor from *Listeria monocytogenes*. *J. Appl. Microbiol.* 88: 132-141.
- Cossart, P., Mengaud, J. (1989a). *Listeria monocytogenes*, a model system for the molecular study of intracellular parasitism. *Mol. Biol. Med.* 6: 463-474.

- Cossart, P., Vicente, M. F., Mengaud, J., Baquero, F., Perez-Diaz, J. C., Berche, P. (1989b). Listeriolysin O is essential for virulence of *Listeria monocytogenes*: direct evidence obtained by gene complementation. *Infect. Immun.* 57(11): 3629-3636.
- Cotter, P. D., Emerson, N., Gahan, C. G., Hill, C. (1999). Identification and disruption of *lisRK*, a genetic locus encoding a two-component signal transduction system involved in stress tolerance and virulence in *Listeria monocytogenes*. *J. Bacteriol.* 181: 6840-6843.
- Cotter, P. A., DiRita, V. J. (2000). Bacterial virulence gene regulation: an evolutionary perspective. *Annu. Rev. Microbiol.* 54: 519-565.
- Daruwala, R., Kwon, O., Meganathan, R., Hudspeth, M. E. (1996). A new isochorismate synthetase specifically involved in menaquinone (vitamine K2) biosynthesis encoded by the *menF* gene. *FEMS Microbiol. Lett.* 140(2-3): 159-163.
- de Lima Pimenta, A., Di Martino, P., Le Boudier, E., Hulen, C., Blight, M. A. (2003). *In vitro* identification of two adherence factors required for *in vivo* virulence of *Pseudomonas fluorescens*. *Microbes Infect.* 5(13): 1177-1187.
- Domann, E., Wehland, J., Rohde, M., Pistor, S., Hartl, M., Goebel, W., Leimeister-Wächter, M., Wuenscher, M., Chakraborty, T. (1992). A novel bacterial virulence gene in *Listeria monocytogenes* required for host cell microfilament interaction with homology to the proline-rich region of vinculin. *EMBO J.* 11(5): 1981-1990.
- Doumith, M., Cazalet, C., Simoes, N., Frangeul, L., Jacquet, C., Kunst, F., Martin, P., Cossart, P., Glaser, P., Buchrieser, C. (2004). New aspects regarding evolution and virulence of *Listeria monocytogenes* revealed by comparative genomics and DNA arrays. *Infect. Immun.* 72(2): 1071-1083.
- Dramsi, S., Biswas, I., Maguin, Braun, L., Mastroeni, P., Cossart, P. (1995). Entry of *Listeria monocytogenes* into hepatocytes requires expression of *inlB*, a surface protein of the internalin multigene family. *Mol. Microbiol.* 16: 251-261.
- Dramsi, S., Dehoux, P., Lebrun, M., Goosens, P. L., Cossart, P. (1997). Identification of four members of the internalin multigene family of *Listeria monocytogenes* EGD. *Infect. Immun.* 65: 1615-1625.
- Dubail, I., Berche, P., The European *Listeria* Genome Consortium, Charbit, A. (2000). Listeriolysin O als a reporter to identify constitutive and *in vivo* inducible promoters in the pathogen *Listeria monocytogenes*. *Infect. Immun.* 68(6): 3242-3250.
- Dussurget, O., Cabanes, D., Dehoux, P., Lecuit, M., the European *Listeria* Genome Consortium, Buchrieser, C., Glaser, P., Cossart, P. (2002). *Listeria monocytogenes* bile salt hydrolase is PrfA-regulated virulence factor involved in the intestinal and hepatic phases of listeriosis. *Mol. Microbiol.* 45(4): 1095-1106.
- Echave, P., Tamarit, J., Cabisco, E., Ros, J. (2003). Novel antioxidant role of alcohol dehydrogenase E from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 278(32): 30193-30198.
- Engelbrecht, F., Chun, S. K., Ochs, X., Hess, J., Lottspeich, F., Goebel, W., 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.

- Fields, P. I., Swanson, R. V., Haidaris, C. G., Heffron, F. (1986). Mutants of *Salmonella typhimurium* that cannot survive within the macrophage are avirulent. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 5189-5193.
- Fields, P. I., Groisman, E. A., Heffron, F. (1989). A *Salmonella* locus that controls resistance to microbicidal proteins from phagocytic cells. Science 243: 1059-1062.
- Finlay, B. B., Ruschkowski, S., Dedhar, S. (1991). Cytoskeleton rearrangements accompanying *Salmonella* entry in epithelial cells. J. Cell. Sci. 2: 283-296.
- Flashner, Y., Mamroud, E., Tidhar, A., Ber, R., Aftalion, M., Gur, D., Lazar, S., Zvi, A., Bino, T., Ariel, N., Velan, N., Shafferman, A., Cohen, S. (2004). Generation of *Yersinia pestis* attenuated strains by signature-tagged mutagenesis in search of novel vaccine candidates. Infect. Immun. 72(2): 908-915.
- Forsyth, R. A., Haselbeck, J., Ohlsen, K. L., Yamamoto, R., Xu, H., Trawick, J. D., Wall, D., Wang, L., Brown-Driver, V., Froelich, J. M., Kedar, G. C., King, P., McCarthy, M., Malone, C., Misiner, B., Robbins, D., Tan, Z., Zhu, Z. Y., Carr, G., Mosca, D. A., Zamudio, C., Foulkes, J. G., Zyskind, J. W. (2002). A genome-wide strategy for identification of essential genes in *Staphylococcus aureus*. Mol. Microbiol. 43(6): 1387-1400.
- Framson, P. E., Nittayajarn, A., Merritt, J., Youngman, P., Rubens, C. E. (1997). New genetic techniques for group B streptococci: high-efficiency transformation, maintenance of temperature-sensitive pWV01 plasmids and mutagenesis with Tn917. Appl. Environ. Microbiol. 63(9): 3539-3547.
- Freiberg, C., Wieland, B., Spaltmann, F., Ehler, K., Brotz, H., Labischinski, H. (2001). Identification of novel essential *Escherichia coli* genes conserved among pathogenic bacteria. J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 3: 483-489.
- Froussard, P. (1992). A random-PCR method (rPCR) to construct whole cDNA library from low amounts of RNA. Nucleic Acids Res. 20(11): 2900.
- Fu, Y., Galán, J. E. (1998). The *Salmonella typhimurium* tyrosine phosphatase SptP is translocated into host cells and disrupts the actin cytoskeleton. Mol. Microbiol. 27(2): 359-368.
- Fuchs, T., Wiget, P., Osteras, M., Jenal, U. (2001). Precise amounts of a novel member of a phosphotransferase superfamily are essential for growth and normal morphology in *Caulobacter crescentus*. Mol. Microbiol. 39: 679-692.
- Gaillard, J. L., Berche, P., Frehel, E., Gouin, E., Cossart, P. (1991). Entry of *Listeria monocytogenes* into cells is mediated by internalin, a repeat protein reminiscent of surface antigens from gram-positive cocci. Cell 65: 1127-1141.
- Gaillot, O., Pellegrini, E., Bregenholt, S., Nair, S., Berche, P. (2000). The ClpP serine protease is essential for the intracellular parasitism and virulence of *Listeria monocytogenes*. Mol. Microbiol. 35: 1286-1294.
- Galán, J. E., Curtiss, R., (1989). Cloning and molecular characterization of genes whose products allow *Salmonella typhimurium* to penetrate tissue culture cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 6383-6387.
- Galán, J. E., (1996). Molecular genetic bases of *Salmonella* entry into host cells. Mol. Microbiol. 20: 263-271.

- Galán, J. E., Zhou, D. (2000). Striking a balance: modulation of the actin cytoskeleton by *Salmonella*. Proc. Natl. Acad. USA 97: 8754-8761.
- Garandeau, C., Reglier-Poupet, H., Dubail, I., Beretti, J. L., the European *Listeria* Genome Consortium, Berche, P, Charbit, A. (2002). The sortase SrtA of *Listeria monocytogenes* is involved in processing of internalin and in virulence. Infect. Immun. 70: 1382-1390.
- Garcia Véscovi, E. Soncini, F. C., Groisman, E. A. (1996). Mg²⁺ as an extracellular signal: environmental regulation of *Salmonella* virulence. Infect. Immun. 61: 4489-4492.
- Gerdes, S. Y., Scholle, M. D., Campbell, J. W., Balázsi, G., Ravasz, E., Daugherty, M. D., Somera, A. L., Kyrpides, N. C., Anderson, I., Gelfand, M. S., Bhattacharya, A., Kapatral, V., D'Souza, M., Baev, M. V., Grechkin, Y., Mseeh, F., Fonstein, M. Y., Overbeek, R., Barabási, A. L., Oltvai, Z. N., Osterman, A.L. (2003). Experimental determination and system level analysis of essential genes in *Escherichia coli* MG1655. J. Bacteriol. 185(19): 5673-5684.
- Goldfine, H., Johnson, N. C., Knob, C. (1993). Nonspecific phospholipase C of *Listeria monocytogenes*: activity on phospholipids in Triton X-100 mixed cells and in biological membranes. J. Bacteriol. 175(4): 4298-4306.
- Goodman, A. L., Lory, S. (2004). Analysis of regulatory networks in *Pseudomonas aeruginosa* by genomewide transcriptional profiling. Curr. Opin. Microbiol. 7(1): 39-44.
- Gort, A. S., Miller, V. L. (2000). Identification and characterization of *Yersinia enterocolitica* genes induced during systemic infection. Infect. Immun. 68(12): 6633-6642.
- Gottesman, S. (1996). Proteases and their targets in *Escherichia coli*. Annu. Rev. Genet. 30: 465-506.
- Gralnick, J., Webb, E., Beck, B., Downs, D. (2000). Lesions in *gshA* (encoding gamma-L-glytamyl-L-cysteine synthase) prevent aerobic synthesis of thiamine in *Salmonella enterica* serovar typhimurium LT2. J. Bacteriol. 182(18): 5180-5187.
- Groisman, E. A., Chiao, E. , Lipps, C. J., Heffron, F., (1989). *Salmonella typhimurium* *phoP* virulence gene is a transcriptional regulator. Proc. Natl. Acad. Sci USA 86: 7077-7081.
- Guilholt, C., Gicquel, B., Marin, C. (1992). Temperature-sensitive mutants of the *Mycobacterium* plasmid pAL5000. FEMS Microbiol. Lett. 77(1-3): 181-186.
- Guzman, L. M., Belin, D., Carson, M. J., Beckwith, J. (1995). Tight regulation, modulation and high-level expression by vectors containing the arabinose P_{BAD} promoter. J. Bacteriol. 177: 4121-4130.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. J. Mol. Biol. 166(4): 557-580.
- Hanna, M. N., Ferguson, R. J., Li, Y. H., Cvitkovitch, D. G. (2001). *uvrA* is an acid-inducible gene involved in the adaptive response to low pH in *Streptococcus mutans*. J. Bacteriol. 183(20): 5964-5973.
- Hardt, W. D., Chen, L. M., Schuebel, K. E., Bustelo, X. R., Galán, J. E. (1998a). *S. typhimurium* encodes an activator of Tho GTPases that induces membrane ruffling and nuclear responses in host cells. Cell 93: 815-826.

- Hardt, W. D., Urlaub, H., Gálan, J. E. (1998b). A substrate of the centisome 63 type-III secretion system of *Salmonella typhimurium* is encoded by a cryptic bacteriophage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95(5): 2574-2579.
- Hava, D. L., Camilli, A. (2002). Large-scale identification of serotype 4 *Streptococcus pneumoniae* virulence factors. *Mol. Microbiol.* 45(4): 1389-1406.
- Hayes, F. (2003). Transposon-based strategies for microbial functional genomics and proteomics. *Annu. Rev. Genet.* 37: 3-29.
- Hayward, R. D., Koronakis, V. (1999). Direct nucleation and bundling of actin by the SipC protein of invasive *Salmonella*. *EMBO J.* 18(18): 4926-4934.
- Hensel, M., Shea, J. E., Gleeson, C., Jones, M. D., Dalton, E., Holden, D. W. (1995). Simultaneous identification of bacterial virulence genes by negative selection. *Science* 269: 400-403.
- Hensel, M., Shea, J. E., Raupach, B., Monack, D., Falkow, S., Gleeson, C., Kubo, T., Holden, D. W. (1997). Functional analysis of *ssaJ* and *ssaK/U* operon, 13 genes encoding components of the type III secretion apparatus of *Salmonella* pathogenicity island 2. *Mol. Microbiol.* 24: 155-167.
- Hensel, M., Shea, J. E., Waterman, S. R., Mundy, R., Nikolaus, T., Banks, G., Vazquez-Torres, A., Gleeson, C., Fang, F. C., Holden, D. W. (1998). Genes encoding putative effector proteins of the type III secretion system of *Salmonella* pathogenicity island 2 are required for bacterial virulence and proliferation in macrophages. *Mol. Microbiol.* 30: 163-174.
- Hensel, M. (2000). *Salmonella* pathogenicity island 2. *Mol. Microbiol.* 36: 1015-1023.
- Herbert, M. A., Hayes, S., Deadman, M. E., Tang, C. M., Hood, D. W., Moxon, E. R. (2002). Signature tagged mutagenesis of *Haemophilus influenzae* identifies genes required for *in vivo* survival. *Microb. Pathog.* 33(5): 211-223.
- Hersh, D., Monack, D. M., Smith, M. R., Ghori, N., Falkow, S., Zychlinsky, A. (1999). The *Salmonella* invasin SipB induces macrophage apoptosis by binding to caspase-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 2396-1402.
- Heusipp, G., Schmidt, M. A., Miller, V. L. (2003). Identification of *rpoE* and *nadB* as host responsive elements of *Yersinia enterocolitica*. *FEMS Microbiol. Lett.* 226(2): 291-298.
- Hoffman, J. A., Badger, J. L., Zhang, Y., Kim, K. S. (2001). *Escherichia coli* K1 *purA* and *sorC* are preferentially expressed upon association with human brain microvascular endothelial cells. *Microb. Pathog.* 31(2): 69-79.
- Hoiseth, S. K., Stocker, B. A. D. (1981). Aromatic-dependent *Salmonella typhimurium* are non-virulent and effective as live vaccines. *Nature* 291: 238-239.
- Hone, D. M., Shata, M. T., Pascual, D. W., Lewis, G. K. (1999). Mucosal vaccination with *Salmonella* vaccine vectors. John Wiley & Sons.
- Hutchison, C. A., Peterson, S. N., Gil, S. R., Cline, R. T., White, O., Fraser, C. M., Smith, H. O., Venter, J. C. (1999). Global transposon mutagenesis and a minimal *Mycoplasma* genome. *Science* 286(5447): 2165-2159.

- Iordanescu, S., Surdeanu, M. (1983). Isolation and complementation of temperature-sensitive replication mutants of *Staphylococcus aureus* plasmid pC194. *Mol. Gen. Genet.* 191(2): 201-206.
- Isberg, R. R., Van Nieuw, G. T. (1994). Two mammalian cell internalization strategies used by pathogenic bacteria. *Annu. Rev. Genet.* 28: 395-422.
- Itaya, M. (1995). An estimation of minimal genome size required for life. *FEBS Letters* 362: 257-260.
- Jenal, U., Fuchs, T. (1998). An essential protease involved in bacterial cell-cycle control. *EMBO J.* 17(19): 5658-5669.
- Jensen, V. B., Harty, J. T., Jones, B. D. (1998). Interactions of the invasive pathogens *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes* and *Shigella flexneri* with M cells and Peyer's Patches. *Infect. Immun.* 66: 3758-3766.
- Ji, Y., Zhang, B., Van Horn, S. F., Warren, P., Woodnutt, G., Burnham, M. K. R., Rosenberg, M. (2001). Identification of critical *Staphylococcal* genes using conditional phenotypes generated by antisense RNA: *Science* 293: 2266-2269.
- Jones, B. D., Ghori, N., Falkow, S. (1994a). *Salmonella typhimurium* initiates murine infection by penetrating and destroying the specialized epithelial M cells of Peyer's Patches. *J. Exp. Med.* 180: 15-23.
- Jones, B. D., Falkow, S. (1994b). Identification and characterization of a *Salmonella typhimurium* oxygen-regulated gene required for bacterial internalization. *Infect. Immun.* 62: 3745-3752.
- Jones, S., Portnoy, D. A. (1994). Intracellular growth of bacteria. *Methods Enzymol.* 236: 463-467.
- Judson, N., Mekalanos, J. J. (2000). TnAraOut, a transposon-based approach to identify and characterize essential bacterial genes. *Nature Biotechnology* 18: 740-745.
- Kanoh, M., Uetani, T., Sakan, H., Maruyama, S., Liu, F., Sumita, K., Asano, Y. (2002). A two-step model of T cell subset commitment: antigen-independent commitment of T cells before encountering nominal antigen during pathogenic infections. *Int. Immunol.* 14(6): 567-575.
- Kaufmann, S. H. E. (1993). Immunity to intracellular bacteria. *Annu. Rev. Immunol.* 11: 129-163.
- Kazmierczak, M. J., Mithoe, S. C., Boor, K. J., Wiedmann, M. (2003). *Listeria monocytogenes* σ^B regulates stress response and virulence functions. *J. Bacteriol.* 185(19): 5722-5734.
- Kili, A. O., Herzberg, M. C., Meyer, M. W., Zhao, X., Tao, L. (1999). *Streptococcal* reporter gene-fusion for identification of *in vivo* expressed genes. *Plasmid* 42(1): 67-72.
- Kinscherf, T. G., Willis, D. K. (2002). Global regulation by *gidA* in *Pseudomonas syringae*. *J. Bacteriol.* 184(8): 2281-2286.
- Knippers, R. (1997). *Molekulare Genetik*. 7., durchges. und korrigierte Aufl., Georg Thieme Verlag Stuttgart.
- Knuth, K., Niesalla, H., Hueck, C. J., Fuchs, T. M. (2004). Large-scale identification of essential *Salmonella* genes by trapping lethal insertions. *Mol. Microbiol.* 51(6): 1729-1744.

Kobayashi, K., Ehrlich, S. D., Albertini, A., Amati, G., Andersen, K. K., Arnaud, M., Asai, K., Ashikaga, S., Aymerich, S., Bessieres, P., Boland, F., Bringell, S. C., Bron, S., Bunai, K., Chapuis, J., Christiansen, L. C., Danchin, A., Débarbouille, M., Dervyn, E., Deuerling, E., Devine, K., Devin, S. K., Dreesen, O., Errington, J., Fillinger, S., Foster, S. J., Fujita, Y., Galizzi, A., Gardan, R., Eschevins, C., Fukushima, T., Haga, K., Harwood, C. R., Hecker, M., Hosoya, D., Hullo, M. F., Kakeshita, H., Karamata, D., Kasahara, Y., Kawamura, F., Koga, K., Koski, P., Kuwana, R., Imamura, D., Ishimaru, M., Ishikawa, S., Ishio, I., Le Coq, D., Masson, A., Mauel, X., Meima, R., Mellado, R. P., Moir, A., Moriya, S., Nagakawa, E., Nanamiya, H., Nakai, S., Nygaard, P., Ogura, M., Ohanan T., O'Reilly, M., O'Rourke, M., Pragai, Z., Pooley, H. M., Rapoport, G., Rawlins, J. P., Rivas, L. A., Rivolta, C., Sadaie, A., Sadaie, Y., Sarvas, M., Sato, T., Saxild, H. H., Scanlan, E., Schumann, W., Seegers, F. M. L., Sekiguchi, J., Sekowska, A., Séror, S. J., Simon, M., Stragier, P., Sutder, R., Takamatsu, H., Tanaka, T., Yamamoto, M., Yamamoto, Y., Yamane, K., Yata, K., Yoshida, K., Yoshikawa, H., Zuber, U., Ogasawara, N. (2003). Essential *Bacillus subtilis* genes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100(8): 4678-4683.

Kocks, C. Gouin, E., Tabouret, M., Berche, P., Ohayon, H., Cossart, P. (1992). *L. monocytogenes* induced actin assembly requires the *actA* gene product, a surface protein. Cell 68(3): 521-531.

Köhler, S., Foulogne, V., Ouahrani-Bettache, S., Bourg, G., Teyssier, J., Ramuz, M., Liautard, J. P. (2002). The analysis of the intramacrophagic virulome of *Brucella suis* deciphers the environment encountered by the pathogen inside the macrophage host cell. Proc. Natl. Acad. Sci. USA: 99(24): 15711-15716.

Koonin, E. (2003). Comparative genomics, minimal gene-sets and the last universal common ancestor. Nature Reviews 1: 127-136.

Krah, E. R. Macrina, F. L. (1989). Genetic analysis of the conjugal transfer determinants encoded by the streptococcal broad-host-range plasmid pIP501. J. Bacteriol. 171(11): 6005-6012.

Kreft, J., Vazquez-Boland, J. A., Altrock, S., Dominguez-Bernal, G., Goebel, W. (2002). Pathogenicity islands and other virulence elements in *Listeria*. Curr. Topics Microbiol. Immunol. 264: 109-125.

Kutsukake, K., Ide, N. (1995). Transcriptional analysis of the *flgK* and *fliD* operons of *Salmonella typhimurium* which encode flagellar hook-associated proteins. Mol. Gen. Genet. 247 (3): 275-281.

Labarre, C. Schirawski, J., van der Zwet, A. Fitzgerald, G. F., van Sinderen, D. (2001). Insertional mutagenesis of an industrial strain of *Streptococcus thermophilus*. FEMS Microbiol. Lett. 200(1): 85-90.

Lai, Y. C., Peng, H. L., Chang, H. Y. (2001). Identification of genes induced in vivo during *Klebsiella pneumoniae* CG43 infection. Infect. Immun. 69(11): 7140-7145.

Lau, G. W., Haataja, S., Lonetto, M., Kensit, S. E., Marra, A., Bryant, A. P., McDevitt, D., Morrison, D. A., Holden, D. W. (2001). A functional genomic analysis of type 3 *Streptococcus pneumoniae* virulence. Mol. Microbiol. 40(3): 555-571.

Law, J. Buis, G. Haandrikman, A., Kok, H. Venema, G., Leenhouts, K. (1995). A system to generate chromosomal mutations in *Lactococcus lactis* which allows fast analysis of targeted genes. J. Bacteriol. 177(24): 7011-7018.

- Lee, M. S., Seok, C., Morrison, D. A. (1998). Insertion-duplication-mutagenesis in *Streptococcus pneumoniae*: targeting fragment length is a critical parameter in use as a random insertion tool. *Appl. Environ. Microbiol.* 64(12): 4796-4802.
- Lee, M., Dougherty, A., Madeo, A. C., Morrison, D. A. (1999). Construction and analysis of a library for random insertional mutagenesis in *Streptococcus pneumoniae*: use for recovery of mutants defective in genetic transformation and for identification of essential genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 65 (5): 1883-1890.
- Leimeister-Wachter, M., Haffner, C., Domann, E., Goebel, W., Chakraborty, T. (1990). Identification of a gene that positively regulates expression of listeriolysin, the major virulence factor of *Listeria monocytogenes*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 8336-8340.
- Link, A. J., Phillips, D., Church, G. M. (1997). Methods for generating precise deletions and insertions in the genome of wild-type *Escherichia coli*: application to open reading frame characterization. *J. Bacteriol.* 179(20): 6228-6237.
- Luchansky, J. B., Benson, A. K., Atherly, A. G. (1989). Construction, transfer and properties of a novel temperature-sensitive integrable plasmid for genomic analysis of *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* 3(1): 65-78.
- Maguin, E., Duwat, P., Hege, T., Ehrlich, D., Gruss, A. (1992). New thermo-sensitive plasmid for gram-positive bacteria. *J. Bacteriol.* 174(17): 5633-5638.
- Maniloff, J. (1996). The minimal cell genome: on being the right size. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 10004-10006.
- Marcus, S., L., Brumell, J. H., Pfeifer, C. G., Finlay, B. B. (2000). *Salmonella* pathogenicity islands: big virulence in small packages. *Microb. Infect.* 2: 145-156.
- Marquis, H., Goldfine, H., Portnoy, D. A. (1997). Proteolytic pathways of activation and degradation of a bacterial phospholipase C during intracellular infection by *Listeria monocytogenes*. *J. Cell. Biol.* 137(6): 1381-1392.
- McClelland, M., Sanderson, K. E., Spieth, J., Clifton, S. W., Latreille, P., Courtney, L., Porwollik, S., Ali, J., Dante, M., Du, F., Hou, S., Layman, D., Leonard, S., Nguyen, X., Scott, K., Holmes, A., Grewal, N., Mulvaney, E., Ryan, E., Sun H., Florea, L., Miller, W., Stoneking, Nhan, M., Waterston, R., Wilson, R. K. (2001). Complete genome sequence of *Salmonella enterica serovar* Typhimurium LT2. *Nature* 413: 852-856.
- McGhie, E. J., Hayward, R. D., Koronakis, V. (2001). Cooperation between actin-binding proteins of invasive *Salmonella*: SipA potentiates SipC nucleation and bundling. *EMBO J.* 20(9): 2131-2139.
- Mei, J. M., Nourbakhsh, F., Ford, C. W., Holden, D. W. (1997). Identification of *Staphylococcus aureus* virulence genes in a murine model bacteraemia using signature-tagged mutagenesis. *Mol. Microbiol.* 26(2): 399-407.
- Mengaud, J., Chenevert, J., Geoffroy, C., Gaillard, H. L., Cossart, P. (1987). Identification of the structural gene encoding the SH-activated hemolysin of *Listeria monocytogenes*: listeriolsysin O is homologous to streptolysin O and pneumolysin. *Infect. Immun.* 56: 766-772.
- Metcalf, W. W., Jiang, W., Daniels, L. L., Kim, S. K., Haldimann, A., Wanner, B. L. (1996). Conditionally replicative and conjugative plasmids carrying *lacZ alpha* for cloning, mutagenesis and allele replacement in bacteria. *Plasmid* 35(1): 1-13.

- Mielke, M., Hahn, H. (1999). Anthropozoonoseerreger ohne Familienzugehörigkeit: Listerien, Burcellen, Francisellen und Erysipelothrix. In: Medizinische Mikrobiologie und Infetiologie, Hahn *et al.* (Hrsg.), Springer Verlag Berlin: 330-335.
- Miller, S. I., Hohmann, E. L., Pegues, D. A. (1995). *Salmonella* (including *Salmonella typhi*). New York, NY., Churchill Livingston Inc.
- Miller, V. L., Mekalanos, J. J. (1988). A novel suicide vector and its use in construction of insertion mutations: osmoregulation of outer membrane proteins and virulence determinants in *Vibrio cholerae* requires *toxR*. J. Bacteriol. 170 : 2575-2583.
- Miller, S. I., Kukrai, A. M., Mekalanos, J. J. (1989). A two-component system (*phoP phoQ*) controls *Salmonella typhimurium* virulence. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 5054-5058.
- Miller, S. I., Mekalanos, J. J.: (1990). Constitutive expression of the PhoP regulon attenuates *Salmonella* virulence and survival within macrophages. J. Bacteriol. 172: 2485-2490.
- Mushegian, A. R., Koonin, E. V. (1996). A minimal gene set for cellular life derived by comparison of complete bacterial genomes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 10268-10273.
- Muth, G., Frese, D., Kleber, A., Wohlleben, W. (1997). Mutational analysis of the *Streptomyces lividans* *redA* gene suggests that only mutants with residual activity remain viable. Mol. Gen. Genet. 255(4): 420-428.
- Nadon, C. A., Bowen, B. M., Wiedmann, M., Boor, K. J. (2002). Sigma B contributes to PrfA-mediated virulence in *Listeria monocytogenes*. Infect. Immun. 70: 3948-3952.
- Nair, S., Frehel, C., Nguyen, L., Escuyer, V., Berche, P. (1999). ClpE, a novel member of the HSP100 family, is involved in cell division and virulence of *Listeria monocytogenes*. Mol. Microbiol. 31: 185-196.
- Nair, S., Milohanic, E., Berche, P. (2000a). ClpC ATPase is required for cell adhesion and invasion of *Listeria monocytogenes*. Infect. Immun. 68 (12): 7061-7068.
- Nair, S., Derre, I., Msadek, T., Gaillot, O., Berche, P. (2000b). CtsR controls class III heat shock gene expression in the human pathogen *Listeria monocytogenes*. Mol. Micro. 35: 800-811.
- Neu, T., Henrich, B. (2003). New thermosensitive delivery vector and its use to enable nisin-controlled gene expression in *Lactobacillus gasseri*. Appl. Environ. Microbiol. 69(3): 1377-1382.
- Niesalla, H. (2002). Entwicklung rekombinanter Lebendimpfstoffe auf der Basis attenuierter *Salmonella* Vakzinstämmen. Creatogen AG Augsburg bzw. Eberhard Karls Universität Tübingen, Dissertation.
- Norris, F. A., Wilson, M P., Wallis T. S., Galyov, E. E., Majerus, P. W. (1998). SopB, a protein required for virulence of *Salmonella dublin*, is an inositol phosphate phosphatase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 14057-14059.
- Ochman, H., Soncini, F. C., Solomon, F., Groisman, E. A., (1996). Identification of a pathogenicity island required for *Salmonella* survival in host cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 7800-7804.
- Pang, T. Levine, M. M., Ivanoff, B., Wain, J., Finlay, B. B. (1998). Typhoid fever – important issues still remain. Infect. Immun. 63: 563-568.

- Penheiter, K. L., Mathus, N., Giles, D., Fahlen, T. Jones, B. D (1997). Non-invasive *Salmonella typhimurium* mutants are avirulent because of an inability to enter and destroy M cells of ileal Peyer's patches. *Mol. Microbiol.* 24: 697-709.
- Petersen, L. A., Downs, D. M. (1997). Identification and characterization of an operon in *Salmonella typhimurium* involved in thiamine biosynthesis. *J. Bacteriol* 179(15): 4894-4900.
- Polissi, A., Pntoggia, A., Feger G., Altieri, M., Mottl, H., Ferrari, L., Simon, D. (1998). Large-scale identification of virulence genes from *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* 66(12): 5620-5629.
- Rácz, P., Tenner, K., Mérő, E. (1972). Experimental *Listeria* enteritis. An electron microscopic study of the epithelial phase in experimental *Listeria* infection. *Lab. Investig.* 26: 694-700.
- Raffelsbauer, D., Bubert, A., Engelbrecht, F., Scheinpflug, J., Simm, A., Hess, J., Kaufmann, S. H. E., Goebel, W., (1998). The gene cluster inlC2DE of *Listeria monocytogenes* contain additional new internalin genes and is important for virulence in mice. *Mol. Gen. Genet.* 260: 144-158.
- Rea, R. B., Gahan, C. G., Hill, C. (2004). Disruption of putative regulatory loci in *Listeria monocytogenes* demonstrates a significant role for Fur and PerR in virulence. *Infect. Immun.* 72(2):717-727.
- Reimann, C., Rella, M., Haas, D. (1988). Integration of replication-defective R68.45-like plasmids onto the *Pseudomonas aeruginosa* chromosome. *J. Gen. Microbiol.* 134(6): 1515-1523.
- Roberts, A. J., Wiedmann, M. (2003). Pathogen, host and environmental factors contributing to the pathogenesis of listeriosis. *Cell. Mol. Life Sci.* 60: 904-918.
- Robertson, G. T., Ng, W. L., Gilmour, R., Winkler, M. E. (2003). Essentiality of *clpX*, but not *clpP*, *clpL*, *clpC* or *clpE* in *Streptococcus pneumoniae* R6. *J. Bacteriol.* 185(9): 2961-2966.
- Rocourt, J., Hof, H., Schrettenbrunner, A., Malinverni, R., Bille, J. (1986). Acute purulente *Listeria seeligeri* meningitis in an immunocompetent adult. *Schweiz. Med. Wochenschr.* 116: 248-251.
- Rocourt, J. (1999). The genus *Listeria* and *Listeria monocytogenes*: phylogenetic position, taxonomy and identification. In: E. T. Ryser, E. H. Marth (eds.), *Listeria, listeriosis and food safety*, 2nd ed., Marcel Dekker Inc., New York, N. Y.
- Roof, D. M., Roth, J. R. (1989). Functions required for vitamin B12-dependent ethanolamine utilization in *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* 171(6): 3316-3323.
- Rouquette, C., Ripio, M. T., Pellegrini, E., Bolla, J. M., Tascon, R. I., Vázquez-Boland, J. A. (1996). Identification of a ClpC ATPase required for stress tolerance and in vivo survival of *Listeria monocytogenes*. *Mol. Microbiol.* 21: 977-987.
- Ruiz-Albert, J., Mundy, R., Yu, X. J., Beuzon, C. R., Holden, D. W. (2003). SseA is a chaperone for the SseB and SseD translocon components of the *Salmonella* pathogenicity island 2 encoded type-III secretion system. *Microbiology* 149(5): 1103-1111.

- Sawada, K., Kokeguchi, S., Hongyu, H., Sawada, S., Miyamoto, M., Maeda, H., Nishimura, F., Takashiba, S., Murayama, Y. (1999). Identification by subtractive hybridization of a novel insertion sequence specific for virulent strains of *Porphyromonas gingivalis*. *Infect. Immun.* 67(11): 5621-5625.
- Schelin, J., Lindmark, F., Clarke, A. K. (2002). The clpP multigene family for the ATP-dependent Clp protease in the cyanobacterium *Synechococcus*. *Microbiology* 148(7): 2255-2265.
- Schneider, W. P., Ho, S. K., Christine, J., Yao, M., Marra, A., Hromockyj, A. E. (2002). Virulence gene identification by differential fluorescence induction analysis of *Staphylococcus aureus* gene expression during infection-simulating culture. *Infect. Immun.* 70(3): 1326-1333.
- Selzer, P. M., Brutsche, S., Wiesner, P., Schmid, P., Müllner, H. (2000). Target-based drug discovery for the development of novel anti-infectives. *Int. J. Med. Microbiol.* 290: 191-201.
- Serres, M. H., Gopal, S., Nahum, L. A., Liang, P., Gassterland, T., Riley, M. (2001). A functional update of the *Escherichia coli* K-12 genome. *Genome Biol.* 2: RESEARCH0035.
- Sha, J., Kozlova, E. V., Fadl, A. A., Olano, J. P., Houston, C. W., Peterson, J. W., Chopra, A. K. (2004). Molecular characterization of a glucose-inhibited division gene, *gidA*, that regulates cytotoxic enterotoxin of *Aeromonas hydrophila*. *Infect. Immun.* 72(2): 1084-1095.
- Shea, J. E., Hensel, M., Gleeson, C., Holden, D. (1996). Identification of a virulence locus encoding a second type III secretion system in *Salmonella typhimurium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 2593-2597.
- Sorsa, L. J., Dufke, S., Schubert, S. (2004). Identification of novel virulence-associated loci in uropathogenic *Escherichia coli* by suppression subtractive hybridization. *FEMS Microbiol. Lett.* 230(2): 203-208.
- Smith, A. B., Siebeling, R. J. (2003). Identification of genetic loci required for casular expression on *Vibrio vulnificus*. *Infect. Immun.* 71(3): 1091-1097.
- Stühler, C. (2004). Untersuchung der cytosolischen Replikation von *Listeria monocytogenes*. Diplomarbeit, Lehrstuhl für Mikrobiologie, Universität Würzburg.
- Swanson, J. A., Baer, S., C. (1995). Phagocytosis by zippers and triggers. *Trends Cell. Biol.* 5: 89-93.
- Takatsuka Y., Onoda, M., Sugiyama, T., Muramoto, K., Tomita, T., Kamio, Y. (1999). Novel characteristics of *Selenomonas ruminantium* lysine decarboxylase capable of decarboxylating both L-lysine and L-ornithine. *Biosci Biotechnol Biochem.* 63(6): 1063-1069. (INT03.50, nur abstract)
- Talaat, A. M., Lyons, R., Howard, S. T., Johnston, S. A. (2004). The temporal expression profile of *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice. *Proc. Natl. Sci. USA* 101(13): 4602-4607.
- Thulasiraman, V., McCutchen-Maloney, S. L., Motin, V. L., Garcia, E. (2001). Detection and identification of virulence factors in *Yersinia pestis* using SELDI Protein Chip system. *Biotechniques* 30(2): 428-432.

- Tilney, L.G., Portnoy, D. A. (1989). Actin filaments and the growth, movement and spread of the intracellular bacterial parasite *Listeria monocytogenes*. *J. Cell. Biol.* 109(4): 1597-1608.
- Tsolis, R. M., Townsend, S. M., Miao, E. A., Miller, S. I., Ficht, T. A., Adams, L. G., Baumler, A. J. (1999). Identification of a putative *Salmonella enterica* serotype typhimurium host range factor with homology to IpaH and YopM by signature-tagged mutagenesis. *Infect. Immun.* 67(12): 6385-6393.
- Tullius, M. V., Harth, G., Morwitz, M. A. (2003). Glutamine synthetase GlnA1 is essential for growth of *Mycobacterium tuberculosis* in human THP-1 macrophages and guinea pigs. *Infect. Immun.* 71(7): 3927-3936.
- Turner, A. K., Lovell, M. A., Hulme, S. D., Zhang-Barber, L., Barrow, P. A. (1998). Identification of *Salmonella typhimurium* genes required for colonization of the chicken alimentary tract and for virulence in newly hatched chicks. *Infect. Immun.* 66(5): 2099-2106.
- Uchiya, K., Barbieri, M. A., Funato, K. Shah, A. H., Stahl, P. D., Groisman, E. A. (1999). A *Salmonella* virulence protein that inhibits cellular trafficking. *Embo J.* 18: 3924-3933.
- Vázquez-Boland, J. A., Kocks, C., Dramsi, S., Ohayon, H. Geoffroy, C., Mengaud, J., Cossart, P. (1992). Nucleotide sequence of the lecithinase operon of *Listeria monocytogenes* and possible role of lecithinase in cell-to-cell spread. *Infect. Immun.* 60(1): 219-230.
- Vázquez-Boland, J. A., Kuhn, M., Berche, P., Chakraborty, T., Domínguez-Bernal, G., Goebel, W., González-Zorn, B., Wehland, J., Kreft, J. (2001). *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clin. Microbiol. Rev.* 14(3): 584-640.
- Villafane, R., Bechhofer, D. H., Narayanan, C. S., Dubnau, D. (1987). Replication control genes of plasmid pE194. *J. Bacteriol.* 169(10): 4822-4829.
- Yamamoto, T. Sashinami, H., Takaya, A., Tomoyasu, T., Matsui, H., Kikuchi, Y., Hanawa, T., Kamiya, S., Nakane, A. (2001). Disruption of the genes for ClpXP protease in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium results in persistent infection in mice, and development of persistence requires endogenous gamma interferon and tumor necrosis factor alpha. *Infect. Immun.* 69(5): 3164-3174.
- Walker, J. C., Verma, N. K. (2002). Identification of a putative pathogenicity island in *Shigella flexneri* using subtractive hybridisation of the *S. flexneri* and *Escherichia coli* genomes. *FEMS Microbiol. Lett.* 213(2): 257-264.
- Waterman, S. R., Holden, D. W. (2003). Functions and effectors of the *Salmonella* pathogenicity island 2 type-III secretion system. *Cell. Microbiol.* 5(8): 501-511.
- Weaver, K. E., Walz, K. D., Heine, M. S. (1998). Isolation of a derivative of *Escherichia coli* - *Enterococcus faecalis* shuttle vector pAM401 temperature sensitive for maintenance in *E. faecalis* and its use in evaluating the mechanism of pAD1 *par*-dependent plasmid stabilization. *Plasmid* 40(3): 225-232.
- Wiedmann, M., Arvik, T. J., Hurley, R. J., Boor, K. J. (1998). General stress transcription factor sigma B and its role in acid tolerance and virulence of *Listeria monocytogenes*. *J. Bacteriol.* 180: 3650-3656.

- Wilson, R. L., Tvinnereim, A. R., Jones, B. D., Harty, J. T. (2001). Identification of *Listeria monocytogenes in vivo*-induced genes by fluorescence-activated cell sorting. *Infect. Immun.* 69(8): 5016-5024.
- Wong, K. K., McClelland, M., Stillwell, L. C., Sisk, E. C., Thurston, S. J., Saffer, J. D. (1998). Identification and sequence analysis of a 27-kilobase chromosomal fragment containing a *Salmonella* pathogenicity island located at 93 minutes on the chromosome map of *Salmonella enterica* serovar typhimurium LT2. *Infect. Immun.* 66: 3365-3371.
- Wuenscher, M. D., Kohler, S., Goebel, W., Chakraborty, T. (1991). Gene disruption by plasmid integration in *Listeria monocytogenes*: insertional inactivation of the listeriolysin determinant *lisA*. *Mol. Gen. Genet.* 228(1-2): 177-182.
- Wuenscher, M. D., Kohler, S., Bubert, A., Gerike, U., Goebel, W. (1993). The *iap* gene of *Listeria monocytogenes* is essential for cell viability and its gene product, p60, has bacteriolytic activity. *J. Bacteriol.* 175: 3491-3501.
- Zhang, L., Fan, F., Palmer, L. M., Lonetto, M. A., Petit, C., Voelker, L. L., St John, A., Bankosky, B., Rosenberg, M., McDevitt, D. (2000). Regulated gene expression in *Staphylococcus aureus* for identifying conditional lethal phenotypes and antibiotic mode of action. *Gene* 255: 297-305.
- Zhao, Y., Jansen, R., Gastra, W., Arkesteijn, G., van der Zeijst, B. A., van Putten, J. P. (2002). Identification of genes affecting *Salmonella enterica* serovar enteritidis infection of chicken macrophages. *Infect. Immun.* 70(9): 5319-21.

7 Anhang

7.1 Abkürzungen

ABC	<i>ATP bindung cassette</i> Transport-System
Amp	Ampicillin
APC	Antigen presenting cell
ATCC	American Type Culture Collection
bps	base pairs
BHI	brain heart infusion
CAA	casaminoacids
CAM	Chloramphenicol
cfu	colony forming units
cs	Centisom
Em	Erythromycin
EIEC	Enteroinvasive <i>E. coli</i>
HBMEC	Human brain microvascular endothelial cells
IDM	Insertions-Duplikations-Mutagenese
IFN	Interferon
INT	Integrante bzw. Insertionsmutante
IL	Interleukin
IPC	Integration rate per cell
kbps	kilo base pairs
LB	Luria Bertani Medium
LIPi	<i>Listeria</i> pathogenicity island
mcs	multiple cloning site
Min	Minuten
MHC	major histocompatibility complex
MM	Minimalmedium
OD	Optische Dichte
ori	origin of replication, Replikationsursprung
PEG	Polyethylenglykol
PTS	Phosphotransferase-Transport-System
r	resistent
PCR	Polymerase-Kette-Reaktion
rpm	rotations per minute
RT	Raumtemperatur
SPI	<i>Salmonella</i> pathogenicity island
Std	Stunden
Sv	Serovar
Tet	Tetrazyklin
ÜNK	Übernachtkultur

7.2 Tabelle I

Tabellarische Auflistung der identifizierten IDM-Insertionen in *S. typhimurium*, die einen lethalen Phänotyp bewirkten. Die Angaben in der zweiten Spalte beziehen sich auf den Insertionslocus auf dem Chromosom von *S. typhimurium*. Für die COG-Klassifizierung siehe Seite 126.

Klasse	Insertion (bps)	Gen	Funktion	COG	IPC	Anmerkung
Zelluläre Prozesse	0143023	<i>ftsI</i>	peptidoglykan-synthetase	M	0	essentiell
	0144444	<i>murE</i>	meso-diaminopimelate-adding enzyme	M	0	essentiell
	0147861	<i>murD</i>	UDP-Nac-muramoylalanine-D-glutamate ligase	M	0	essentiell
	0150261	<i>murG</i>	UDP-N-acetyl-glucosamine-transferase	M	0	essentiell
	0151699	<i>murC</i>	UDP-N-acetyl-muramate:alanine ligase	M	0	essentiell
	0152611	<i>ddlB</i>	D-alanine-D-alanine ligase B	M	0	essentiell
	0263270	<i>yaeT</i>	predicted outer membrane protein	M	0	essentiell
	0267381	<i>lpxA</i>	Acyl-UDP-Nac-glucosamine-O-acyltransferase	M	0	essentiell
	0337263	<i>orf</i>	rhs family protein	M	6.6E-7	neu essentiell
	0780356	<i>orf</i>	glycosyltransferase	M	4.3E-7	neu essentiell
	1075268	<i>kdsB</i>	2-keto-3-deoxy-octulosonic acid synthetase	M	0	essentiell
	1550161	<i>ompN</i>	outer membrane protein (porin)	M	0	neu essentiell
	1941228	<i>prc</i>	periplasmic protease for penicillin-binding	M	0	neu essentiell
	3909204	<i>rfaL</i>	O-antigen ligase	M	6.6E-7	neu essentiell
	3915002	<i>rfaB</i>	glycosyltransferase	M	6.1E-7	neu essentiell
	3919937	<i>kdtA</i>	3-deoxy-D-manno-octulosonic-acid transferase	M	0	essentiell
	4357278	<i>murB</i>	UDP-N-acetylmuramate dehydrogenase	M	0	essentiell
	4480097	<i>spi4_c</i>	outer membrane protein	M	0	neu essentiell
	0019901	Plasmid	replication	D	0	essentiell
	0149609	<i>ftsW</i>	cell division membrane protein	D	0	essentiell
	0155058	<i>ftsA</i>	ATP-binding cell division protein	D	0	essentiell
	0156014	<i>ftsZ</i>	cell division GTPase	D	0	essentiell
	1078525	<i>mukF</i>	chromosome partitioning	D	0	essentiell
	1274223	<i>yceF</i>	nucleotide binding protein	D	0	neu essentiell
	2248264	<i>mrp</i>	ATPase involved in chromosome partitioning	D	0	neu essentiell
	3620872	<i>fic</i>	protein involved in cell division	D	1.2E-6	essentiell
	4636387	<i>ytfE</i>	hypothetical	D	1.9E-7	neu essentiell
	0012931	<i>dnaK</i>	chaperone Hsp70	O	2.1E-6	essentiell
	0107113	<i>surA</i>	parvulin-like peptidyl-prolyl isomerase	O	0	essentiell
	0504459	<i>clpX</i>	ATP-dependent protease	O	0	neu essentiell
	1063508	<i>ycaL</i>	Zn-dependent protease, chaperone	O	0	neu essentiell
	1741457	<i>hslJ</i>	heat shock protein	O	1.8E-7	essentiell
	1917904	<i>yeaZ</i>	chaperone	O	0	essentiell
	2800331	<i>clpB</i>	ATP-dependent protease, chaperone	O	6.8E-6	essentiell
	2821390	<i>grpE</i>	protein repair, chaperone	O	2.2E-5	essentiell
	3464882	<i>hflB</i>	ATP-dependent zinc-metallo protease	O	0	essentiell
	4575979	<i>mopA</i>	chaperone, Hsp60 family	O	0	essentiell
	4606591	<i>hflK</i>	integral membrane protease	O	1.1E-6	neu essentiell
	4125026	<i>orf</i>	thio-disulfide isomerase and thioredoxin	O	1.6E-6	neu essentiell
	0345354	<i>orf</i>	papC-like porin protein (fimbrial biogenesis)	N	5.4E-7	neu essentiell
	0465047	<i>secF</i>	preprotein translocase	N	0	essentiell
	1262791	<i>flgH</i>	flagellar basal body L-ring protein	N	0	non essentiell!
	2017315	<i>cheA</i>	Chemotaxisprotein, histidine-kinase	N	4.1E-7	neu essentiell
	3586456	<i>secY</i>	preprotein translocase subunit	N	0	essentiell
	3739529	<i>ftsY</i>	signal recognition particle, GTPase	N	0	essentiell
	4046410	<i>60iM</i>	preprotein translocase subunit yidC	N	0	neu essentiell
	1664580	<i>narY</i>	nitrate reductase; long-term starvation-survival	P	3.2E-6	essenteill
	1858271	<i>narH</i>	nitrate reductase	P	8.4E-7	neu essentiell
	1879680	<i>yehM</i>	MFS superfamily:sulfate permease	P	8.8E-7	neu essentiell
	4063750	<i>pstS</i>	periplasmicABC transport system	P	1.5E-6	neu essentiell
	4320206	<i>katG</i>	catalase; hydroperoxidase HPI(I)	P	n. d.	neu essentiell
	0921486	<i>yliB</i>	ABC-type/oligopeptide/nickel transport system	P	2.4E-6	neu essentiell
	0451218	<i>phoR</i>	signal transduction histidine kinase	T	7.6E-7	essentiell
	0662514	<i>cstA</i>	membrane proteincarbon starvation	T	7.5E-7	starvation
	1950548	<i>pphA</i>	threonine protein phosphatase	T	2.3E-6	neu essentiell
	1950966	<i>yebW</i>	threonine protein phosphatase	T	3.0E-6	neu essentiell
	2370454	<i>rscC</i>	histidine-kinase, cheY-like receiver domain	T	6.9E-6	neu essentiell

Klasse	Insertion (bps)	Gen	Funktion	COG	IPC	Anmerkung
Metabolismus	0181396	<i>lpdA</i>	dihydrolipoamide-dehydrogenase	C	0	essentiell
	0931653	<i>orf</i>	flavoprotein ubiquinone oxidoreductase	C	0	neu essentiell
	1325063	<i>icdA</i>	isocitrate dehydrogenase	C	1.1E-6	neu essentiell
	1530900	<i>ydgP</i>	NADH:ubiquinone oxidoreductase	C	0	neu essentiell
	1601741	<i>yneI</i>	NAD-dependent aldehyde dehydrogenase	C	0	neu essentiell
	1633672	<i>orf</i>	hypothetical Na/H-antiporter	C	2.9E-6	neu essentiell
	1844017	<i>adhE</i>	aldehyde dehydrogenase	C	0	neu essentiell
	2354870	<i>napH</i>	ferredoxin	C	2.1E-6	neu essentiell
	2522598	<i>orf</i>	predicted oxidoreductase	C	0	neu essentiell
	4517808	<i>nrfC</i>	Fe-S-cluster containing hydrogenase	C	0	neu essentiell
	0069970	<i>CitE</i>	citrate lyase	G	0	neu essentiell
	1639682	<i>orf</i>	maltooligosyltrehalose synthase	G	8.1E-7	neu essentiell
	1642404	<i>orf</i>	1,4-alpha-glucan branching enzyme	G	0	neu essentiell
	1801641	<i>pyrF</i>	orotidine-5'-phosphate decarboxylase	F	0	essentiell
	2163175	<i>rfbK</i>	phosphomannomutase	G	0	neu essentiell
	2286756	<i>mglB</i>	periplasmic sugar binding protein	G	6.1E-6	essentiell
	3056391	<i>orf</i>	H+/gluconate symporter	G	0	neu essentiell
	3098077	<i>eno</i>	enolase	G	0	essentiell
	3246136	<i>orf</i>	mannitol-1-phosphate dehydrogenase	G	0	neu essentiell
	3462967	<i>mrsA</i>	phosphomannomutase	G	0	essentiell
	1095712	<i>orf</i>	Na+/alanine symporter	E	1.0E-6	neu essentiell
	1920897	<i>pabB</i>	anthranilate/para-aminobenzoate synthase	E	1.2E-6	neu essentiell
	2041538	<i>yecS</i>	ABC-type amino acid transport system	E	1.8E-6	neu essentiell
	2145760	<i>yeeF</i>	amino acid transport protein	E	0	neu essentiell
	2155763	<i>hisI</i>	phosphoribosyl-AMP-cyclohydrolase	E	7.1E-7	neu essentiell
	2463365	<i>hisM</i>	ABC-type aminoacid transport system	E	3.2E-6	neu essentiell
	2598517	<i>dapE</i>	N-succinyl-diaminopimelate deacylase	E	0	essentiell
	3447439	<i>csdA</i>	selenocysteine lyase	E	2.7E-6	neu essentiell
	3448153	<i>csdA</i>		E	0	neu essentiell
	4216712	<i>glnA</i>	glutamine synthetase	E	0	neu essentiell
	0547215	<i>adk</i>	adenylate-kinase	F	0	essentiell
	1283645	<i>tmk</i>	thymidylate kinase	F	4.2E-7	essentiell
	1320672	<i>purB</i>	adenylosuccinate lyase	F	1.5E-7	non essentiell!
	3098851	<i>pyrG</i>	CTP synthetase, UTP-ammonia-lyase	F	1.4E-6	essentiell
	0256778	<i>pyrH</i>	uridylate kinase	F	0	essentiell
	0475748	<i>dxs</i>	Deoxyxylulose-5-phosphate synthase	H	0	essentiell
	0494570	<i>cyoE</i>	polyprenyl transferase	H	1.3E-6	neu essentiell
	0602850	<i>folD</i>	5,10-methylene-THF dehydrogenase	H	0	neu essentiell
	2378191	<i>orf</i>	O-succinylbenzoate synthase	H	0	neu essentiell
	2399818	<i>yfaW</i>	O-succinylbenzoate synthase	H	0	neu essentiell
	2968054	<i>gshA</i>	gamma-glutamylcysteine synthetase	H	8.3E-6	neu essentiell
	3252003	<i>metK</i>	adenosylmethionine synthetase	H	0	essentiell
	3924013	<i>dfp</i>	phosphopantotenoylcysteine synthetase	H	0	essentiell
	4184140	<i>yigC</i>	3-polyprenyl-4-hydroxybenzoate decarboxylase	H	0	neu essentiell
	4384726	<i>hemE</i>	uroporphyrinogen decarboxylase	H	0	essentiell
	0259911	<i>uppS</i>	undecaprenyl pyrophosphate synthetase	I	0	essentiell
	0260151	<i>cdsA</i>	CDP-diglyceride synthetase	I	0	essentiell
	0273170	<i>accA</i>	acetylCoA carboxylase	I	0	essentiell
	0929506	<i>orf</i>	acylCoA-dehydrogenase	I	8.8E-7	neu essentiell
	1278845	<i>fabD</i>	S-malonyltransferase	I	0	essentiell
	1436521	<i>ydiO</i>	acyl-CoA dehydrogenase	I	0	essentiell
	1792149	<i>fabI</i>	enoyl-[acyl-carrier-protein] reductase (NADH)	I	0	essentiell
	2237068	<i>fabB</i>	3-oxoacyl synthase	I	8.3E-7	essentiell
	2488418	<i>fabB</i>	3-oxoacyl-synthase	I	n. d.	essentiell (stationary)
	2502143	<i>fadL</i>	long-chain fatty acid transport protein	I	1.2E-6	essentiell (stationary)
	2793963	<i>pssA</i>	phosphatidylserine synthase	I	0	essentiell
0529731	<i>acrB</i>	cation/multidrug efflux pump	Q	0	neu essentiell	
1070653	<i>msbA</i>	ABC-transporter	Q	0	essentiell	
1279415	<i>fabG</i>	3-oxoacyl-reductase/dehydrogenase	Q	1.3E-6	essentiell	
4500441	<i>orf</i>	ABC-transporter	Q	0	neu essentiell	

Klasse	Insertion (bps)	Gen	Funktion	COG	IPC	Anmerkung
Information	0055917	<i>ileS</i>	isoleucine tRNA synthetase	J	0	essentiell
	0255390	<i>tsf</i>	translation elongation factor EF-Ts	J	0	essentiell
	0289281	<i>rrsH</i>	16S rRNA	J	0	essentiell
	0291661	<i>rrlH</i>	23S rRNA	J	0	essentiell
	0746895	<i>glnS</i>	glutamine tRNA synthetase	J	9.4E-7	essentiell
	1027532	<i>serW</i>	serine tRNA	J	1.4E-6	essentiell
	1092505	<i>asnS</i>	asparaginyt tRNA synthetases	J	4.5E-7	essentiell
	1413982	<i>thrS</i>	threonine tRNA synthetase	J	0	essentiell
	1417093	<i>pheT</i>	phenylalanine tRNA synthetase	J	0	essentiell
	1853277	<i>tyrT</i>	tyrosine tRNA	J	7.7E-7	essentiell
	1872993	<i>hemK</i>	rRNA or tRNA methylase	J	4.8E-5	essentiell
	1996147	<i>aspS</i>	aspartate tRNA synthetase	J	0	essentiell
	2082062	<i>serU</i>	serine tRNA 2	J	n. d.	essentiell
	2250136	<i>metG</i>	methionine tRNA synthetase	J	1.4E-7	essentiell
	2655593	<i>hisS</i>	histidine tRNA synthetase	J	0	essentiell
	2797031	<i>rrfG</i>	5SrRNA	J	0	essentiell
	2797443	<i>rrlG</i>	23S rRNA	J	0	essentiell
	2801558	<i>rrsG</i>	16S rRNA	J	0	essentiell
	2815439	<i>trmD</i>	tRNA methyltransferase	J	0	essentiell
	2815973	<i>rimM</i>	16S rRNA processing protein	J	0	essentiell
	2973314	<i>alaS</i>	alanyl tRNA synthetase	J	n. d.	essentiell
	3190011	<i>lysS</i>	lysine tRNA synthetase	J	0	essentiell
	3201158	<i>prfB</i>	protein chain release factor B	J	0	essentiell
	3369782	<i>cca</i>	tRNA nucleotidyl transferase	J	0	essentiell
	3454305	<i>infB</i>	translation initiation factor 2, GTPase	J	0	essentiell
	3567355	<i>rrfD</i>	5S rRNA	J	0	essentiell
	3567767	<i>rrlD</i>	23S rRNA	J	0	essentiell
	3571905	<i>rrsD</i>	16S rRNA	J	0	essentiell
	3585534	<i>rpsK</i>	30S ribosomal protein S11	J	0	essentiell
	3585847	<i>rpmJ</i>	50S ribosomal protein L36	J	0	essentiell
	3587321	<i>rplO</i>	50S ribosomal protein L15	J	0	essentiell
	3588024	<i>rpmD</i>	ribosomal protein L30	J	0	essentiell
	3588500	<i>rpsE</i>	30S ribosomal protein S5	J	0	essentiell
	3588867	<i>rplF</i>	50S ribosomal protein L6	J	0	essentiell
	3590430	<i>rplE</i>	50S ribosomal protein L5	J	0	essentiell
	3592516	<i>rplP</i>	50S ribosomal protein L16	J	4.0E-6	essentiell
	3592250	<i>rplP</i>		J	0	essentiell
	3594291	<i>rplB</i>	50 S ribosomal protein L2	J	n. d.	essentiell
	3595397	<i>rplD</i>	50S ribosomal protein L4	J	0	essentiell
	3595405	<i>rplC</i>	50S ribosomal protein L3	J	n. d.	essentiell
	3600536	<i>fusA</i>	translation elongation and release factor	J	n. d.	essentiell
	3601973	<i>rpsG</i>	30S ribosomal protein S7	J	0	essentiell
	3840448	<i>glyS</i>	glycine tRNA synthetase	J	0	essentiell
	3842332	<i>glyQ</i>	glycine tRNA synthetase	J	0	essentiell
	4100234		ribosomal operon	J	0	essentiell
	4102455	<i>rrlC</i>	23S rRNA	J	0	essentiell
	4196161	<i>rrsA</i>	16S rRNA	J	0	essentiell
	4198543	<i>rrlA</i>	23S rRNA	J	0	essentiell
	4351232	<i>rrsB</i>	16S rRNA	J	0	essentiell
	4353644	<i>rrlG</i>	23S rRNA	J	0	essentiell
	4355109	<i>rrlB</i>	23S rRNA	J	0	essentiell
	4365623	<i>rplL</i>	50S ribosomal protein L7	J	0	essentiell
	4394777	<i>rrsE</i>	16S rRNA	J	n. d.	essentiell
	4397038	<i>rrlE</i>	23S rRNA	J	0	essentiell
	4399002	<i>rrlX</i>	23S rRNA	J	0	essentiell
	4457779	<i>plsB</i>	glycerolphosphate acyltransferase	J	0	essentiell
	4586654	<i>yjeA</i>	lysyl tRNA synthetase	J	0	essentiell
	1757740	<i>ydcN</i>	putative transcriptional regulator	K	2.7E-6	essentiell
	1796798	<i>rnb</i>	exoribonuclease	K	7.4E-7	neu essentiell
	3377195	<i>rpoD</i>	DNA-directed RNA polymerase subunit	K	0	essentiell
	3457013	<i>nusA</i>	transcription elongation factor	K	0	essentiell
	3583896	<i>rpoA</i>	RNA polymerase alpha subunit	K	3.6E-7	essentiell
	4366336	<i>rpoB</i>	RNA polymerase	K	0	essentiell
	4370453	<i>rpoC</i>	RNA polymerase	K	0	essentiell
	4611503	<i>vacB</i>	exoribonuclease	K	2.6E-7	neu essentiell
	3172041	<i>orf</i>	transcriptional regulator	K	8.7E-7	neu essentiell
	0708421	<i>holA</i>	DNA-polymerase III delta subunit	L	0	essentiell
	1376224	<i>topB</i>	topoisomerase III	L	1.4E-6	essentiell
	1512482	<i>rnt</i>	DNA polymerase III	L	0	essentiell
	1731287	<i>hrpA</i>	ATP-dependent helicase	L	1.2E-6	essentiell
	1980145	<i>ruvB</i>	Holliday junction resolvasome helicase	L	5.0E-6	essentiell
	2144403	<i>sbcB</i>	exonuclease I	L	0	neu essentiell
	2374649	<i>gyrA</i>	DNA gyrase	L	0	essentiell
	2539341	<i>lig</i>	NAD-dependent DNA-Ligase	L	0	essentiell

Klasse	Insertion (bps)	Gen	Funktion	COG	IPC	Anmerkung
	2610290	<i>yfgE</i>	ATPase involved in DNA replication	L	0	essentiell
	2787846	<i>ung</i>	uracil-DNA-glycosylase	L	1.1E-6	neu essentiell
	3050504	<i>mutS</i>	mutS-like ATPase, mismatch repair	L	4.7E-6	essentiell
	3154880	<i>recC</i>	exonuclease V	L	0	neu essentiell
	4039553	<i>gyrB</i>	DNA gyrase B	L	0	essentiell
	4041801	<i>recF</i>	DNA repair ATPase	L	0	essentiell
	4120506	<i>rep</i>	DNA/RNA helicase	L	0	essentiell
	4206839	<i>polA</i>	DNA exonuclease	L	0	essentiell
	4802826	<i>dnaC</i>	DNA replication protein	L	0	essentiell
Andere	0198916	<i>gcd</i>	glucose dehydrogenase	R	0	neu essentiell
	0493414	orf	TPR repeat protein	R	0	neu essentiell
	0667526	<i>ybdN</i>	PAPS reductase	R	7.5E-6	neu essentiell
	0678014	<i>ybdR</i>	threonine dehydrogenase	R	1.4E-6	neu essentiell
	0732168	<i>ybeX</i>	hypothetical protein, containing CBS domain	R	3	essentiell
	1256134	<i>mviN</i>	membrane protein	R	1.4E-6	essentiell, essentiell in Sinorhizobium
	1441903	<i>ydiN</i>	MFS family transport protein	R	0	neu essentiell
	1591866	<i>yciG</i>	general stress protein	R	0	neu essentiell
	1658666	<i>smvA</i>	MFS family transport protein	R	1.8E-6	neu essentiell
	1850466	<i>yckK</i>	esterase of the alpha/b hydrolase superfamily	R	0	neu essentiell
	2194168	<i>wcaF</i>	acetyltransferase	R	6.8E-7	neu essentiell
	2195255	<i>wcaD</i>	glycosyl transferase	R	0	neu essentiell
	2322398	<i>bcr</i>	MFS family permease	R	0	neu essentiell
	2402940	<i>pmrG</i>	polymyxin resistance protein G	R	6.9E-6	neu essentiell
	3010661	<i>avrA</i>	virulence gene	R	0	neu essentiell
	3026263	<i>sipA</i>	actin-binding protein	R	0	non essentiell!
	3030494	<i>sspB</i>	stringent starvation protein B	R	0	starvation
	3310886	<i>hybB</i>	cytochrome component of hydrogenase	R	4.9E-7	neu essentiell
	3470878	<i>yhbZ</i>	GTPase	R	0	essentiell
	3508826	<i>yhcK</i>	hypothetical transcriptional regulator	R	4.1E-7	essentiell
	4506643	<i>yjcD</i>	permease with ATP/GTP-binding site	R	2.6E-6	neu essentiell
	4599589	<i>yjeE</i>	ATPase or kinase	R	4.4E-6	essentiell
	0298449	orf	hypothetical	S	4.6E-6	neu essentiell
	0308511	orf	hypothetical	S	4.0E-6	neu essentiell
	0389348	orf	hypothetical	S	0	neu essentiell
	0389385	orf	hypothetical	S	0	neu essentiell
	0433405	<i>yaiY</i>	hypothetical	S	5.0E-6	essentiell
	0598332	<i>lpxH</i>	UDP-2,3-diacetylglucosamine hydrolase	S	0	essentiell
	0616098	orf	hypothetical protein	S	0	neu essentiell
	0829694	orf	hypothetical	S	0	neu essentiell
	0854459	orf	hypothetical	S	1.3E-6	neu essentiell
	0878747	<i>ybhP/ybhQ</i>	hypothetical	S	1.0E-6	neu essentiell
	0953028	<i>ybjO</i>	hypothetical	S	0	neu essentiell
	0955809	orf	hypothetical	S	0	neu essentiell
	1007534	orf	hypothetical	S	2.0E-6	neu essentiell
	1101514	orf	hypothetical	S	7.5E-7	neu essentiell
	1113807	orf	hypothetical	S	5.1E-7	neu essentiell
	1138706	orf	hypothetical	S	7.0E-6	neu essentiell
	1184682	orf	hypothetical	S	2.3E-6	neu essentiell
	1205528	<i>yccJ</i>	hypothetical	S	1.5E-6	neu essentiell
	1217792	orf	hypothetical	S	1.3E-6	neu essentiell
	1218715	orf	hypothetical	S	0	neu essentiell
	1222717	orf	hypothetical	S	0	neu essentiell
	1231733	orf	hypothetical	S	0	neu essentiell
	1245246	<i>yceI</i>	hypothetical	S	8.3E-7	neu essentiell
	1332265	orf	hypothetical	S	0	neu essentiell
	1338246	orf	hypothetical	S	1.6E-6	neu essentiell
	1618929	orf	hypothetical	S	0	neu essentiell
	1628304	orf	hypothetical	S	0	neu essentiell
	1727005	orf	hypothetical	S	1.3E-6	neu essentiell
	1927993	<i>yoaE</i>	hypothetical protein containing CBS domain	S	2.3E-6	neu essentiell
	1963367	<i>mig-3</i>	hypothetical	S	7.8E-7	neu essentiell
	2141746	<i>phsA/sopA</i>	dehydrogenase/hypothetical	S	1.1E-6	neu essentiell
	2168412	<i>rfbV</i>	hypothetical	S	0	neu essentiell
	2340969	<i>H2</i>	hypothetical	S	4.2E-6	neu essentiell
	2377384	orf	hypothetical	S	1.2E-6	neu essentiell
	2647762	<i>sinI</i>	hypothetical	S	3.2E-6	neu essentiell
	2652682	<i>engA</i>	GTPase	S	0	essentiell
	2763882	orf	hypothetical	S	0	neu essentiell
	2773624	orf	hypothetical	S	8.6E-7	neu essentiell
	2992049	orf	hypothetical	S	2.5E-6	neu essentiell

Klasse	Insertion (bps)	Gen	Funktion	COG	IPC	Anmerkung
	3138341	orf	permease	S	4.8E-7	neu essentiell
	3186873	orf	hypothetical	S	1.8E-6	neu essentiell
	3249369	orf	hypothetical	S	8.1E-6	neu essentiell
	4497991	orf	hypothetical	S	1.5E-6	neu essentiell
	4651769	<i>ytfP</i>	hypothetical	S	1.8E-6	neu essentiell
	4671007	orf	hypothetical	S	4.8E-7	neu essentiell
	4714418	<i>miae</i>	hypothetical	S	3.2E-6	neu essentiell
	4716329	<i>yjgM</i>	hypothetical	S	0	essentiell
	0339735	orf	hypothetical	S	5.6E-6	neu essentiell
	4856084	<i>yjiY</i>	hypothetical	J	1.2E-6	essentiell

COG-Klassifizierung:

 Information storage and processing

- J Translation, ribosomal structure and biogenesis
- K Transcription
- L DNA replication, recombination and repair

 Cellular processes

- D Cell division and chromosome partitioning
- O Posttranslational modification, protein turnover, chaperones
- M Cell envelope biogenesis, outer membrane
- N Cell motility and secretion
- P Inorganic ion transport and metabolism
- T Signal transduction mechanisms

 Metabolism

- C Energy production and conversion
- G Carbohydrate transport and metabolism
- E Amino acid transport and metabolism
- F Nucleotide transport and metabolism
- H Coenzyme metabolism
- I Lipid metabolism
- Q Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism

 Poorly characterized

- R General function prediction only
- S Function unknown

7.3 Tabelle II

Tabellarische Auflistung der identifizierten IDM-Insertionen in *L. monocytogenes*, die eine Attenuation der Replikation in Caco-2 Zellen bewirkten. Die Angaben in der dritten Spalte beziehen sich auf den Insertionslocus auf dem Chromosom von *L. monocytogenes*.

Klasse	Mutante	Insertion (bps)	Insertionslocus (bps)	Genfunktion	Replikation in Caco-2 (Verminderungsfaktor vs. WT)	In vitro Wachstum
DNA Rekombination	INT01.43=	2356686 -	addB (2356325 -	similar to ATP-dependent deoxyribonuclease subunit B	129 *	vermindert
	INT05.14	2356891	2359798)			
	INT04.38 =	2017875 -	recS (2016858 -	similar to ATP-dependent DNA helicase	6	wildtypisch
	INT04.01	2018055	2018261)			
INT07.22 =	1.390.648 -	lmo1367(1.390.222 -	similar to arginine repressor	33	vermindert	
INT07.47	1.390.845	1.390.671) recN (1.390.649 - 1.392.385)				
DNA und RNA-Modifizierung	INT06.20	155081 - 154892	lmo0157 (153608 - 155947)	similar to ATP-dependent helicase	3	wildtypisch
	INT06.88	1.820.344 - 1.820.484	lmo1751 (1.820.133 - 1.821.494)	similar to hypothetical RNA methyltransferase	9	wildtypisch
	INT07.13	2.563.886 - 2.564.250	uvrA (2.562.591 - 2.565.461)	exonuclease ABC (subunit A)	5	vermindert
	INT08.11	2.133.608 - 2.133.749	lmo2050 (2.132.412 - 2.134.652)	similar to exonuclease ABC (subunit A)	7	wildtypisch
Protein Modifizierung	INT01.58	657804 - 657927	lmo0618 (657323 - 657927)	similar to protein kinase	16	vermindert
Metabolismus von Nukleotiden	INT06.43	60061 - 59589	purA (58897 - 60189)	highly similar to adenylosuccinat synthetase	13	wildtypisch
Metabolismus von Aminosäuren und ähnlichen Molekülen	INT03.50	2770520 - 2770753	lmo2694 (2770060 - 2771439)	similar to lysine decarboxylase	8	wildtypisch
	INT03.85	2135074 - 2135478	lmo2051(2134695 - 2135735)	weakly similar to proteases	6	wildtypisch
	INT04.07	2852534 - 2852219 (mind)	lmo2770 (2850620 - 2852950)	similar to gamma-glutamyl-cysteine synthetase (N-terminal part) and to cyanophycin synthetase (C-terminal part)	13	wildtypisch
	INT04.15=	1009323 -	lmo0978 (1009098 -	similar to branched-chain amino acid aminotransferase	19 *	vermindert
	INT07.38	1009705	1010117)			
	INT06.04	2503657 - 2503747	lmo2434 (2502401 - 2503804)	highly similar to glutamate decarboxylase	3	wildtypisch
	INT06.76 =	2.002.708 -	aroB (2.002.045 -	similar to 3-dehydro-quinat synthase	270 *	vermindert
INT08.30	2.002.860	2.003.142) = lmo1927				
INT07.90	2.055.177 - 2.055.492	ilvD (2.054.493 - 2.056.187) = lmo1983	similar to dihydroxy-acid dehydratase	8	wildtypisch	
Metabolismus von Coenzymen und Vitaminen	INT03.86	701505 - 701879	thiD (701247 - 702062) = lmo0062	highly similar to phosphomethylpyrimidine kinase thiD	19	wildtypisch
	INT05.01	2103571 - 2103403	nadB (2102608 - 2104062) = lmo2023	similar to L-aspartate oxidase	5	wildtypisch
	INT06.58	1.730.500 - 1.730.608	menF (1.730.392 - 1.731.780) = lmo1676	similar to menaquinone-specific isochorismate synthase	200 *	vermindert
Regulation	INT04.79	2030803 - 2031091	fur (2030744 - 2031196)	similar to transcriptional regulator (Fur family)	8	wildtypisch
	INT05.07	54189 - 54061	lmo0051 (53944 - 54672)	similar to 2-component response regulator protein (AgrA from Staphylococcus)	5	wildtypisch

* zusätzlich verminderte Adhäsions- und/oder Invasionseigenschaft. Gene, die laut Microarray Studien während der intrazellulären Lebensphase von *L. monocytogenes* in Caco-2 Zellen hochreguliert sind.

Klasse	Mutante	Insertion (bps)	Insertionslocus (bps)	Genfunktion	Replikation in Caco-2 (Verminderungsfaktor vs. WT)	In vitro Wachstum
Transport / Bindeproteine	INT02.12	1462658 - 1462802	lmo1431 (1461866 - 1463467)	similar to ABC transporter (ATP binding protein)	7	wildtypisch
	INT03.83	1701555 - 1701743	lmo1652 (1700523 - 1702292)	similar to ABC transporter (ATP binding protein)	5	vermindert
	INT04.18 = INT03.95	2939924 - 2939542	lmo2850 (2938662 - 2939930)	similar to sugar transport protein	42	wildtypisch
	INT04.43 = INT04.63	2206160 - 2206411	lmo2124 (2205709 - 2207016)	similar to maltodextrin ABC transport system (permease)	5	wildtypisch
	INT06.41	2280912 - 2280606	lmo2192 (2280238 - 2281206)	similar to oligopeptide ABC-transporter (ATP-binding protein)	51 *	wildtypisch
	INT06.65	2.045.224 - 2.045.344	lmo1971 (2.044.481 - 2.045.749)	similar to pentitol PTS system enzyme IIC component	6	wildtypisch
	INT06.96	1.701.555 - 1.701.743	lmo1652 (1.700.523 - 1.702.292)	similar to ABC transporter (ATP binding protein)	6	wildtypisch
	INT06.85 = INT06.64 = INT06.90 = INT08.06	811.746 - 812.036	lmo0787 (811.813 - 813.189)	similar to amino acid transporter	5	wildtypisch
	INT07.03	1.034.510 - 1.034.717	lmo1003 (1.033.190 - 1.034.908)	phosphotransferase system enzyme I	5 **	wildtypisch
	INT08.24	1.681.346 - 1.681.412	lmo1636 (1.680.644 - 1.681.564)	similar to ABC transporter (ATP binding protein)	14 *	vermindert
INT07.72	691.856 - 692.030 od. 691.735 - 691.839	lmo0650 (691.581 - 694.271)	conserved membrane protein	4	wildtypisch	
Proteinsekretion	INT05.47	1293698 - 1293472	lmo1269=sipX (1293088 - 1293654)	similar to type I signal peptidase	8	wildtypisch
Zelloberfläche	INT02.22	2580552 - 2581007	lmo2504 (2580470 - 2581780)	similar to cell wall binding proteins	7	wildtypisch
	INT04.23 = INT04.12	456258 - 455828	inIA (454534 - 456936)	internalin A	195 *	wildtypisch
	INT07.05	614.480 - 614.677	lmo0576 (613.836 - 615.299)	hypothetical cell wall associated protein	6	wildtypisch
	Spezifische Pathways	INT02.03	1321547 - 1321247	glpD (1320608 - 1322284 bp)	similar to glycerol 3 phosphate dehydrogenase	7
	INT02.95	1204918 - 1204675	eutB (1203634 - 1204998)	similar to ethanolamine ammonia-lyase (heavy chain)	20	wildtypisch
	INT04.16	282134 - 281744	lmo0261 (281021 - 282481)	similar to phospho-beta-glucosidase	5	wildtypisch
	INT05.28	1574739 - 1574817	lmo1538 (1573354 - 1574847)	similar to glycerol kinase	7	vermindert
	INT06.44	2809607 - 2809367	lmo2734 (2807459 - 2810107)	weakly similar to sugar hydrolase	6	wildtypisch
	INT07.20 = INT07.21	2.253.763 - 2.253.862	lmo2172 (2.253.221 - 2.254.804)	similar to propionate CoA-transferase	5	vermindert
	INT08.43	294.271 - 294.576	lmo0271 (293.845 - 295.281)	highly similar to phospho-beta-glucosidase	6	wildtypisch
	INT04.81	1270188 - 1269987	lmo1244 (1269834 - 1270433)	weakly similar to phosphoglycerate mutase 1	12	wildtypisch

* zusätzlich verminderte Adhäsions- und/oder Invasionseigenschaft. Gene, die laut Microarray Studien während der intrazellulären Lebensphase von *L. monocytogenes* in Caco-2 Zellen hochreguliert sind.

** Intrazelluläre Replikation nur schwach vermindert, da sich die Insertion relativ nahe am Gen-Ende befindet und dadurch ev. dennoch ein funktionales Protein synthetisiert werden kann.

Klasse	Mutante	Insertion (bps)	Insertionslocus (bps)	Genfunktion	Replikation in Caco-2 (Verminderungsfaktor vs. WT)	In vitro Wachstum
Unbekannte Proteine	INT03.72 =	2645402 -	lmo2566 (2645310 -	similar to unknown protein	9	wildtypisch
	INT03.76 =	2645598	2646146)			
	INT03.80					
	INT03.77	789472 - 789108	lmo0763 (788642 - 789514)	similar to unknown protein	8 *	wildtypisch
	INT03.88	229367 - 229135	lmo0221(229045 - 229824)	conserved hypothetical protein	10	vermindert
	INT04.04	822008 - 822103	lmo0794 (821886- 822527)	similar to B. subtilis YwnB protein	18	wildtypisch
	INT04.28	1527067 - 1527194	lmo1495 (1526748 - 1527371)	similar to unknown protein	9	wildtypisch
	INT04.44	815665 - 816015	lmo0788 (813451 - 817878)	hypothetical protein	9	wildtypisch
	INT04.45	1405428 - 1405156	lmo1379 (1404714 - 1405541)	similar to B. subtilis SpoIIJ protein	7	wildtypisch
	INT04.94 =	975212 -	2 pot. Insertionsloci:	keine Angabe	6	wildtypisch
	INT05.09	975082 bzw. 976195 - 976086	lmo0940 (975071 - 976033) bzw. lmo0941 (976065 - 977039)			
	INT06.42	1526506 - 1526808 (mind.)	Überlappend: lmo1494 (1525997 - 1526698) / lmo1495 (1526748 - 1527371)	similar to 5'- methylthioadenosine / S- adenosylhomocysteine nucleosidase / similar to unknown proteins (vgl. INT04.28)	6	vermindert
	INT05.74	826979 - 827192	lmo0799 (826752 - 827513)	hypothetical protein	12	wildtypisch
	INT06.23	1906304 - 1906003	lmo1830 (1905952 - 1906551)	similar to conserved hypothetical proteins	17	wildtypisch
	INT06.39	1429865 - 1430062	lmo1402 (1429765 - 1430127)	similar to B. subtilis YmcA protein	3	wildtypisch
	INT08.52	785.309 - 785.511	lmo0759 (784.788 - 785.747)	similar to unknown proteins	4	wildtypisch
	INT07.86	628.141 - 628.447	lmo0587 (626.506 - 628.971)	putative secreted protein	5	wildtypisch
	INT07.94	624.883 - 625.246	lmo0585 (624.682 - 625.395)	putative secreted protein	7	wildtypisch
	INT01.80	1844188 - 1844448	lmo1771 / purC überlappend (1843993 - 1844238 / 1844250 - 1844963)	similar to unknown protein / phospho- ribosylaminoimidazole succinocarboxamide synthetase	16	wildtypisch
	INT02.85 =	1466832 -	lmo1434 (1465638 -	similar to unknown protein	14 *	vermindert
INT06.09	1467113	1467305)				
INT07.41	261.396 - 261.634	lmo0241 (261.306 - 262.061)	similar to conserved hypothetical proteins like to <i>B. subtilis</i> YacO protein	6	wildtypisch	
Gemischtes	INT05.12	203088 - 202871	prs (202641 - 203597)	phosphoribosyl pyrophosphate synthetase	139 *	vermindert
	INT06.40	72933 - 73361	lmo0066 (72408 - 74222)	similar to toxin component	4	wildtypisch
	INT07.16 =	738.312 -	lmo0705 (738.191 -	similar to flagellar hook- associated protein FlgK	4	wildtypisch
	INT07.26 =	738.629	739.711)			
	INT07.40					
	INT08.27	1.026.948 - 1.027.029	clpE (1.026.871 - 1.029.045)	ATP-dependent protease	600 *	vermindert
	INT08.29	98.635- 98.958	lmo0090 (98.409 - 99.905)	similar to ATP synthase alpha chain	4	wildtypisch
	INT07.18	2.893.429 - 2.893.816	gidA (2.892.596 - 2.894.485)	highly similar to GidA protein	6	wildtypisch
INT08.36	2.542.176 - 2.542.427	clpP (2.542. 014 - 2.542. 610)	ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit	375 *	vermindert	

* zusätzlich verminderte Adhäsions- und/oder Invasionseigenschaft. Gene, die laut Microarray Studien während der intrazellulären Lebensphase von *L. monocytogenes* in Caco-2 Zellen hochreguliert sind.

Publikationen, Gastvorträge, Posterpräsentationen und Workshops

Publikationen

Schmalfuß, J., Matthes, B., Knuth, K. and Böger, P. (2000). Inhibition of Acyl-CoA elongation by chloroacetamide herbicides in microsomes from leek seedlings. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 67: 25-35.

Knuth, K., Niesalla, H., Hueck, C. J., Fuchs, T. M. (2004). Large-scale identification of essential *Salmonella* genes by trapping lethal insertions. *Molecular Microbiology*, 51(6): 1729-1744.

Gastvorträge

Identification of genes contributing to the virulence of *Listeria monocytogenes*. Seminar, Zentralinstitut für Ernährungs- und Lebensmittelforschung (ZIEL), Abteilung Mikrobiologie, Lehrstuhl Prof. S. Scherer, TU München, 02.12.2003.

Posterpräsentationen

Niesalla, H. S., Bäuscher, C., Schneider, I., Knuth, K., Fuchs, T. M., Hueck, C. J., Freissler, E. A. (2002). Efficient in vitro screening method for virulence genes of *Salmonella* sv. Typhimurium. Strategies for Immune Therapy Kongress, Würzburg.

Knuth, K., Niesalla, H. S., Hueck, C. J., Fuchs, T. M. (2002). Genome Scanning Mutagenesis (GSM): a powerful tool for the identification of novel antimicrobial targets. Drug Discovery Technology Kongress, Stuttgart.

Knuth, K., Niesalla, H. S., Bäuscher, C., Schneider, I., Hueck, C. J., Freissler, E. A., Fuchs, T. M. (2002). Functional genome analysis of pathogenic bacteria: efficient identification of essential genes by genome scanning mutagenesis (GSM). Genomics in Infectious Diseases Kongress, Würzburg.

Slaghuis, J., Beck, M., Knuth, K., Rotenberg, E., Joseph, B., Stahl, B., Schmitt, J. J., Spory, A., Kreft, J., Goebel, W. (2003). Functional genome analysis for identification and characterisation of anti-listerial agents and their mechanism of action. Symposium of the Competence Network PathoGenoMik, Würzburg bzw. Euroconference on understanding and improving specific interactions, Castelvecchio, Italien bzw. European conference on procaryotic genomes, Göttingen.

Workshops

Pathogenomics – from genes to function (09/2002). Late summer workshop of the European Graduate College and the Competence Network PathoGenoMik, Würzburg.

Curriculum vitae

Karin Knuth
geb. am 20. Januar 1974 in Biberach/Riss
deutsche Staatsangehörigkeit

Schulbildung

1980–1984

Grundschule in Warthausen

1984–1993

Pestalozzi-Gymnasium in Biberach/Riss, Abschluss: Abitur

Studium

10/1993–11/1999

Biologie und Französisch an der Universität Konstanz,
Abschluss: Staatsexamen

10/1996–03/1997

Lettres Modernes, Université de Metz, Frankreich

05/1998–11/1998

Staatsexamensarbeit am Lehrstuhl für Pflanzenphysiologie,
bei Prof. Peter Böger, Forschungsgebiet: Enzymatische
Untersuchungen zur Wirkungsweise von Herbiziden.

Titel: „Einfluss von herbizidalen Chloracetamiden auf die
Fettsäureelongation in *Allium porrum*“.

Promotion

09/2000–12/2003

am Lehrstuhl für Mikrobiologie der Universität Würzburg, bei
Prof. Werner Goebel und bei der Creatogen AG in
Augsburg. Bearbeitung eines Themas des BMBF-
geförderten Projekts „Kompetenznetzwerk PathoGenoMiK –
Genomforschung an pathogenen Bakterien“.

Titel: „Identifizierung von essentiellen Genen in *Salmonella*
typhimurium und *Listeria monocytogenes* durch Genom-
weite Mutagenese“