
BAYERISCHE JULIUS-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT WÜRZBURG
LEHRSTUHL FÜR MIKROBIOLOGIE

Interaktion von *Listeria monocytogenes* mit Endothelzellen

Dissertation

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

vorgelegt von

Lars Greiffenberg
aus Gehrden

Würzburg, 2000

Eingereicht am:

Vorsitzender
der Kommission:

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

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

Die vorliegende Arbeit hat weder in gleicher noch in ähnlicher Form in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen.

Hiermit erkläre ich, daß ich, abgesehen vom „Diplom-Biologe Univ.“, keine weiteren akademischen Grade erworben habe oder versucht habe solche zu erwerben.

Würzburg, den

132.187.98.122

Der experimentelle Teil dieser Doktorarbeit wurde von November 1996 bis Februar 2000 am Lehrstuhl für Mikrobiologie des Theodor-Boveri-Instituts für Biowissenschaften der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg durchgeführt.

Die Arbeit wurde mit Mitteln der Europäischen Union (BIOMED 2 Projekt „Listeria Eurolab“, grant CT950659) gefördert.

Als Kooperationspartner waren an dieser Arbeit folgende Personen beteiligt: PROF. DR. KWANG S. KIM, DR. MONIQUE F. STINS, PROF. DR. HANS-J. SCHNITTLER, DR. ZELJKA SOKOLOVIC, DR. ANDREAS BUBERT, PROF. DR. GEORG KROHNE und CLAUDIA GEHRIG.

Außerdem möchte ich mich bei meinem Betreuer PD DR. MICHAEL KUHN bedanken, der mir sowohl mit seiner wissenschaftlichen wie auch mit seiner menschlichen Unterstützung stets sehr geholfen hat und dadurch einen großen Beitrag zur Fertigstellung dieser Arbeit geleistet hat.

Herrn PROF. DR. WERNER GOEBEL bin ich für die Überlassung des Themas und für seine ständige Hilfsbereitschaft zu Dank verpflichtet.

Neben der Hilfe vieler anderer Lehrstuhlmitarbeiter wurde mir freundschaftliche Unterstützung in erster Linie von DR. JUSTIN D. DANIELS und DR. FREDI ENGELBRECHT zuteil. Besonders bedanken möchte mich aber bei THILO PFEUFFER, der mir während der gesamten Studien- und Promotionszeit ein treuer Freund war.

Außerdem gilt mein aufrichtiger Dank Frau ELLEN APPEL, die mir stets mit Rat und Tat zur Seite stand.

Bei meinen lieben Eltern möchte ich mich für die Geduld und Großzügigkeit bedanken, durch die sie mir eine unbeschwerte Promotionszeit ermöglicht haben.

Zusammenfassung

Listeria monocytogenes überwindet endotheliale Barrieren, um eine Meningitis oder Encephalitis auszulösen. Das Hindurchtreten durch diese Barriere könnte über die Invasion von Endothelzellen durch Listerien aus dem Blut und anschließender Freisetzung der Bakterien ins Gehirn erfolgen.

In den ersten Infektionsmodellen, in denen gezeigt wurde, daß Listerien in der Lage sind Endothelzellen zu invadieren, wurden humane, makrovaskuläre Nabelschnurendothelzellen (HUVEC) verwendet. Die für die Ausbildung der Blut-Hirn-Schranke verantwortlichen mikrovaskulären Hirnendothelzellen (BMEC) unterscheiden sich aber deutlich von den makrovaskulären HUVEC. In der vorliegenden Arbeit wurde die Interaktion von *L. monocytogenes* mit HUVEC und mit humanen BMEC (HBMEC) untersucht.

Es konnte gezeigt werden, daß *L. monocytogenes* HBMEC effizient invadieren kann. Nach der Aufnahme und dem Entkommen der Bakterien aus dem Phagosom bilden sie Aktinschweife aus, mit deren Hilfe sie sich im Zytoplasma frei bewegen können. Listerien sind in der Lage, sich in HBMEC über einen Zeitraum von 20 Stunden zu vermehren und über eine Ausbreitung von Zelle zu Zelle in benachbarte Zellen zu gelangen.

Mit einem Listerien-Stamm, der das grün-fluoreszierende Protein (GFP) exprimiert, konnte der Infektionsverlauf in HBMEC über einen Zeitraum von 20 Stunden in Echtzeit verfolgt werden. Hierbei zeigte sich, daß auch stark infizierte HBMEC sich nicht vom Untergrund ablösen oder lysieren und somit gegenüber intrazellulären Listerien sehr widerstandsfähig sind.

Wie rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von HBMEC-Monolayern nach einer Infektion mit *L. monocytogenes* erkennen ließen, adhären Listerien an HBMEC, indem sie einen engen Kontakt mit Mikrovilli auf HBMEC eingehen. Mit Listerien infizierte HBMEC bilden wenige Stunden nach der Infektion Membranausstülpungen aus, in denen sich Listerien befinden. Diese Ausstülpungen sind mit der Zelle nur noch über sehr dünne Membranschläuche verbunden.

Um herauszufinden, welche Listerienproteine an der Aufnahme von *L. monocytogenes* in HUVEC und HBMEC beteiligt sind, wurden verschiedene Deletionsmutanten auf ihre Invasivität in HUVEC und HBMEC getestet.

In Gegenwart von 20 % Humanserum wurden HUVEC in einer von den Oberflächenproteinen InlA, InlB und ActA unabhängigen Weise von *L. monocytogenes* invadiert. Wurde das Gen, welches für den positiven Regulationsfaktor PrfA kodiert, deletiert, reduzierte dies die Invasionsrate beträchtlich.

Listerienstämme mit einer Deletion im für InlB kodierenden Gen sind unfähig, HBMEC zu invadieren. Neben InlG und ActA spielt auch PrfA eine entscheidende Rolle bei der Invasion von *L. monocytogenes* in HBMEC. Die Adhäsion von *L. monocytogenes* an HBMEC ist von InlB unabhängig. Auch die apathogene und nicht-invasive Art *L. innocua* bindet an HBMEC.

Humanserum hemmt die Invasion von *L. monocytogenes* in HBMEC, nicht aber in HUVEC. Während sich die Invasionsraten von *L. monocytogenes* in HUVEC durch Zentrifugation bei der Infektion erhöhen ließen, hatte die Zentrifugation keine Auswirkung auf die Invasivität von *L. monocytogenes* in HBMEC. Neben diesen konnten in dieser Arbeit noch weitere Infektionsparameter gefunden werden, die unterschiedliche Auswirkungen auf die Invasion von *L. monocytogenes* in HUVEC und HBMEC haben.

Im Zellüberstand von HUVEC konnten bis zu 6 Stunden nach einer Infektion mit *L. monocytogenes* große Mengen an IL-8 nachgewiesen werden. Während eine Infektion von HUVEC mit *L. monocytogenes* die Expression von IL-6-spezifischer mRNA schwach induzierte, war keine vermehrte Expression von MCP-1- und VCAM-1-spezifischer mRNA feststellbar.

Indem Caco-2-Zellen und HBMEC auf gegenüberliegenden Seiten eines Filters bis zur Konfluenz kultiviert wurden, konnte ein *in-vitro*-Modell des *choroid plexus* etabliert werden. Wenige Stunden nach der Infektion von HBMEC mit *L. monocytogenes* befanden sich auch in den Caco-2-Zellen Listerien. Wie elektronenmikroskopisch nachgewiesen werden konnte, waren diese Listerien durch die Filterporen in die Epithelzellen gelangt. Der Mechanismus, dem diese Ausbreitung zugrunde liegt, ist noch unbekannt.

1 Einleitung

1.1 *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes und *L. ivanovii* sind Gram-positive, ubiquitär vorkommende Umweltkeime. Beide gehören zu den fakultativ intrazellulären Bakterien und können ernsthafte Erkrankungen von Mensch und Tier verursachen (Seeliger, 1984). In der Literatur wird *L. ivanovii* vornehmlich als tierpathogen bezeichnet; in Einzelfällen sind aber auch Infektionen bei Menschen, insbesondere bei immunsupprimierten, beschrieben worden (Ivanov, 1962; Cummins *et al.*, 1994). Zur Gattung *Listeria* gehören darüber hinaus noch die apathogenen Umweltkeime *L. seeligeri*, *L. innocua*, *L. welshimeri* und *L. grayi* (Seeliger, 1984).

Die Infektion mit Listerien wird als Listeriose bezeichnet. Für die humane Listeriose sind in erster Linie mit Listerien kontaminierte Lebensmittel verantwortlich (Farber und Peterkin, 1991). Die Fähigkeit der Listerien, auch noch bei 4 °C, also bei Kühlschranktemperaturen zu wachsen, ermöglicht es ihnen, auch in gekühlten Lebensmitteln kritisch hohe Keimzahlen zu erreichen. Bei immungeschwächten Personen kann schon ab einer Keimzahl von ca. 10^6 eine Listeriose ausgelöst werden (Farber und Peterkin, 1991). Besonders gefährlich ist die Listeriose beim Fötus. Hierbei kommt es zum diaplazentalen Übertritt der Erreger von der infizierten Schwangeren auf das Kind (Hof, 1990). Im Ungeborenen breiten sich die Bakterien aus und verursachen eine weit gestreute Sepsis. Frühgeburt, Frühtotgeburt oder Totgeburt können die Folge sein. Bei den lebend Geborenen beträgt die Letalitätsrate in den ersten Wochen nach der Geburt ca. 50 %. Jedoch sind auch immer wieder Spätschäden in Form von geistigen Entwicklungsstörungen zu beobachten (Bieler-Niederer, 1979; Mylonakis *et al.*, 1998). Listeriose tritt in der Regel als Infektion des Nervensystems (Meningitis, Encephalitis, Meningoencephalitis) oder als Bakteriämie (Blutvergiftung oder Sepsis) auf. Endokarditis oder Hepatitis werden sehr selten beschrieben. Etwa 1-5 % der Infektionen mit *L. monocytogenes* verlaufen asymptomatisch; die Personen werden zu „Listerienträgern“ und stellen für das Pathogen ein Reservoir dar (Lennon *et al.*, 1984). Die mit der Nahrung aufgenommenen Listerien sind in der Lage, die Darmbarriere zu überwinden. Ob für die Aufnahme nur M-Zellen oder auch „normale“ Darmepithelzellen in Betracht kommen, ist noch nicht hinreichend geklärt. Beide Infektionswege werden beschrieben (Racz *et al.*, 1972; Pron *et al.*, 1998).

Zunächst vermehren sich die Listerien in phagozytischen Zellen, die mit den Peyerschen Platten assoziiert sind (Pron *et al.*, 1998). Die Verbreitung erfolgt sodann über die Blut- und/oder die Lymphbahn hin zu Leber und Milz. Ob die Infektion dann endet oder aber systemisch wird, entscheidet sich in der Leber (Mackaness, 1971; Lepay *et al.*, 1985). Im Mausmodell (Mackaness, 1971) werden nach einer Infektion mehr als 90 % der Bakterien in der Leber abgetötet. Verantwortlich hierfür sind residente Makrophagen, die

sogenannten Kupffer-Zellen. Die von den überlebenden Bakterien infizierten Hepatozyten werden zum größten Teil in den ersten 24 Stunden nach der Infektion von neutrophilen Granulozyten lysiert. Bei diesem Prozeß freiwerdende Listerien werden von Neutrophilen und von Makrophagen aufgenommen. Ob es dabei zu einer vollständigen Eliminierung der Bakterien kommt oder nicht, hängt vom jeweiligen Immunstatus des Wirtes ab. Soweit flottierende Listerien im Blut und im lymphatischen System verbleiben, können sich diese frei oder in den Wirtszellen weiter vermehren und von dort aus andere Organe wie die Plazenta oder das Gehirn befallen (López *et al.*, 1999).

Im Gegensatz zu *Legionella pneumophila* oder *Salmonella enteritidis*, die nach der Aufnahme durch die Wirtszelle im Phagosom verbleiben, sind *L. monocytogenes* und *L. ivanovi* in der Lage, aus diesem zu entkommen und ins Zytoplasma der Wirtszelle zu gelangen (Gaillard *et al.*, 1987; Tilney und Portnoy, 1989; Karunasagar *et al.*, 1993). Gleiches gilt für *Shigella flexneri* und *Rickettsia rickettsii*. Voraussetzung für die Invasion der meisten pathogenen Bakterien in die Wirtszelle ist die spezifische Adhäsion an diese. Bei der Invasion von Listerien wird der Invasionsmechanismus auch als „Zipper-Mechanismus“ bezeichnet (Isberg und Nhieu, 1994; Parida *et al.*, 1998). Hierbei kommt es zur Aufnahme der Bakterien, indem die Zytoplasmamembran der Wirtszelle das Bakterium umfließt. *Salmonella* und *Shigella* hingegen gelangen über einen sogenannten „Trigger-Mechanismus“ in die Wirtszelle (Finlay *et al.*, 1991; Francis *et al.*, 1993). Bei dieser Aufnahmeform führen massive Veränderungen des Zytoskeletts zu Membranausstülpungen, durch welche die Bakterien in die Wirtszellen gelangen. Diesen Vorgang bezeichnet man als „membrane ruffling“. Ist die Aufnahme abgeschlossen, befinden sich die Listerien in einem Phagosom. Die Membran des Phagosoms wird in kurzer Zeit durch das porenbildende Toxin Listeriolysin O (LLO), das von den Listerien sezerniert wird, aufgelöst (Tilney und Portnoy, 1989). Die sich nun frei im Zytosol befindenden Listerien beginnen mit der Polymerisation von zellulärem G-Aktin. Zunächst werden die Bakterien von einer diffusen Aktin-Wolke umgeben. Im weiteren Verlauf entsteht am einen Pol des Bakteriums ein kometenartiger Aktinschweif (Tilney *et al.*, 1990). Indem die Bakterien am Pol fortwährend G-Aktin polymerisieren, der Aktinschweif selbst aber stationär bleibt, können sich die Listerien frei durch das Zytoplasma bewegen (Cossart und Kocks, 1994). Stoßen sie nun an die Innenseite der Zellmembran, entstehen Ausstülpungen der Zytoplasmamembran, in deren Spitzen sich die Bakterien befinden. Eine solche Struktur kann wiederum von einer benachbarten Zelle phagozytiert werden. Das nun in der Nachbarzelle befindliche Bakterium ist jetzt von einer Doppelmembran umgeben, aus der es sich ebenfalls befreien kann. An der Lyse der Doppelmembran ist neben LLO vermutlich auch PlcB (s.u.) beteiligt (Vázquez-Boland *et al.*, 1992). Da die Listerien intrazellulär stets von mindestens einer Wirtszellmembran umgeben sind, entziehen sie sich auf diese Weise der humoralen Immunantwort. Nur eine zellvermittelte Immunantwort führt zu einer protektiven Immunität (Pamer, 1993; Kaufmann, 1993).

Das Virulenz-Gencluster von *L. monocytogenes* ist in Abbildung 1.1 dargestellt (Portnoy *et al.*, 1992). Das ca. 10 kb große Cluster besteht aus zwei Operons, dem *prfA-plcA*-Operon und dem Lecithinase-Operon sowie einem Einzelgen (*hly*). Die sechs von diesem Abschnitt kodierten Proteine sind für die Virulenz von *L. monocytogenes* unentbehrlich. Die Transkription der meisten bisher bekannten Virulenzgene ist vom positiven Regulationsfaktor PrfA abhängig, der vom Gen *prfA* kodiert wird (Leimeister-Wachter *et al.*, 1990; Bohne *et al.*, 1996; Lampidis *et al.*, 1994). Zur Aktivierung dieser Gene bindet PrfA an eine palindromische Konsensus-Sequenz (PrfA-Box), die sich nahe der -40 Position im Promotorbereich aller PrfA-abhängigen Gene befin-

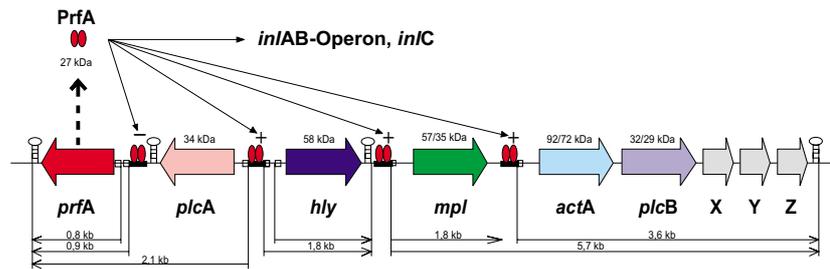


Abbildung 1.1:

Das Virulenz-Gencluster von *L. monocytogenes* (mit freundlicher Genehmigung von Dr. F. Engelbrecht)

det (Freitag *et al.*, 1993; Dickneite *et al.*, 1998). Die Expression von PrfA wird *in vivo* besonders intrazellulär induziert, kann aber auch durch Streß oder die Kultivierung in bestimmten Medien (z.B. MEM) verstärkt werden (Bohne *et al.*, 1996). Das vom *hly*-Gen kodierte Listeriolysin (LLO) ist für das Entkommen der Listerien aus dem Phagosom verantwortlich (Gaillard *et al.*, 1987; Portnoy *et al.*, 1988; Kuhn *et al.*, 1988). Da es neben den beiden PrfA-abhängigen Promotoren noch über einen PrfA-unabhängigen Promoter verfügt, findet eine LLO-Synthese in geringem Maße auch in Abwesenheit von PrfA statt (Domann *et al.*, 1993). Das stromaufwärts von *prfA* befindliche *plcA*-Gen kodiert für eine Phosphatidylinositol-spezifische Phospholipase C (PlcA = PI-PLC). Da in Makrophagen *plcA*-Mutanten wesentlich schlechter aus dem Phagosom ins Zytoplasma der Wirtszelle gelangen können, scheint PlcA einen Beitrag zur Lyse der Phagosom-Membran zu leisten (Camilli *et al.*, 1993). Stromabwärts von *hly* befindet sich das Lecithinase-Operon (Vázquez-Boland *et al.*, 1992). Es beinhaltet die Gene *mpl*, *actA*, *plcB* und drei weitere Leseraster (ORF X - ORF Z). Das Operon ist nach der Phosphatidylcholin-spezifischen Phospholipase C (PlcB) benannt, die auch als Lecithinase bezeichnet wird. PlcB wird in einer Proform sezerniert, die durch die Metalloprotease Mpl, dem Genprodukt von *mpl*, in die aktive Form überführt wird.

PlcB ist zusammen mit LLO an der Lyse der Doppelmembran beteiligt, von der die Listerien nach der Ausbreitung in die Nachbarzelle umgeben sind (Vázquez-Boland *et al.*, 1992; Gedde *et al.*, 2000). Das für die Polymerisation von Wirtszellaktin notwendige ActA wird vom *actA*-Gen kodiert. Mutanten, denen *actA* fehlt, sind unfähig, Aktin zu polymerisieren und verbleiben als Mikrokolonien im Zytoplasma der Wirtszelle, die sie ursprünglich infiziert haben. Im Tiermodell sind sie in ihrer Virulenz stark attenuiert (Domann *et al.*, 1992; Kocks *et al.*, 1992).

1.1.1 Internaline und andere Invasionsfaktoren

Internaline sind weitere Virulenzfaktoren von *L. monocytogenes*, die von außerhalb des Virulenz-Genclusters liegenden Genen kodiert werden. Internalin A (InlA) wird vom Gen *inlA* kodiert und für die Aufnahme in Epithelzellen benötigt. Es verleiht der sonst nicht-invasiven Art *L. innocua* die Fähigkeit, Caco-2-Zellen zu invadieren (Gaillard *et al.*, 1991). InlA gehört zur Superfamilie der leucinreichen Repeat-Proteine (LRR-Proteine) und ist ein Mitglied der Internalin-Multigenfamilie (Dramsai *et al.*, 1997; Raffelsbauer *et al.*, 1998). Das InlA-kodierende Gen *inlA* ist zusammen mit *inlB* im *inlAB*-Operon lokalisiert. InlA ist ein 800 Aminosäuren großes Protein mit einem für Internaline typischen modulartigen Aufbau (s. Abb. 1.2) (Dramsai *et al.*, 1993): Bei InlA schließt sich der N-terminalen

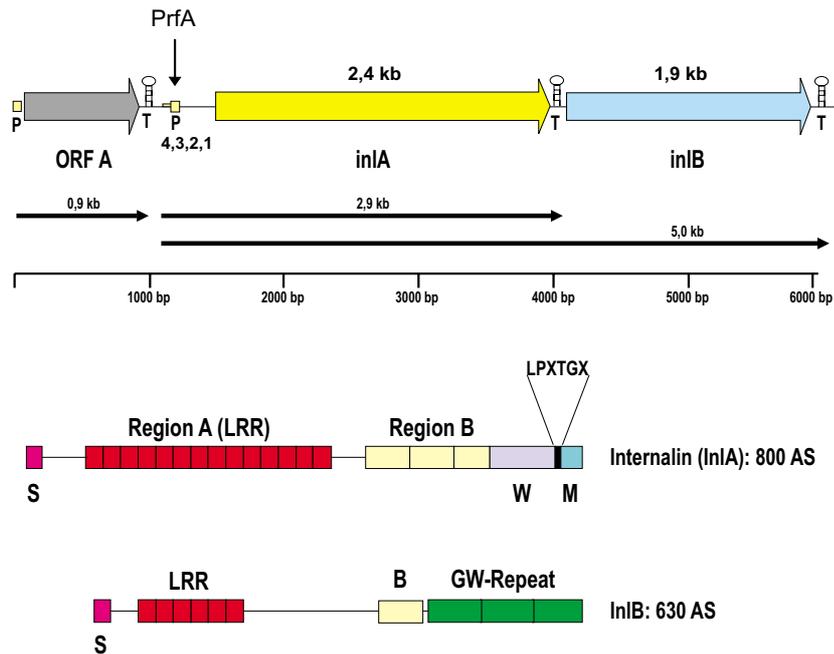


Abbildung 1.2:

Das *inlAB*-Operon von *L. monocytogenes* (oben). Domänenstruktur der Proteine InlA und InlB (unten). Die Region zwischen den beiden Repeat-Bereichen Region A und Region B wird als „Interrepeat-Domäne“ bezeichnet.

Signalsequenz die LRR-Domäne (Region A) mit 14 Wiederholungseinheiten an. Es folgt ein weiterer Bereich mit sich wiederholenden Sequenzmotiven (Region B). An Region B schließt sich am carboxyterminalen Ende des Proteins ein Zellwand-Anker-Motiv (LPXTGX) an. Es folgt noch ein membrandurchspannender Bereich und mehrere positiv geladene Reste, die als Stop-Transfer-Sequenz fungieren (Dramsi *et al.*, 1993; Gaillard *et al.*, 1991). Der C-Terminus von InlA ist vermutlich kovalent an Peptidoglykan der Zellwand gebunden (Lebrun *et al.*, 1996; Schneewind *et al.*, 1995). Der Rezeptor für InlA auf der Wirtszelle ist humanes E-Cadherin (Mengaud *et al.*, 1996b). Da Antikörper gegen die LRR-Domäne von InlA die InlA-abhängige Invasion blockieren, ist dieser Teil von InlA für die Invasion von besonderer Bedeutung (Mengaud *et al.*, 1996a). Über eine lange Zeit hinweg blieb der Grund dafür, daß InlA-Negativmutanten von *L. monocytogenes* im Mausmodell eine mit dem Wildtyp vergleichbare Virulenz aufweisen, ungeklärt (Dramsi *et al.*, 1995; Gregory *et al.*, 1996; Gaillard *et al.*, 1996). Nach neueren Erkenntnissen bindet InlA nur an humanes E-Cadherin, nicht aber an murines E-Cadherin. Die Interaktion zwischen InlA und humanem E-Cadherin ist derart wirtsspezifisch, daß der Austausch einer einzigen Aminosäure im humanen E-Cadherin die Wechselwirkung verhindert (Lecuit *et al.*, 1999).

InlB wird ebenfalls vom *inlAB*-Operon kodiert. Auch hierbei handelt es sich um einen wichtigen Invasionsfaktor. InlB ist an der Invasion von *L. monocytogenes* in Hepatozyten, Vero-Zellen, Fibroblasten, HeLa-Zellen, Epithelzellen und Endothelzellen beteiligt (Braun *et al.*, 1997; Gregory *et al.*, 1997; Greiffenberg *et al.*, 1998; Parida *et al.*, 1998; Braun *et al.*, 1999). Neben der für die Invasion wichtigen Zellwand-assoziierten Form sezerniert *L. monocytogenes* InlB auch ins Medium. Der Zellwand-Anker am C-Terminus besteht aus drei etwa 80 Aminosäuren langen „GW-Repeats“ (s. Abb. 1.2), die jeweils mit den Aminosäuren Glycin (G) und Tryptophan (W) beginnen. Die letzten 232 Aminosäuren von InlB binden an Lipoteichonsäure (LTA) auf der Bakterienober-

fläche (Jonquieres *et al.*, 1999). Wird InlB ins Medium gegeben, so kann es an die Zellwand von *L. monocytogenes* oder anderer Gram-positiver Bakterien binden. So gebundenes InlB verleiht einer $\Delta InlB$ -Mutante und sogar der nicht-invasiven Spezies *Staphylococcus carnosus* die Fähigkeit, Zellen zu invadieren (Braun *et al.*, 1997). Die Tatsache, daß Latex-Kügelchen, an denen InlB gebunden ist, in Vero-Zellen aufgenommen werden (Braun *et al.*, 1998), könnte so interpretiert werden, daß allein InlB für die Aufnahme von *L. monocytogenes* in Vero-Zellen ausreicht. Werden Vero-Zellen mit *L. monocytogenes* infiziert, löst dies eine rasche Erhöhung der intrazellulären Konzentration der Inositolphosphate PIP₂ und PIP₃ aus (Ireton *et al.*, 1996; Ireton und Cossart, 1997; Braun *et al.*, 1999). Wie mit Wortmannin, einem spezifischen PI 3-Kinase-Inhibitor, gezeigt werden konnte, ist dafür die Phosphoinositid-PI 3-Kinase p85 α -p110 verantwortlich (Ireton *et al.*, 1996). Da Wortmannin die Aufnahme von *L. monocytogenes* in Vero-Zellen hemmt, scheint die Aktivierung dieser PI 3-Kinase für den Invasionsprozeß notwendig zu sein. Dies steht im Einklang mit der Beobachtung, daß p85 α -p110 an der Regulation des Aktin-Zytoskeletts beteiligt ist (Carpenter und Cantley, 1996). Bei einer Infektion von Vero-Zellen mit *L. monocytogenes* ist für die Aktivierung der PI 3-Kinase das InlB-Protein verantwortlich (Ireton *et al.*, 1999). Wie sich zeigte, sind die ersten 213 Aminosäuren der LRR-Domäne von InlB für die Aufnahme von *L. monocytogenes* in Vero-Zellen, für die Aktivierung der PI 3-Kinase und für die damit verbundenen Veränderungen des Zytoskeletts erforderlich (Braun *et al.*, 1999).

Die Regulation der Expression des *inlAB*-Operons ist nicht strikt von PrfA abhängig (Dramsi *et al.*, 1993; Bohne *et al.*, 1996). Nur einer von insgesamt vier Promotoren vor *inlA* wird durch PrfA positiv reguliert (Bohne *et al.*, 1996). Zwei verschiedene Transkripte wurden nachgewiesen: Eine monocistronische *inlA*-mRNA (2,9 kb) und eine bicistronische *inlAB*-mRNA (5,0 kb). Im Gegensatz zur Transkription der Gene des *prfA*-Clusters wird die Transkription von *inlA* in MEM jedoch nicht induziert, sondern reprimiert (Bohne *et al.*, 1996). Promotor-Fusionen mit *gfp*, das für das grünfluoreszierende Protein (GFP) kodiert, zeigen, daß *inlA* intrazellulär nur wenig exprimiert wird (Bubert *et al.*, 1999). 51 bp stromaufwärts von *inlB* befindet sich ein in seiner Regulation noch unbekannter Promotor, der eine von *inlA* unabhängige Transkription von *inlB* zulassen könnte (Lingnau *et al.*, 1995).

Neben den bereits erwähnten Internalinen InlA und InlB wurden für *L. monocytogenes* noch die Internaline InlC, InlC2, InlD, InlE, InlF, InlG und InlH beschrieben (Engelbrecht *et al.*, 1996; Dramsi *et al.*, 1997; Raffelsbauer *et al.*, 1998). InlC ist im Gegensatz zu den anderen bekannten Internalinen, die alle eine Größe von 50-91 kDa aufweisen, nur 30 kDa groß. InlC nimmt eine Sonderstellung ein: Es verfügt im Gegensatz zu den übrigen bekannten Internalinen von *L. monocytogenes* über keinen Zellwand-Anker. InlC besitzt C-terminal weder ein LPXTGX-Motiv noch ein InlB-ähnliches GW-Motiv. InlC wird von *L. monocytogenes* ins umgebende Medium sezerniert und ist nicht mit der bakteriellen Oberfläche assoziiert (Engelbrecht *et al.*, 1996). Die Expression von *inlC* wird durch einen einzigen, streng PrfA-abhängigen Promotor reguliert (Engelbrecht *et al.*, 1996). Da das Expressionsmuster von *inlC* mit den ebenfalls PrfA-abhängigen und intrazellulär exprimierten Genen *hly* und *actA* überlappt, könnte InlC erst im späteren Infektionsverlauf intrazellulär eine Rolle spielen (Engelbrecht *et al.*, 1996). InlC scheint nicht an der Invasion von *L. monocytogenes* in Caco-2- und J774-Zellen beteiligt zu sein. Darüber hinaus vermehren sich Listerien, denen das Gen für InlC fehlt in diesen Zellen ebensogut wie der Wildtyp (Engelbrecht *et al.*, 1996). Im Mausmodell hingegen ist die 50 % lethale Dosis (LD₅₀) der $\Delta inlC$ -Mutante 50fach höher

als die des isogenen Wildtyps (Engelbrecht *et al.*, 1996). Die Transkription von *inlG*, *inlH* und *inlE*, die in einem Cluster angeordnet sind, wird nicht durch PrfA kontrolliert (Raffelsbauer *et al.*, 1998). Listerien, denen das *inlGHE*-Cluster fehlt, weisen in Mäusen eine verringerte Virulenz auf (Raffelsbauer *et al.*, 1998). Im Überstand von *L. ivanovii* konnten ebenfalls internalinähnliche Proteine nachgewiesen werden (Kreft *et al.*, 1989; Lingnau *et al.*, 1996; Engelbrecht *et al.*, 1998a). Bisher gehören zur Familie der sezernierten Internaline von *L. ivanovii* i-InlC, i-InlD, i-InlE und i-InlF (Engelbrecht *et al.*, 1998a). Diese als kleine Internaline bezeichneten Proteine zeigen auffallend hohe Sequenzhomologien untereinander und sind allesamt dem InlC-Protein von *L. monocytogenes* sehr ähnlich (Engelbrecht *et al.*, 1998a).

Ein weiteres, an der Invasion von *L. monocytogenes* in Eukaryontenzellen beteiligtes Protein ist das p60-Protein (Iap). Es wird von *L. monocytogenes* in großen Mengen ins Medium sezerniert, kommt aber auch oberflächenassoziiert vor (Ruhland *et al.*, 1993; Kuhn und Goebel, 1989). Die Expression des *iap*-Gens steht nicht unter der Kontrolle von PrfA, sondern wird posttranskriptionell reguliert (Kohler *et al.*, 1991). P60-Mutanten zeigen kettenförmiges Wachstum und sind avirulent. Das für Listerien essentielle p60-Protein hat Mureinhydrolase-Aktivität (Wuenscher *et al.*, 1993) und scheint an der Aufnahme von Listerien in Fibroblasten und Makrophagen beteiligt zu sein (Kuhn und Goebel, 1989; Hess *et al.*, 1995).

Neben der Aktinpolymerisation trägt ActA auch zur Zytoadhärenz von Listerien bei: ActA von *L. monocytogenes* bindet an Proteoglykane auf der Wirtszelloberfläche und verstärkt so die Adhäsion an IC-21-Mausmakrophagen und CHO-Zellen (Alvarez-Domínguez *et al.*, 1997).

Die Invasion von *L. monocytogenes* in nicht phagozytische Zelltypen läßt sich mit Inhibitoren der Protein-Kinase-C (PKC) hemmen. Hieraus folgt, daß PKC eine bedeutende Rolle bei der durch Listerien induzierten Invasion spielt (Tang *et al.*, 1994; Guzman *et al.*, 1995). Weiterhin aktiviert die Invasion von *L. monocytogenes* in HeLa-Zellen die MAP-Kinasen ERK-1, ERK-2, p38, JNK sowie die MAP-Kinase-Kinase MEK-1 (Tang *et al.*, 1998). Da die ERK-2-Aktivierung durch den PI 3-Kinase-Inhibitor Wortmannin nicht zu hemmen ist, scheint die Aktivierung von ERK-2 der PI 3-Kinase-Aktivierung nicht nachgeschaltet zu sein.

1.2 Blut-Hirn- und Blut-Liquor-Schranke

Die schematisierte Darstellung der Hirnhäute in Abbildung 1.3 A verdeutlicht die anatomischen Gegebenheiten im Säugerhirn. Man unterscheidet eine harte und eine weiche Hirnhaut. Die harte Hirnhaut (*dura mater*) kleidet das Schädeldach von innen aus. In ihr sind große venöse Gefäße eingebettet. Die weiche Hirnhaut besteht aus zwei lockermaschigen Bindegewebsblättern, der *arachnoidea mater* außen und der *pia mater* innen. Die *arachnoidea mater* folgt der *dura mater*, die *pia mater* schmiegt sich hingegen der Hirnoberfläche mit all ihren Furchen und Windungen an. *Arachnoidea mater* und *pia mater* sind über das Trabekelwerk miteinander verbunden; in ihrem Zwischenraum, dem Subarachnoidalraum, zirkuliert die Zerebrospinalflüssigkeit (Liquor). Die im Subarachnoidalraum laufenden Gefäße werden von der *pia mater* in die Virchow-Robin-Trichter begleitet. Ab dort werden die Gefäße von der *Pia-Glia*-Scheide umgeben. Der Liquor selbst wird hauptsächlich in den *plexus choroidei* der Seitenventrikel gebildet (s. Abb. 1.3 B). Dies geschieht nicht allein durch Filtration, sondern auch unter aktiver Beteiligung des Plexusepithels (kleine Pfeile). Da pro Tag ca. 650 ml Liquor produziert werden, das

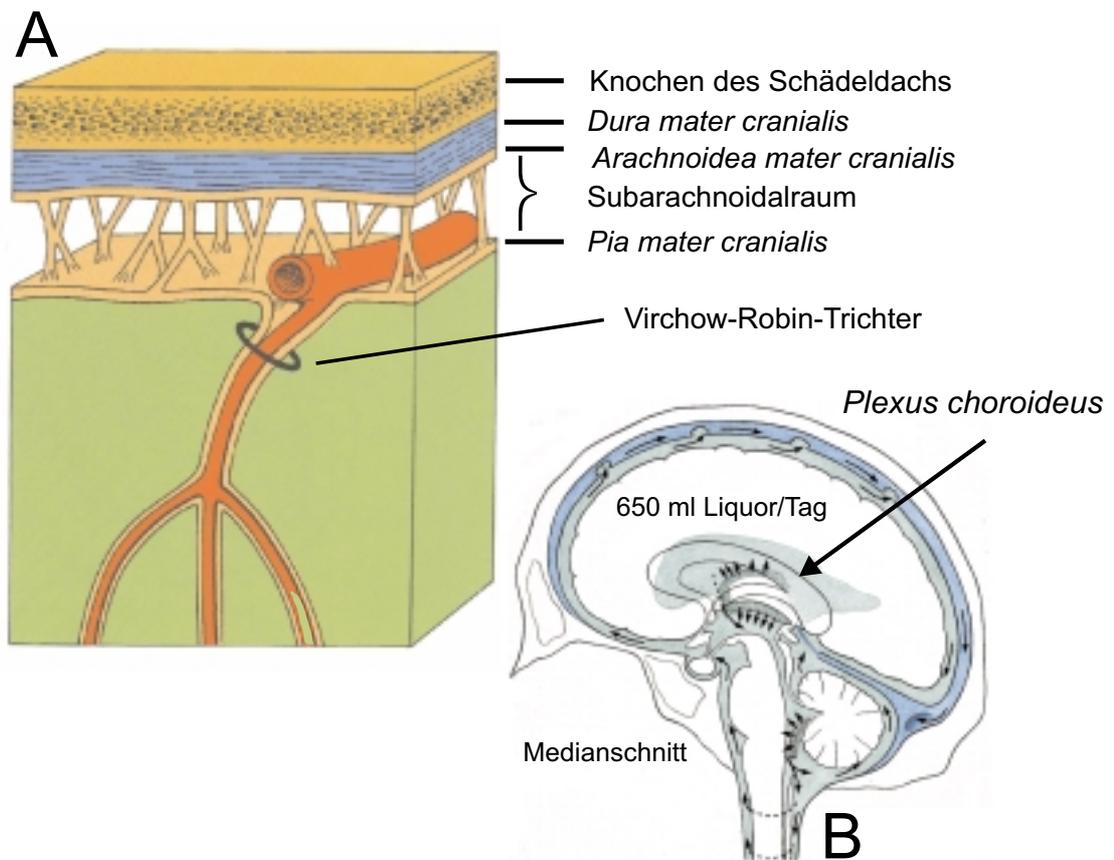


Abbildung 1.3:

Anatomischer Überblick über die Hirnhäute (A) und den Liquorfluß (B). Beschreibung siehe Text. Quellen: A = Schattauer, Grundlagen der klinischen Medizin Bd. 4, Nervensystem, Stuttgart/New York, S. 7. B = Sobotta-Atlas-Anatomie.

Liquorvolumen mit 150 ml aber konstant bleibt, müssen 500 ml pro Tag resorbiert werden. Der Liquorabfluß erfolgt primär über die Arachnoidalzotten, die sich aus der *arachnoidea mater* in die *dura mater* stülpen und Flüssigkeit in die dortigen venösen Gefäße abgeben, so daß der Liquor ins Venensystem drainieren kann.

Das Konzept für eine Barriere zwischen Blut und Gehirn ist sehr alt. Paul Ehrlich experimentierte schon 1885 mit Vitalfärbungen und stellte fest, daß intravenös injiziertes Anilin in der Lage ist, jedes Gewebe - mit Ausnahme des Gehirns - anzufärben. Ehrlich interpretierte das Ergebnis als Beweis dafür, daß das Gehirn eine geringere Affinität zum Farbstoff hat als der Rest des Körpers. Edwin E. Goldmann injizierte den Farbstoff Trypanblau direkt in den Liquor von Hunden mit dem Ergebnis, daß sich die Färbung diesmal auf das Gehirn beschränkte. Der Farbstoff konnte nicht ins Blut gelangen (Goldmann, 1913). Lewandowsky, der die Aufnahme von Kaliumeisenzyanid ins Gehirn untersuchte, prägte den Begriff „Blut-Hirn-Schranke“ (Lewandowsky, 1900).

Neben der Blut-Hirn-Schranke („blood brain barrier“ = BBB), die eine Barriere zwischen Blut und Hirngewebe konstituiert, existieren im Gehirn noch zwei weitere Barrieren, die den Stofftransport aus dem Blut ins Gehirn erschweren (Saunders *et al.*, 1999; Nabeshima *et al.*, 1975). Diese werden als Blut-Liquor-Schranken bezeichnet. Die bekanntere der beiden befindet sich am Ort der Liquorproduktion, dem *choroid plexus*. Die

Gefäße, die sich zwischen den weichen Hirnhäuten im Liquor befinden, sowie die Gewebe der weichen Hirnhäute selbst stellen eine eher unbekannte Blut-Liquor-Schranke dar (Nabeshima *et al.*, 1975).

All diese Barrieren haben eines gemeinsam: Ihre geringe Durchlässigkeit basiert auf besonders festen, undurchlässigen und Ca^{2+} -abhängigen Zell-Zell-Verbindungen, den Tight Junctions (*zonula occludens*). Die Zwischenräume der so miteinander verbundenen Zellen sind kleiner als ein Nanometer. Tight Junctions sind die dichtesten apikalen Zell-Zell-Verbindungen von Epithel- und Endothelzellen. Durch ihren molekularen Aufbau und ihre netzartige Struktur bilden sie eine semipermeable Barriere zwischen den Zellen. Dadurch verhindern sie zugleich die Diffusion von Membranproteinen zwischen der apikalen und basolateralen Zellmembran.

Die an der Ausbildung von Tight Junctions beteiligten Proteine lassen sich in zwei Typen unterteilen: In transmembrane und zytoplasmatische Proteine. Die bisher bekannten Transmembranproteine Occludin, Claudin-1 und Claudin-2 und das „junction adhesion molecule“ (JAM) scheinen mit ihren extrazellulären Domänen die Zell-Zell-Verbindung zu ermöglichen (Fanning *et al.*, 1999). Dem Zell-Adhäsionsmolekül Occludin wird dabei die wichtigste Rolle zugesprochen. Das erst kürzlich beschriebene JAM gehört der Immunglobulin-Superfamilie an und ist vermutlich bei der parazellulären Transmigration von Monozyten durch Endothelzell-Monolayer von Bedeutung (Martin-Padura *et al.*, 1998). Nach einem Modell von Balda und Matter, 1998, nähern sich die Zellmembranen benachbarter Zellen zur Bildung von Tight Junctions einander an und fusionieren dabei zum Teil an den Kontaktstellen. Die oben beschriebenen Transmembranproteine übernehmen hierbei allem Anschein nach die Aufgabe, energetisch instabile Lipid-Strukturen zu stabilisieren. Ein weiteres Transmembranprotein, Neurothelin, kommt dagegen nur in Tight Junctions des ZNS vor (Schlosshauer und Herzog, 1990). Auf zytoplasmatischer Seite binden die sogenannten Plaque-Proteine ZO-1, ZO-2 und ZO-3 an den C-Terminus von Occludin. ZO-Proteine gehören zur Familie der membranassoziierten Guanylat-Kinasen (MAGUK), die an Signaltransduktionswegen beteiligt sind und das Zellwachstum sowie die Zelldifferenzierung beeinflussen (Fanning *et al.*, 1998). Da *in vitro* eine Bindung von ZO-1 an F-Aktin nachgewiesen werden konnte, scheinen Tight Junctions und Zytoskelett miteinander verbunden zu sein (Itoh *et al.*, 1997). Weitere Proteinkomponenten von mit Tight Junctions assoziierten zytosolischen Plaques sind Cingulin, 7H6, AF-6 und Symplekin.

In den späten sechziger Jahren bezog man die Elektronenmikroskopie in die Untersuchungen der BBB mit ein und konnte zeigen, daß für die Ausbildung der BBB die kapillaren Gefäße des Gehirns verantwortlich sind (s. Abb. 1.4). Alle Vertebraten verfügen über eine BBB. Beim menschlichen Fötus wird sie in den ersten drei Entwicklungsmonaten angelegt. Der Transport von Stoffen aus dem Blut ins Hirngewebe gestaltet sich außerordentlich schwierig: Tight Junctions machen einen parazellulären Transport durch die BBB unmöglich. Um ins Hirngewebe zu gelangen, bleibt nur der Weg durch die endothelialen Membranen übrig. Die Diffusion durch diese Membranen ist auf kleine, lipophile Moleküle mit einem Molekulargewicht von bis zu 700 Da beschränkt (Pardridge, 1993). Da mikrovaskuläres Hirnendothel pinozytotisch nahezu inaktiv ist und auch Transzytose hierbei keine Rolle spielt (Goldstein und Betz, 1983), werden viele ins Hirngewebe transportierte Substanzen von den Endothelzellen Rezeptor-vermittelt aufgenommen. Insulin und Transferrin etwa gelangen auf diesem Weg aus dem Blut ins Gehirn (Pardridge, 1993).

Die Epithelzellen im *choroid plexus* übernehmen eine ähnliche Funktion wie die mikrovaskulären Hirnendothelzellen (Tuomanen, 1996). Das sekretorisch extrem aktive Ple-

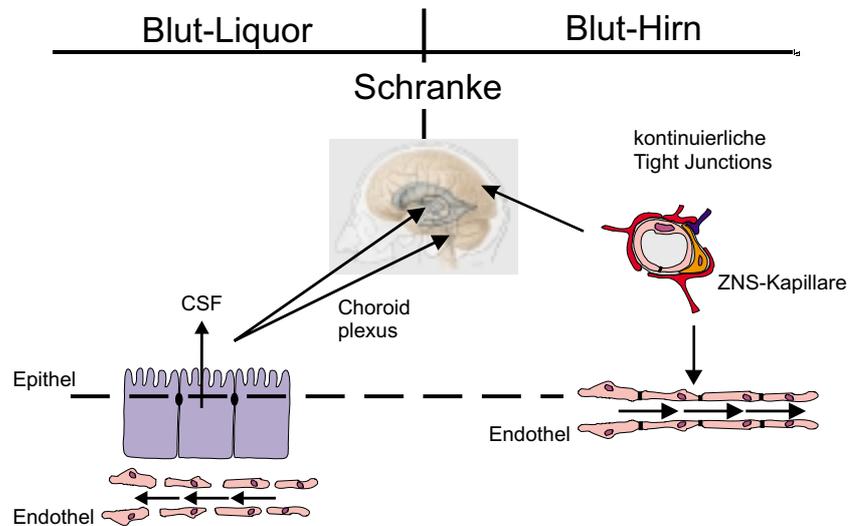


Abbildung 1.4:

Schematische Darstellung der Blut-Liquor- und Blut-Hirn-Schranke. Links: Die Blut-Liquor-Schranke wird von speziellen Epithelzellen gebildet, die über Tight Junctions miteinander verbunden sind. Dieses Plexusepithel, welches für die Liquorproduktion zuständig ist, ist von Endothel ohne Tight Junctions unterlagert. Rechts: Die Blut-Hirn-Schranke wird von mikrovaskulären Hirnendothelzellen, die über Tight Junctions miteinander verbunden sind ausgebildet.

xusepithel bildet - ebenfalls über Tight Junctions - einen dichten Zellverband aus, die Blut-Liquor-Schranke (s. Abb. 1.4). Dagegen weisen die Endothelzellen, die die Gefäße unterhalb des Plexusepithels ausbilden, keine Tight Junctions auf und spielen daher bei der Abschirmung des Gehirns keine Rolle (Tuomanen, 1996). Die beiden Zellschichten sind durch einen Interzellularspalt und eine Basalmembran voneinander getrennt. Mitunter zwischen ihnen vorkommende Fibrozyten liegen den Epithelzellen basal an.

Die im Subarachnoidalraum liegenden Gefäße haben ebenfalls direkten Kontakt zum Liquor (s. Abb. 1.3). Definitionsgemäß handelt es sich auch bei dieser Barriere um eine Blut-Liquor-Schranke. In diesem speziellen Fall sind für die Ausbildung der Blut-Liquor-Schranke jedoch keine Epithelzellen, sondern mit Tight Junctions verbundene Endothelzellen der Gefäße verantwortlich (Nabeshima *et al.*, 1975).

1.3 Infektionen des Gehirns

Die Krankheitsbezeichnungen beziehen sich stets auf den Ort im Gehirn, an dem sich eine Infektion etablieren kann und entzündliche Reaktionen auftreten: Entzündungen der Hirnhäute werden als Meningitis bezeichnet. Ist das eigentliche Hirngewebe infiziert, spricht man von einer Encephalitis. Ist die Infektion auf den Bereich beschränkt, der für die Liquorproduktion verantwortlich ist (Ventrikel), spricht man von Ventrikulitis. Da sich im weiteren Verlauf einer Infektion die Erreger ausbreiten können, sind Kombinationen der verschiedenen Erscheinungsformen wie etwa Meningoencephalitis gleichermaßen möglich wie häufig. Obwohl das Gehirn durch seine Barrieren (s. 1.2) vor Infektionen gut geschützt ist, sind trotzdem einige Mikroorganismen in der Lage, in das Gehirn zu gelangen, wobei hier Bakterien und Viren vorherrschen. Eher selten treten Pilze, z.B. *Cryptococcus*, als Erreger auf (Asawavichienjinda *et al.*, 1999). Virale Meningitiserkrankungen sind häufiger als bakterielle. Der klinische Verlauf einer viralen Meningitis ist

aber im allgemeinen „harmloser“. In der Regel verschwinden die Symptome nach etwa 10 Tagen; medikamentöse Hilfe ist selten erforderlich (Whitley, 1990). Die meisten Fälle von Encephalitis sind ebenfalls auf Viren zurückzuführen.

Die bakterielle Meningitis ist die schlimmste und häufigste Form einer Infektion des zentralen Nervensystems. Eine Infektion des Subarachnoidalraumes und der Hirnhäute geht einher mit Symptomen wie Fieber, Kopfschmerzen, Lichtempfindlichkeit und Nackensteife. In den Vereinigten Staaten erkranken jährlich ca. 10 000 Menschen an einer bakteriellen Meningitis. In Ländern mit einer schlechteren Gesundheitsversorgung ist die Zahl wesentlich höher (Schuchat *et al.*, 1997). Selbst nach einer Behandlung mit sehr effektiven Antibiotika erliegen zwischen 5 und 40 % der Patienten der Erkrankung. Von den Überlebenden klagen noch bis zu 30 % über neurologische Folgeschäden (Baraff *et al.*, 1993; Leib und Tauber, 1999).

Die nun folgenden Erläuterungen zum Infektionsverlauf einer bakteriellen Meningitis wurden dem Übersichtsartikel Leib und Tauber, 1999, entnommen. Eine bakterielle Meningitis vollzieht sich demnach in folgenden Schritten. (1) Die Bakterien gelangen zunächst in den Liquorraum des Gehirns. (2) Ausgelöst durch eine starke Vermehrung der Bakterien im Liquor kommt es zu einer Entzündungsreaktion im Subarachnoidalraum und den Ventrikeln. (3) Die Entzündung schreitet voran und schließt jetzt auch pathophysiologische Veränderungen, wie z.B. die Ausbildung eines Hydrozephalus, mit ein. (4) Es kommt zu neuronalen und nicht selten irreversiblen Schäden.

Die wichtigsten Erreger einer bakteriellen Meningitis sind *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis* (Meningococcus) und *Streptococcus pneumoniae*. Die meisten Meningitiserreger werden von Mensch zu Mensch durch Tröpfcheninfektion über den Respirationstrakt übertragen. Spezielle bakterielle Oberflächenkomponenten wie Polysaccharid-Kapseln, Fimbrien, Pili oder auch die Produktion von bakteriellen Enzymen wie z.B. Proteasen tragen zur erfolgreichen Besiedlung des Wirtes bei. Ist, wie bei *Neisseria meningitidis* der Respirationstrakt die Eintrittspforte, müssen die Bakterien zuerst an die dortigen Schleimhäute adhären. Oberflächen von unbewimpertem Epithel bieten dabei offenbar ideale Voraussetzungen für eine Anheftung. Der Zustand der Schleimhäute im Respirationstrakt spielt somit für den Eintritt der Erreger ins Gehirn eine wichtige Rolle. Infolge einer viralen Infektion nimmt die Anzahl der bewimperten Zellen ab, was die Wahrscheinlichkeit einer Invasion von Bakterien deutlich erhöht. Sekretorisches IgA1 im Mucus verhindert die mikrobielle Adhäsion und Invasion und ist daher ein entscheidender Abwehrmechanismus des Wirtes. Im Gegenzug sezernieren viele Meningitiserreger, z.B. *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* und *Streptococcus pneumoniae* (Wani *et al.*, 1996) hochspezifische Metalloproteasen, die IgA1 spalten können. Die Antikörper werden in ihre Antigen-bindenden Fab-Fragmente und in ihre Fc-Fragmente gespalten. Die nun an die Bakterien bindenden, aber immunologisch inaktiven Fab-Fragmente schützen die Erreger vor der humoralen Immunabwehr des Wirtes im Mucus der Mucosa. Einige Viren und Bakterien gelangen über M-Zellen in den Wirt. *L. monocytogenes* nutzt diesen Weg vermutlich auch, um die epitheliale Barriere des Darms zu überwinden (Racz *et al.*, 1972).

Ob die Bakterien im weiteren Verlauf der Infektion den direkten Weg ins vaskuläre System (Blutgefäße) einschlagen oder phagozytiert in Immunzellen weiter im Körper verteilt werden, ist abhängig vom Erreger. Dem Wirt stehen unspezifische und spezifische Abwehrmaßnahmen zur Verfügung, um die eingedrungenen Mikroorganismen zu eliminieren. Zu den unspezifischen Maßnahmen zählt die Aktivierung des alternativen Weges der Komplementkaskade sowie die Aufnahme der Bakterien durch Phagozyten. Die antikörpervermittelte humorale Immunantwort, der klassische Weg der Komplementkaskade

sowie die zellvermittelte Immunität sind spezifische Abwehrmaßnahmen.

Mit Ausnahme der Leptomeningitis, bei der eine Infektion der *dura mater* von außen durch eine Schädelfraktur ermöglicht wird, müssen im Blut befindliche Bakterien in den Liquor gelangen, um eine bakterielle Meningitis hervorrufen zu können. Hierzu ist erforderlich, daß die Bakterien die zelluläre Barriere der Blut-Liquor-Schranke durchbrechen. Für den Infektionsweg der Bakterien durch eine Blut-Liquor-Schranke werden bei [Tuomanen, 1996](#), folgende Möglichkeiten erörtert:

(1) Parazellulärer Durchtritt der Bakterien: Die Bakterien könnten die Zell-Zell-Verbindungen aktiv lösen oder bereits bestehende Lücken in zerstörten Regionen zum Durchtritt nutzen. Hohe Konzentrationen von IL-1 α und IL-1 β , die als Folge einer Sepsis im Blut erreicht werden können, führen zu einer gesteigerten Permeabilität der BBB. Zellen der Barriere, deren Zell-Zell-Verbindungen auf diese Weise durchlässig werden, könnten bevorzugte Eintrittsorte für Bakterien darstellen. (2) Das Bakterium könnte von einer Zelle aufgenommen und in einem Endosom transzellulär durch die Zelle transportiert werden. Bei einem solchen, auch als Transzytose bezeichneten Vorgang ist es denkbar, daß das Bakterium an der basalen Zellmembran in die Zelle eintritt und die Zelle auf der apikalen Seite wieder verläßt. Übertragen auf das Plexusepithel würde dies bedeuten, daß das Bakterium von der infizierten Zelle in den Liquor entlassen würde. (3) In Zellen aufgenommene Bakterien könnten sich intrazellulär stark vermehren und eine Lyse der infizierten Zellen hervorrufen. Auf diese Weise entstünden Lücken, die andere Bakterien zum Durchtritt nutzen könnten. (4) Da Leukozyten in einem als Diapedese bezeichneten Vorgang Kapillarwände durchwandern können, ist es denkbar, daß Bakterien in oder zusammen mit Leukozyten diese Barriere überwinden. Beim letzten Punkt ist die Adhäsion von Leukozyten an Endothelzellen von großer Bedeutung.

Bei einigen Erregern hat man eine Vorstellung davon, wie sie zelluläre Barrieren überwinden ([Tuomanen, 1996](#)): *Borrelia burgdorferi* und *Treponema pallidum* durchbrechen die Endothelzellbarriere der BBB vermutlich parazellulär. *Hemophilus influenzae* ist *in vitro* in der Lage, Epithelzellbarrieren parazellulär und transzellulär zu durchqueren. Es ist sehr wahrscheinlich, daß auf die eine oder andere Weise auch die Epithelzellbarriere des *choroid plexus* durchbrochen werden kann und die Bakterien so in den Liquor gelangen. Eine andere Strategie verfolgt *Streptococcus suis*. Dieser Erreger nutzt das Prinzip des „Trojanischen Pferdes“: Die Bakterien befinden sich in Leukozyten und nutzen deren Fähigkeit, zelluläre Barrieren zu überwinden, um den Liquorraum zu erreichen ([Williams und Blakemore, 1990](#)). Gruppe B-Streptokokken, die häufig Meningitis bei Neugeborenen auslösen, können HBMEC-Monolayer *in vitro* durch Transzytose durchqueren ([Nizet et al., 1997](#)). Da sie außerdem in Makrophagen überleben können ([Cornacchione et al., 1998](#)), ist es denkbar, daß sie wie *Streptococcus suis* Immunzellen nutzen, um Hirnbarrieren zu überwinden. *Neisseria meningitidis* scheint sowohl Epithel- als auch Endothelzellbarrieren transzytotisch zu durchqueren.

Im weiteren Verlauf einer bakteriellen Meningitis wandern neutrophile Granulozyten aus dem Blutstrom in den Liquor ein ([Sprenger et al., 1996](#)). Die Immunzellen penetrieren die mikrovaskuläre Endothelzellbarriere und können sich im Liquor ansammeln, wo sie typischerweise eine Leukozytose auslösen ([Korthuis et al., 1994](#), [Tunkel und Scheld, 1993](#)). Die nun folgende Beschreibung der Wechselwirkungen zwischen Leukozyten und Endothelzellen orientiert sich an den Übersichtsartikeln von [Leib und Tauber, 1999](#), und [Parent und Eichacker, 1999](#).

Die Einwanderung von Leukozyten in Gewebe wird durch die Adhärenz der Immunzellen an die Blutgefäßwand eingeleitet. Zelladhäsionsmoleküle auf Leukozyten und Endo-

thelzellen vermitteln und kontrollieren dabei die Adhäsion, die in einer Kaskade von molekularen Interaktionen abläuft. Zunächst vermitteln Selektine, eine Familie von lektinartigen Adhäsionsmolekülen, das Andocken und „Rollen“ der Leukozyten auf der Endotheloberfläche. Von den drei bekannten Selektinen ist L-Selektin auf den meisten Leukozyten zu finden, während E-Selektin ausschließlich von Endothelzellen exprimiert wird und P-Selektin auf Endothelzellen und auf Thrombozyten zu finden ist. P- und E-Selektin werden als Antwort auf eine Stimulation mit IL-1 β oder TNF- α vermehrt auf vaskulärem Endothel exprimiert. P-Selektin wird im Zytoplasma der Endothelzellen in granulären Speicherkompartimenten, den Weibel-Palade-Körpern, gespeichert (Wagner, 1993) und kann so sehr schnell freigesetzt werden. Die induzierte Expression von E-Selektin hingegen dauert Stunden (Bevilacqua *et al.*, 1989). Dies ist vermutlich der Grund dafür, daß in der frühen Phase einer Infektion Leukozyten mit ihrem L-Selektin an P-Selektin und nicht an E-Selektin auf den Endothelzellen binden. Infolge der Bindung kommt es zu einer Verlangsamung der Leukozyten, wodurch der Kontakt mit Signalstoffen auf der Endothelzelloberfläche, wie z.B. dem Chemokin IL-8 oder dem ebenfalls von Endothelzellen sezernierten Plasminogen-Aktivator (PAF) (Stanimirovic und Satoh, 2000), ermöglicht wird. Als Reaktion auf eine IL-8- und PAF-Stimulation werden β_2 -Integrine auf der Leukozytenoberfläche zur Bindung an ihre Liganden auf den Endothelzellen aktiviert (Huber *et al.*, 1991; Rainger *et al.*, 1997).

Alle Mitglieder der Integrin-Superfamilie sind transmembrane Heterodimere, die aus konservierten β -Einheiten und sehr variablen α -Untereinheiten bestehen. Die bislang bekannten 20 Integrine setzen sich aus 8 verschiedenen β -Untereinheiten (β_1 - β_8) und 14 verschiedenen α -Untereinheiten zusammen (Wang und Springer, 1998). An der Diapedese von Leukozyten sind maßgeblich nur β_1 - und β_2 -Integrine beteiligt. Von den drei bekannten β_2 -Integrinen LFA-1, Mac-1 und p150,95 spielt LFA-1 die wichtigste Rolle bei der Diapedese von neutrophilen Granulozyten (Wawryk *et al.*, 1989). Im Fall von LFA-1 erhöht sich durch eine Phosphorylierung der zytoplasmatischen Domäne die Affinität dieses Integrins zu seinen Liganden ICAM-1 und ICAM-2 auf Endothelzellen (Figdor *et al.*, 1990). Neben ICAM-1 und ICAM-2 kann auch das von Endothelzellen exprimierte VCAM-1 an Integrine auf Leukozyten binden. Alle CAM-Zelladhäsionsmoleküle sind Mitglieder der Immunglobulin-Superfamilie. Im Gegensatz zu ICAM-1 und ICAM-2, die an β_2 -Integrine auf Leukozyten binden, ist der wichtigste Co-Rezeptor für VCAM-1 das β_1 -Integrin VLA-4. VLA-4 wird von neutrophilen Granulozyten nicht exprimiert (Bochner *et al.*, 1991). Da für die Entstehung einer bakteriell verursachten Leukozytose im Liquorraum aber gerade Neutrophile verantwortlich sind (Leib und Tauber, 1999; Sprenger *et al.*, 1996), ist hierbei die Interaktion von VLA-4 mit VCAM-1 ohne Bewandtnis.

Ein ebenfalls für die transendotheliale Migration von Leukozyten wichtiges Zelladhäsionsmolekül ist PECAM-1 (Wakelin *et al.*, 1996). Es wird auf Leukozyten und Endothelzellen exprimiert. Anders als bei den übrigen Zelladhäsionsmolekülen, die bei der Bindung Heterodimere ausbilden, bindet PECAM-1 auf Endothelzellen an PECAM-1 auf Leukozyten (Tanaka *et al.*, 1992). PECAM-1 wird auf Endothelzellen vermehrt an den Kontaktstellen zu benachbarten Endothelzellen exprimiert (Müller *et al.*, 1989). Die über PECAM-1 vermittelte homophile Bindung der Leukozyten an diesen Kontaktstellen könnte die Transmigration zwischen den Endothelzellen einleiten (Bevilacqua, 1993).

Bei einer Transmigration lösen sich die Zell-Zell-Verbindungen der Endothelzellen. In die so entstehenden Lücken schieben sich pseudopodienähnliche Ausstülpungen der Leukozyten. Die endothelialen Zell-Zell-Verbindungen schließen sich umgehend, nachdem sie von den Immunzellen passiert wurden. Auf welche Weise die Leukozyten die Basalmem-

bran überwinden, um in tieferes Gewebe vorzudringen, ist noch weitgehend ungeklärt. Matrix-Metalloproteasen (MMPs), die von durch TNF- α stimulierten Leukozyten sezerniert werden, könnten bei der Überwindung der Basalmembran eine Schlüsselrolle spielen. MMPs gehören zur Familie der zinkabhängigen Endopeptidasen. MMPs können Kollagen Typ IV und Typ V abbauen, die Hauptbestandteile der subendothelialen Basalmembran, die zur Bildung der BBB beiträgt.

Die Transmigration von Leukozyten induziert in Endothelzellen eine Freisetzung von IL-8 (Smith, 1993). Dieses ursprünglich als Leukozyten-Adhäsions-Inhibitor bezeichnete Interleukin (Gimbrone *et al.*, 1989) induziert das „Abwerfen“ von auf Neutrophilen exprimiertem L-Selektin. Sodann kommt es nach einem Kontakt von Neutrophilen mit IL-8 zur verstärkten Expression von β_2 -Integrinen (Huber *et al.*, 1991). Welcher Stellenwert dem durch IL-8 verursachten Verlust von L-Selektin auf Neutrophilen bei der Transmigration zukommt, wird in der Literatur kontrovers diskutiert: Während, wie bei Smith, 1993, beschrieben, das Abwerfen von L-Selektin von Neutrophilen einen notwendigen Schritt für die transendotheliale Migration darstellt, konnte eine solche Abhängigkeit von Allport *et al.*, 1997, nicht bestätigt werden. T-Zellen werden durch IL-8 nicht zur Adhäsion an oder Transmigration durch mikrovaskuläres Endothel angeregt (Cai *et al.*, 1996). Wie oben bereits erläutert, spielt auf Endothelzellen exprimiertes VCAM-1 bei der transendothelialen Migration von neutrophilen Granulozyten keine Rolle. Die Expression von VCAM-1 auf Endothelzellen wird von IL-1, TNF- α , IL-4 und IL-13 induziert (Swerlick *et al.*, 1992; Sironi *et al.*, 1994). Aber auch auf nicht stimulierten Endothelzellen läßt sich VCAM-1 nachweisen (Swerlick *et al.*, 1992). Im Gegensatz zu neutrophilen Granulozyten, die an endotheliales ICAM-1 binden, exprimieren Monozyten VLA-4 und können so an VCAM-1 auf Endothelzellen binden (Weber und Springer, 1998). Eine zentrale Bedeutung kommt der transendothelialen Migration von Monozyten bei Infektionen zu, die allergische Reaktionen auslösen können. Das im Verlauf einer allergischen Immunreaktion von Mastzellen sezernierte IL-4 (Bradding *et al.*, 1992) induziert auf Endothelzellen die Expression von VCAM-1, nicht aber von ICAM-1 oder E-Selektin (Schleimer *et al.*, 1992). Neutrophile Granulozyten binden nicht an VCAM-1 und sind daher an einer IL-4-induzierten Leukozyten-Endothelzell-Interaktion nicht beteiligt.

1.3.1 Meningitis und Zytokine

Hat der Meningitiserreger Zugang zur Zerebrospinalflüssigkeit gefunden, kann er sich nahezu ungehindert darin vermehren (Leib und Tauber, 1999). *Streptococcus pneumoniae* kann *in vitro* in Kaninchenliquor Bakterientiter von bis zu 10^9 cfu/ml erreichen (Small *et al.*, 1986). Im Liquor befinden sich kaum Komplementfaktoren, Leukozyten oder Immunglobuline (Fiessinger *et al.*, 1973). Da der Liquor das Gehirn umspült, können sich die Erreger über das gesamte Gehirn, Rückenmark und über die Virchow-Robin-Trichter in tiefere Regionen ausbreiten (Wehn *et al.*, 1989). Da es im Liquor auch ohne antimikrobielle Substanzen wie Antibiotika oder Komplementfaktoren zur spontanen Lyse von Bakterien kommt, werden hochimmunogene Zellwandbestandteile der Bakterien im Liquor frei (Bratlid und Bovre, 1977). Bei Gram-negativen Bakterien ist dies in erster Linie LPS (Burroughs *et al.*, 1992), bei Gram-positiven Bakterien LTA (Bhakdi *et al.*, 1991). Als Antwort auf diese Stimuli kommt es zu einer explosionsartigen Freisetzung von Zytokinen. Bei einer bakteriellen Meningitis sind für die Zytokinproduktion im wesentlichen residente Makrophagen der Hirnhaut, Gliazellen, das Ependym, rekrutierte Immunzellen und mikrovaskuläre Hirnendothelzellen (BMEC) verantwortlich

(Leib und Tauber, 1999). Während einer bakteriellen Meningitis sind die Konzentrationen der proinflammatorischen Zytokine TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8 sowie von IL-10 im Liquor deutlich erhöht. Antibiotika erhöhen die Anzahl lysierter Bakterien und führen damit zu einer extremen und nicht selten fatal endenden Steigerung der TNF- α -Freisetzung (Mustafa *et al.*, 1990; Tauber und Sande, 1990). Werden gleichzeitig Immunsuppressiva wie z.B. Glukokortikoide verabreicht, ist es möglich, die Kettenreaktion abzufangen (Coyle, 1999). IL-10 ist ein antiinflammatorisches Zytokin. Es hemmt die Freisetzung von TNF- α , IL-1, IL-6 und IL-8 *in vitro* und verringert die Gefahr einer Ödembildung im Gehirn (Koedel *et al.*, 1996). TNF- α ist ein Glykoprotein und wird von Lymphozyten, Makrophagen (Kuhn und Goebel, 1997), Natürlichen Killerzellen (NK), Astrozyten und Gliazellen freigesetzt (Leib und Tauber, 1999). IL-1 und TNF- α sind die Hauptauslöser der Entzündungsreaktion infolge einer bakteriellen Meningitis (Frei *et al.*, 1993). IL-1 im Liquor wird von Monozyten, Gliazellen und Endothelzellen sezerniert. Im Rattenmodell zeigt sich eine deutliche Induktion der IL-1-Expression schon 30 Minuten nachdem *H. influenzae*-LPS direkt in den Liquor injiziert wurde (Quagliarello *et al.*, 1991). Daran ist erkennbar, daß für die Ausbildung typischer Meningitissymptome LPS im Liquor völlig ausreicht. IL-6 im Liquor stammt von Monozyten, Endothelzellen und Astrozyten als Antwort auf IL-1. Es löst eine Leukozytose aus und aktiviert die Komplement- und Blutgerinnungskaskade (Hirano *et al.*, 1990). IL-6 hemmt *in vitro* die Freisetzung von IL-1 und induziert die Expression des IL-1-Rezeptor-Antagonisten (Cohen und Cohen, 1996).

Wie bereits beschrieben, spielt das Chemokin IL-8 eine Schlüsselrolle bei der transendothelialen Migration von neutrophilen Granulozyten in den Liquorraum. Im Gehirn wird IL-8 von Monozyten, polymorphkernigen Leukozyten, Endothelzellen, Astrozyten und Neuronen als Antwort auf eine Stimulation mit IL-1, TNF- α oder LPS sezerniert (Leib und Tauber, 1999; Sprenger *et al.*, 1996). IL-8 ist ein Chemoattraktant für neutrophile Granulozyten (Leonard und Yoshimura, 1990). Es „lockt“ im Blut flottierende, neutrophile Granulozyten zum dem Ort, an dem es vermehrt sezerniert wird. Ein mit der Wirkung von IL-8 auf neutrophilen Granulozyten vergleichbares Chemokin für Monozyten und T-Zellen ist das Monozyten-Chemoattraktant-Protein-1 (MCP-1) (Leonard und Yoshimura, 1990; Taub *et al.*, 1995). Sezerniertes MCP-1 im Liquor wird auf Monozyten, Endothelzellen, Fibroblasten und Astrozyten zurückgeführt (Sprenger *et al.*, 1996).

1.3.2 *L. monocytogenes* verursacht Erkrankungen des Zentralen Nervensystems

Schon wenige Jahre nach der Erstbeschreibung (Nyfedt, 1929) einer durch *L. monocytogenes* hervorgerufenen Erkrankung des Zentralen Nervensystems (ZNS) wurde deutlich, daß *L. monocytogenes* eine generelle Tendenz aufweist, Infektionen des Gehirns auszulösen (Burn, 1934). Im Jahr 1986 erkrankten in den Vereinigten Staaten etwa 1700 Menschen an einer von *L. monocytogenes* verursachten Infektion des ZNS - in 450 Fällen endete die Listeriose tödlich (Gellin *et al.*, 1991). Der Anteil der bakteriell verursachten ZNS-Erkrankungen, der auf *L. monocytogenes* zurückzuführen ist, nimmt in den letzten Jahren stark zu. In den U.S.A. kam es im Zeitraum von 1986 bis 1995 zu einer Steigerung von 3,3 auf 8 % (bei etwa 0,2 Fällen pro 100 000 Menschen) (Mylonakis *et al.*, 1998). In Europa oder Nordamerika wird der Prozentsatz mit 5 bis 10 % angegeben (Pfadenhauer und Rossmanith, 1995). Damit stellt *L. monocytogenes* gegenwärtig einen der wichtigsten Meningitiserreger bei erwachsenen Menschen dar. Als

Ursache hierfür werden erfolgreiche Impfstrategien gegen andere Meningitiserreger wie z.B. *Haemophilus influenzae* angesehen. Menschen mit einem geschwächten Immunsystem wie Diabetiker, Schwangere, HIV-Kranke oder ältere Menschen sind besonders anfällig für eine Infektion mit *L. monocytogenes*. Bedingt durch den allgemeinen medizinischen Fortschritt steigt auch die Lebenserwartung der Menschen, die diesen Risikogruppen angehören, und damit auch die Zahl der möglichen Opfer einer *L. monocytogenes*-Infektion (McLauchlin, 1990).

Eine ZNS-Listeriose unterscheidet sich von anderen bakteriell verursachten ZNS-Erkrankungen in vielerlei Hinsicht. Bei Patienten mit einer durch Listerien verursachten ZNS-Infektion sind nur ca. 60-70 % der Blutkulturen positiv, Gramfärbungen des Liquors sogar nur zu ca. 30 %. In ca. 60 % der Fälle, in denen sich betroffene Patienten einer Computertomographie unterzogen, war diese ohne Befund (Mylonakis *et al.*, 1998). Der Liquor von an ZNS-Listeriose erkrankten Patienten enthält weniger neutrophile Granulozyten und geringere Proteinkonzentrationen im Vergleich zu Patienten, bei denen andere Bakterien für die ZNS-Erkrankung verantwortlich sind (Mylonakis *et al.*, 1998). Der Umstand, daß nur etwa die Hälfte der Personen mit einer durch Listerien verursachten Meningitis über Kopfschmerzen klagt, macht die Diagnose besonders schwierig. Neben einer durch *L. monocytogenes* ausgelösten Meningitis bzw. Meningoenzephalitis wurden auch Fälle von reiner Enzephalitis beschrieben (Mourad *et al.*, 1986; Armstrong und Fung, 1993; Schlüter *et al.*, 1999).

Wenig ist bisher darüber bekannt, wie *L. monocytogenes* die Barrieren des Gehirns überwindet. Im Mausmodell scheint eine Bakteriämie für die von Listerien verursachte Infektion des ZNS essentiell zu sein (Berche, 1995). Die dazu notwendigen Bakterientiter werden nur dann erreicht, wenn letale Dosen ($4,2 \times 10^7$) intravenös gespritzt werden. Die dadurch verursachte transiente Bakteriämie, in der Bakterientiter von etwa 10^4 Listerien/ml Blut erreicht werden, genügt nicht, um eine Infektion des Gehirns hervorzurufen. Noch in der ersten Stunde nach der Injektion werden die meisten Listerien im Blut abgetötet. Nach einer starken Vermehrung der Listerien in Leber und Milz kommt es zu einer zweiten, mehrere Tage andauernden Bakteriämie, diesmal mit Blutkonzentrationen von 10^2 - 10^3 Listerien/ml. Erst im weiteren Verlauf einer solchen persistenten Bakteriämie können Listerien ins Gehirn gelangen und sich dort vermehren. In diesen Studien wurde das Gewebe des *choroid plexus* als Eintrittspforte und erster Vermehrungsort für die Listerien im Gehirn verantwortlich gemacht (Berche, 1995; Prats *et al.*, 1992). In einem anderen Mausmodell (López *et al.*, 1999), in dem die Listerien subkutan injiziert wurden, konnte der zeitliche Verlauf der ZNS-Infektion genauer bestimmt werden. Drei Tage nach der Infektion war bei fast allen Versuchstieren eine Entzündung der Hirnhäute, nicht aber der Ventrikel festzustellen (López *et al.*, 1999; Seebach *et al.*, 1995). In diesen Fällen scheinen die Listerien über die Blutgefäße der Hirnhäute in den Subarachnoidalraum gelangt zu sein. Nach einer Vermehrung der Listerien im Subarachnoidalraum und den weichen Hirnhäuten konnte auf Endothelzellen und im Hirnhautgewebe in unmittelbarer Nähe zu Infektionsherden eine verstärkte Expression von P-Selektin und ICAM-1 nachgewiesen werden (López *et al.*, 1999). Wie bereits oben beschrieben, nutzen neutrophile Granulozyten genau diese endothelialen Adhäsionsmoleküle zur Bindung an Endothelzellen, um aus den Gefäßen in den Liquor zu gelangen. Da *L. monocytogenes* in neutrophilen Granulozyten überleben kann, ist es denkbar, daß Listerien in neutrophilen Granulozyten Zugang zum Subarachnoidalraum haben (Drevets, 1999).

1.4 Endothelzellen

Endothelzellen kleiden die Wände der Blutgefäße aus. Sie sind wie Epithelzellen über Zell-Zell-Verbindungen miteinander verbunden. Bisher wurden zwischen Endothelzellen Tight Junctions, Gap Junctions, Adherence Junctions und Syndesmos nachgewiesen (Dejana *et al.*, 1995; Baciu *et al.*, 2000). Die strukturgebende Komponente für die Adherence Junctions der *zonula adherens* ist VE-Cadherin. Wie auch N-Cadherin, welches ebenfalls in Endothelzellen nachgewiesen werden konnte (Kowalczyk *et al.*, 1998), gehört VE-Cadherin zur Familie der Ca^{2+} -abhängigen Zell-Zell-Adhäsionsmoleküle. Im Gegensatz zu Epithelzellen bilden Endothelzellen keine Desmosomen oder Hemidesmosomen aus (Kowalczyk *et al.*, 1998).

Es wird zwischen makrovaskulärem und mikrovaskulärem Endothel unterschieden (s. Abb. 1.5), aber auch venöses und arterielles Endothel kann sich hinsichtlich der Morphologie (Beekhuizen und van Furth, 1994) oder der Expression bestimmter Oberflächenmarker unterscheiden (Levene *et al.*, 1988). Endothelzellen sind für die Bildung der Basallamina und anderer Bestandteile der extrazellulären Matrix verantwortlich. Neben Monoamin-Oxidase, die in den endothelialen Mitochondrien produziert wird, um die Katecholaminhormone Adrenalin, Noradrenalin und Dopamin zu inaktivieren, sind Endothelzellen in der Lunge für die Produktion des Angiotensin-konvertierenden Enzyms verantwortlich (Lechardeur *et al.*, 1995). Ferner synthetisieren Endothelzellen Prostacyclin, den Antihämophilen-Faktor, den „von Willebrand-Faktor“ (Faktor VIII), den Plasminogen-Aktivator, Stickoxide und Endothelin. Zellen endothelialen Ursprungs nehmen acetyliertes LDL („low density lipoprotein“) über einen Scavenger-Rezeptor auf (Lechardeur *et al.*, 1995). Die Bindung von *Ulex-europaeus*-Agglutinin-I, einem Lectin, an Zellen wird in der Literatur als Indiz dafür angesehen, daß es sich hierbei um Endothelzellen handelt (Miettinen *et al.*, 1983).

Die Endothelzellen des makrovaskulären Endothels kleiden die Wände größerer Gefäße aus, wobei hier immer mehrere Zellen zusammen das Lumen formen. Endothelzellen des makrovaskulären Endothels sind von einer Basalmembran umgeben, aber nie untereinander mit Tight Junctions verbunden (s. Abb. 1.5). Endothelzellen, die sich aus frischen Nabelschnüren isolieren lassen (Schnittler *et al.*, 1993), werden als HUVEC („human umbilical vein endothelial cells“) bezeichnet. Diese makrovaskulären Endothelzellen werden schon lange in der Zellkultur verwendet (Gore und Tsutsumi, 1969) und sind daher gut charakterisiert. Die kleinsten Blutgefäße ($\emptyset = \text{ca. } 10 \mu\text{m}$) werden als Kapillaren bezeichnet und von mikrovaskulären Endothelzellen gebildet, indem sich die Einzelzellen ringförmig selbst wieder berühren. Es gibt drei Arten von kapillärem Endothel:

- **Kontinuierliches mikrovaskuläres Endothel:**

Die Endothelzellen sind über Tight Junctions miteinander verbunden und weisen eine sehr geringe Permeabilität auf. Kontinuierliches mikrovaskuläres Endothel kommt überall dort vor, wo es Blut-Gewebe-Schranken gibt: Gehirn, Thymus, Augen, Gonaden, Muskel, Lunge und Knochen.

- **Gefenstertes mikrovaskuläres Endothel:**

Endothelzellen formen einen Ring um das Lumen von Gefäßen zu bilden. Dieser Ring ist nicht vollständig geschlossen. Die winzigen Öffnungen sind mit kleinen Scheidewänden, sogenannten Diaphragmen, bedeckt. Die Basalmembran, die die Endothelzellen umgibt, ist geschlossen. Gefenstertes Endothel befindet sich im Gastrointestinaltrakt, im *choroid plexus* und in endokrinen Drüsen. Da die Scheidewand

einen hohen Anteil an anionischem Heparinsulfat aufweist, sind die Öffnungen für negativ geladene Plasma-Proteine undurchlässig. Die Zellen sind für kleine, gelöste Partikel durchlässig. Anionische Proteine können über Transzytose eingeschleust werden.

- **Diskontinuierliches mikrovaskuläres Endothel:**

Da die Basalmembran diese Endothelzellen nur stellenweise umschließt, bleiben große Lücken zwischen den Endothelzellen. Diese Architektur ist im Körper an solchen Stellen realisiert, an denen ein hoher Stoffaustausch nötig ist, wie z.B. bei Blutgefäßen im Knochenmark, in der Leber und in der Milz.

Die in dieser Arbeit verwendeten transfizierten HBMEC („human brain microvascular endothelial cells“) verfügen bis in hohe Passagen über entsprechende Marker, die sie als mikrovaskuläre Endothelzellen des Gehirns ausweisen (Stins *et al.*, 1994). Membranasoziierte Karboanhydrase IV (CA IV) auf Endothelzellen ist ein spezifischer Marker für kontinuierliches mikrovaskuläres Endothel (Hageman *et al.*, 1991; Ghandour *et al.*, 1992). Der bekannteste Marker für Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke ist Gamma-Glutamyl-Transpeptidase. Man findet diesen Marker aber nicht nur auf HBMEC, sondern auch auf eng damit assoziierten Astrozyten (Zinke *et al.*, 1992). Die in unmittelbarer Nähe der mikrovaskulären Hirnendothelzellen vorkommenden Perizyten und Astrozyten sind an der Bildung und Ausdifferenzierung der Endothelzellen maßgeblich beteiligt. Je nach Stimulus geben sie lösliche Wachstumsfaktoren ab, die die Endothelzellen zur Teilung

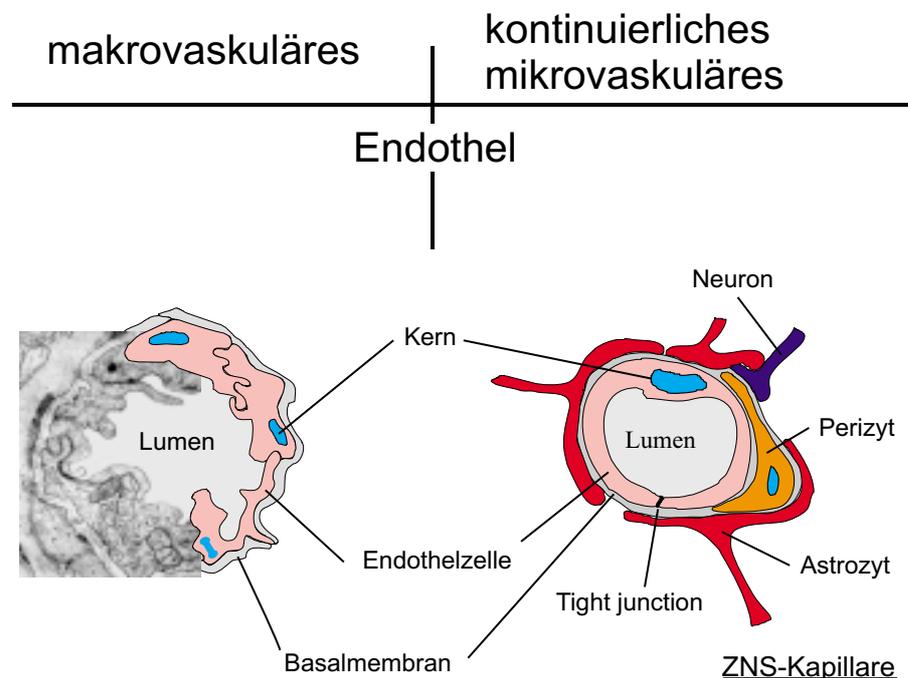


Abbildung 1.5:

Unterschied zwischen makrovaskulärem und kontinuierlichem mikrovaskulärem Endothel. Links: Zusammengesetztes Bild aus elektronenmikroskopischer Aufnahme und schematischer Zeichnung. Das Lumen größerer Gefäße wird durch mehrere Endothelzellen gebildet (makrovaskuläres Endothel). Die einzelnen Zellen sind nicht über Tight Junctions miteinander verbunden. Rechts: Schematischer Aufbau einer ZNS-Kapillare. Die Einzelzellen sind miteinander über Tight Junctions verbunden und bilden so das Lumen der Kapillare. Die Basalmembran verhindert den direkten Kontakt zwischen mikrovaskulären Endothelzellen und Perizyten, Astrozyten und Neuronen.

(Ijichi *et al.*, 1995) oder zur Bildung von Tight Junctions (Igarashi *et al.*, 1999) anregen.

1.4.1 Wirtszellantwort von HUVEC auf eine Infektion mit *L. monocytogenes*

Wie bereits erwähnt, sind die Adhäsionsmoleküle P- und E-Selektin, ICAM-1 und VCAM-1 auf der Endothelzelloberfläche maßgebend für die Wechselwirkung zwischen Leukozyten und Endothelzellen. Aber auch von Endothelzellen sezerniertes IL-8 und MCP-1 spielt bei der Rekrutierung von Leukozyten durch Endothelzellen eine bedeutende Rolle. Die bisher in der Literatur beschriebenen Experimente, die die Auswirkungen einer *L. monocytogenes*-Infektion auf die Expression dieser Faktoren in infizierten Endothelzellen untersuchten, wurden allesamt mit HUVEC durchgeführt.

Infiziert man HUVEC mit *L. monocytogenes*, so führt dies zu einer verstärkten Expression von P-Selektin, die vom listeriellen Protein LLO abhängig ist (Krull *et al.*, 1997). Uneinheitlich wird in der Literatur die Frage beurteilt, ob LLO für die Induktion der Expression von ICAM-1 und VCAM-1 erforderlich ist. Während Krull *et al.*, 1997 eine von LLO unabhängige Induktion von E-Selektin, ICAM-1 und VCAM-1 in mit *L. monocytogenes* infizierten HUVEC beschreiben, wird bei Kayal *et al.*, 1999 die induzierte Expression von ICAM-1 und E-Selektin in mit *L. monocytogenes* infizierten HUVEC auf LLO zurückgeführt. Ferner werden nach der Infektion von HUVEC mit *L. monocytogenes* IL-8 (Greiffenberg *et al.*, 1997) und MCP-1 ins Medium sezerniert sowie der Transkriptionsfaktor NF- κ B in den Kern transloziert (Kayal *et al.*, 1999). Auch für diese Wirtszellantwort von HUVEC auf eine *L. monocytogenes*-Infektion ist LLO verantwortlich (Kayal *et al.*, 1999). Weiterhin konnte gezeigt werden, daß LLO und PlcA für die Induktion des Phosphatidylinositol-Metabolismus in mit Listerien infizierten HUVEC ursächlich sind (Sibelius *et al.*, 1996). Werden HUVEC mit LPS behandelt, induziert dies eine verstärkte Freisetzung von IL-1 und TNF in den Kulturüberstand. IL-1 und TNF wiederum induzieren in HUVEC die Expression von ICAM-1, E-Selektin und VCAM-1 (Montgomery *et al.*, 1991; Bender *et al.*, 1994).

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Zu Beginn dieser Untersuchung war nur wenig über die Fähigkeit von *L. monocytogenes*, Endothelzellen zu infizieren, bekannt. In den ersten Arbeiten, die sich mit dieser Fragestellung beschäftigten, wurden HUVEC verwendet (Drevets *et al.*, 1995). Bei diesen leicht zu isolierenden Endothelzellen handelt es sich um makrovaskuläre Endothelzellen. Durch die Zusammenarbeit mit Herrn Prof. Dr. H. J. Schnittler vom Institut für Anatomie der Universität Würzburg hatten wir Zugriff auf HUVEC und waren so in der Lage, die Versuche von Drevets *et al.*, 1995, zu wiederholen und auf weitergehende Fragestellungen auszuweiten. Die Methode der RT-PCR (Kuhn und Goebel, 1994) sollte zur Beantwortung der Frage herangezogen werden, ob - und wenn ja, wie eine Infektion von HUVEC mit *L. monocytogenes* die Transkription bestimmter Gene beeinflusst. Im Mittelpunkt dieser Transkriptionsstudien stand die Transkription von Zytokinen und Zelladhäsionsmolekülen.

Infektionen des Gehirns stellen eine häufige Komplikation im Verlauf einer Listeriose beim Menschen dar. Sowohl bei der Blut-Hirn-Schranke als auch bei der Blut-Liquor-Schranke sind mikrovaskuläre Hirnendothelzellen von zentraler Bedeutung. Erreger einer ZNS-Erkrankung müssen stets Endothelzellbarrieren durchbrechen, um vom Blut ins ZNS zu gelangen. Bei der Blut-Hirn-Schranke stellen die Endothelzellen diese Barriere selbst

dar, bei der Blut-Liquor-Schranke bilden sie die Barriere zusammen mit Epithelzellen. Da uns mit HBMEC (Stins *et al.*, 1994) entsprechende Zellen zur Verfügung standen, sollten verschiedene Parameter der Wechselwirkung von *L. monocytogenes* mit diesen Zellen untersucht werden. Im Mittelpunkt der Infektionsstudien stand dabei der Aufnahme-mechanismus sowie die Frage, welche Virulenzfaktoren es den Listerien ermöglichen, HBMEC zu invadieren. Der Aufnahmemechanismus von *L. monocytogenes* in HBMEC sollte anhand elektronenmikroskopischer Studien genauer untersucht werden. Schließlich sollte versucht werden, ein der Blut-Liquor-Schranke des *choroid plexus* nachempfundenen *in-vitro*-Modell zu etablieren.

2 Ergebnisse

In nahezu allen in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Versuchen wurden Endothelzellen mit Listerien infiziert. Die Endothelzellen wurden in Zellkulturplatten bis zur Konfluenz kultiviert. Zur Infektion wurde das Kulturmedium gegen listerienhaltiges Medium ersetzt. Soweit sich bei einer solchen Infektion 20mal mehr Listerien im Infektionsmedium als Endothelzellen in den Näpfen der Zellkulturplatte befinden, spricht man von einer Multiplizität der Infektion (MOI) von 20. In einigen der vorliegenden Versuche wurden die Listerien zur Erhöhung der Invasionsrate sogleich nach Zugabe des Infektionsmediums auf die Endothelzellen zentrifugiert. Nach der Infektionszeit wurden durch Waschen der Zellen überschüssige Listerien aus dem Versuchsansatz entfernt. Anschließend wurden die infizierten Endothelzellen in den Invasionsexperimenten mit Kulturmedium inkubiert, welches das Antibiotikum Gentamycin enthielt. Diese Inkubation diente dazu, extrazelluläre Listerien abzutöten. Die dieser Infektion (nach-)folgende Inkubationszeit wird in den Versuchsbeschreibungen auch als Post-Inkubationszeit oder Post-Infektionszeit (p.i.) bezeichnet. Definitionsgemäß ist $t = 0$ Stunden p. i. der Zeitpunkt der Zugabe des Gentamycin-haltigen Mediums. Nach der Post-Inkubationszeit wurden die infizierten Zellen gewaschen und lysiert. Das die Listerien enthaltende Lysat wurde sodann in verschiedenen Verdünnungsstufen auf BHI-Platten ausplattiert. Aus der Anzahl der über Nacht gewachsenen Kolonien konnte auf die Anzahl der Bakterien im Lysat geschlossen werden. Da sich die Listerien vor der Lyse in den Zellen befanden und erst durch die Lyse freigegeben sind, läßt sich auf diese Weise die Invasionsrate bestimmen.

Die Ergebnisse dieser Infektionsexperimente wurden in einem sogenannten Studentischen t-Test statistisch ausgewertet (s. 5.1). Als signifikant werden in den Bildlegenden nur diejenigen p-Werte des Tests erachtet, die $\leq 0,01$ sind.

2.1 Adhäsion von Listerien an bzw. Assoziation mit Hirnendothelzellen (HBMEC)

Listerien können viele eukaryontische Zell-Typen invadieren (s. 1.1). In allen bisher beschriebenen Fällen werden die Listerien über den sogenannten „Zipper-Mechanismus“ aufgenommen: Die Listerien binden hierzu an die Wirtszelloberfläche und durch die sich anschließenden Veränderungen der Wirtszellmembran und des Zytoskeletts tauchen sie schließlich in die eukaryontische Zelle ein (Mengaud *et al.*, 1996b). Bei diesem Vorgang, bei dem das Bakterium von der Wirtszellmembran umflossen wird, spielt die initiale Bindung des Bakteriums an die Wirtszelle eine wichtige Rolle. In Invasionsexperimenten (s. Abb. 2.9), in denen HBMEC mit Listerien infiziert wurden, erwiesen sich - im Gegensatz zum invasiven Wildtyp *L. monocytogenes* EGD - *L. innocua* und *L. monocytogenes* $\Delta inlB$ als nicht invasiv. Es sollte deshalb untersucht werden, ob für die Aufnahme der

Bakterien in HBMEC ihre Bindung an die Wirtszellmembran essentiell ist oder ob Bindung und Invasion nicht unmittelbar miteinander verknüpft sein müssen. Sollten auch nicht-invasive Listerien in der Lage sein, an HBMEC zu binden, so wäre dies ein Hinweis darauf, daß sich Bindung und Invasion nicht auf einen gemeinsamen Mechanismus zurückführen lassen. Um die Bindung der Listerien an HBMEC zu untersuchen, wurden zwei methodische Ansätze verfolgt (s. 5.2.6): Im klassischen Adhäsionsexperiment wird die Bakterienaufnahme in die Wirtszellen durch den Inhibitor Cytochalasin D verhindert. Es wird dabei davon ausgegangen, daß sich alle nicht an die Wirtszellen gebundenen Bakterien durch wiederholtes Waschen mit PBS entfernen lassen und sich bei Versuchsende nur noch an Wirtszellen gebundene Bakterien in den Näpfen der Zellkulturplatte befinden. Da Cytochalasin D die Zellmorphologie der Endothelzellen stark verändert, könnte sich dies auf die Fähigkeit der Listerien, an HBMEC zu binden, auswirken. Um dies auszuschließen, wurden zusätzlich Assoziationsexperimente durchgeführt, bei denen auf Cytochalasin D verzichtet wird. Eine Aufnahme der Bakterien in die Wirtszellen wird durch kurze Infektionszeiten gering gehalten.

Wie sich herausstellte, ist die Invasionseffizienz von Listerien in HBMEC u.a. von der Zusammensetzung des Infektionsmediums abhängig. Für diesen Effekt sind vermutlich Bestandteile des Serums verantwortlich. Durch Bindungsstudien, in denen die Bindung von Listerien an HBMEC in An- und Abwesenheit von Humanserum bzw. fötalem Kälberserum untersucht wurde, sollte überprüft werden, inwieweit die Seren die Bindung von Listerien an HBMEC beeinflussen.

2.1.1 Assoziation von *L. monocytogenes* und *L. innocua* mit HBMEC

Wie in Abbildung 2.1 dargestellt, sind neben *L. monocytogenes* EGD auch *L. innocua* und *L. monocytogenes* $\Delta inlB$ befähigt an HBMEC zu binden. 35 min nach der Infektion konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Assoziationsraten festgestellt werden. Obwohl *L. innocua* und *L. monocytogenes* $\Delta inlB$ HBMEC nicht invadieren können (s. Abb. 2.9), kann man eine mit dem Wildtyp vergleichbare Assoziation an HBMEC feststellen. Auch in Giemsa-Färbungen (s. 5.2.10) konnte eine Bindung von *L. innocua* und *L. monocytogenes* $\Delta inlB$ an HBMEC beobachtet werden. Dazu wurde mit dem Lichtmikroskop die Anzahl assoziierter Listerien in jeweils 100 Gesichtsfeldern bestimmt: Prozentual verglichen mit der Assoziationsrate von *L. monocytogenes* EGD betrug die Assoziationsrate für *L. innocua* 41 %, für *L. monocytogenes* $\Delta inlB$ nur 25 %. In Abbildung 2.2 wird deutlich, daß nicht-hitzeinaktiviertes Humanserum die Fähigkeit zur Bindung des Wildtyps an HBMEC um 94 % hemmt. Abbildung 2.3 bestätigt die Ergebnisse von Abbildung 2.1 und zeigt zusätzlich, daß 10 % FCS im Infektionsmedium die Bindung von *L. monocytogenes* EGD, *L. innocua* und *L. monocytogenes* $\Delta inlB$ an HBMEC nicht beeinflusst. Humanserum und fötales Kälberserum im Infektionsmedium wirken sich demnach unterschiedlich auf die Assoziation von *L. monocytogenes* EGD mit HBMEC aus.

2.1.2 Rasterelektronenmikroskopische Analyse der Assoziation von *L. monocytogenes* EGD, *L. innocua* und *L. monocytogenes* $\Delta inlB$ mit HBMEC

Wie im vorausgegangenen Versuch gezeigt werden konnte (s. Abb. 2.1), ist nicht nur der in HBMEC invasive Wildtyp *L. monocytogenes* EGD in der Lage, an HBMEC zu binden. Auch *L. innocua* und *L. monocytogenes* $\Delta inlB$, die nicht fähig sind, HBMEC zu invadieren, überdauern - an die Wirtszellen gebunden - die Waschprozedur und können somit

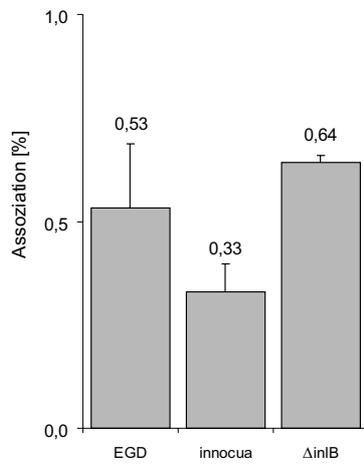


Abbildung 2.1:

Assoziation von *L. monocytogenes* EGD, *L. innocua* und *L. monocytogenes* Δ*inB* mit HBMEC. Infektionsdauer = 35 min, MOI = 70. Anschließend wurden die Zellen 4x mit PBS gewaschen, lysiert und in 150 mM NaCl auf BHI-Platten ausplattiert. Dargestellt ist die Assoziation in % zur eingesetzten Bakterienzahl.

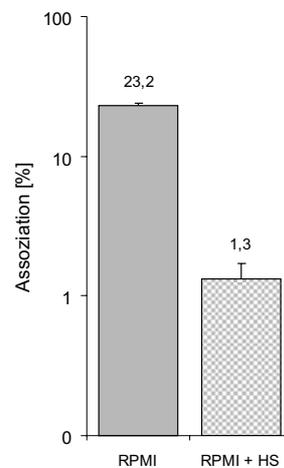


Abbildung 2.2:

Assoziation von *L. monocytogenes* EGD mit HBMEC in 20 % nicht-inaktiviertem Humanserum. Infektionsdauer = 90 min, MOI = 50. Anschließend wurden die Zellen 5x mit PBS gewaschen, lysiert und in 150 mM NaCl auf BHI-Platten ausplattiert. Die verringerte Assoziation in RPMI-Medium + Humanserum (HS) ist signifikant (gemusterter Balken). Dargestellt ist die Assoziation in % zur eingesetzten Bakterienzahl.

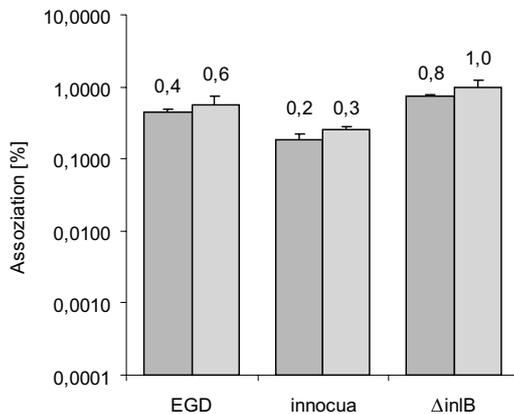


Abbildung 2.3:

Assoziation von *L. monocytogenes* EGD, *L. innocua* und *L. monocytogenes* Δ*inB* mit HBMEC. Infektionsdauer = 35 min, MOI = 50. Anschließend wurden die Zellen 5x mit PBS gewaschen, lysiert und in 150 mM NaCl auf BHI-Platten ausplattiert. Die dunklen Balken zeigen die Assoziationsraten mit RPMI als Infektionsmedium. Die hellen Balken repräsentieren - mit Ausnahme des Infektionsmediums - die gleichen Infektionsbedingungen. Hier fand die Infektion in RPMI + 10 % FCS (hitzeinaktiviert) statt. Dargestellt ist die Assoziation in % zur eingesetzten Bakterienzahl.

ebenfalls an HBMEC binden. HBMEC-Monolayer, die mit *L. monocytogenes* EGD, *L. innocua* und *L. monocytogenes* Δ*inB* infiziert wurden, wurden 35 min nach der Infektion fixiert, für die Elektronenmikroskopie vorbereitet und mit dem Rasterelektronenmikroskop (REM) auf adhärenente Bakterien untersucht. Mit dieser Methode sollten die Daten aus den vorhergehenden Assoziationsexperimenten bestätigt werden. Weiterhin sollte herausgefunden werden, ob sich mit dieser Methode nähere Informationen über die Art der Wechselwirkung zwischen Listerien und Endothelzellen gewinnen lassen.

In Abbildung 2.4 sind zwei Ausschnitte eines nicht-infizierten HBMEC-Monolayers

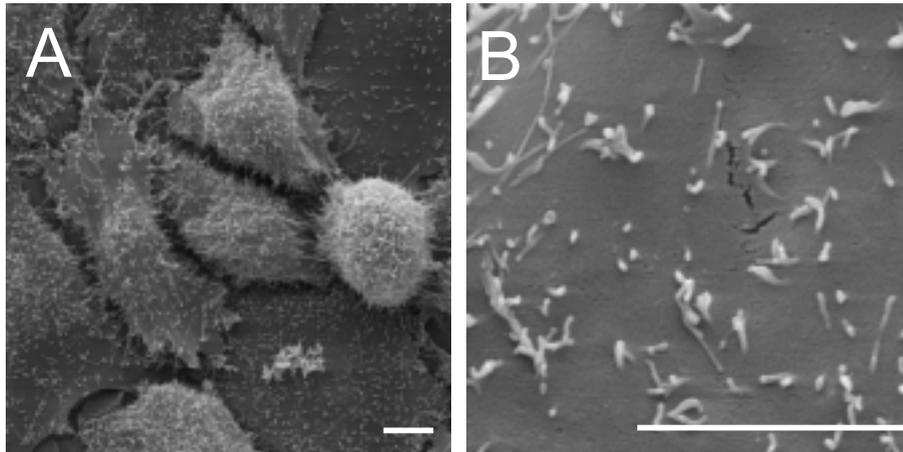


Abbildung 2.4:
REM von nicht-infizierten HBMEC. A und B zeigen unterschiedliche Ausschnitte eines Monolayers. Balken = 5 μm .

abgebildet. Wie in beiden Aufnahmen gut zu erkennen ist, bilden HBMEC Mikrovilli aus. Vergleicht man in Abbildung 2.4 A die Anzahl der Mikrovilli von abgekugelten Zellen mit der von flächigen Zellen, wird deutlich, daß abgekugelte Zellen viele, ausgestreckte Zellen dagegen wenig Mikrovilli aufweisen. Diese Beobachtung traf auf alle analysierten Präparate zu und war unabhängig davon, ob es sich um infizierte oder nicht-infizierte HBMEC handelte. Aufnahme B gibt die typische Verteilung und Häufigkeit der Mikrovilli auf der Oberfläche von flächigen HBMEC wieder.

Die Aufnahmen A-L in Abbildung 2.5 zeigen einen HBMEC-Monolayer 35 min nach der Infektion mit *L. monocytogenes* EGD (A-F), *L. monocytogenes* $\Delta inlB$ (G-I) und *L. innocua* (J-L). Von wenigen Ausnahmen abgesehen (s. Bild A) waren adhärenente, wildtypische Listerien immer mit den Mikrovilli der Endothelzellen assoziiert. Wie in (B) und (D) besonders gut zu erkennen, können die Kontakte zwischen Bakterien und Mikrovilli sehr eng werden. Bild (F) zeigt ein bereits von einer HBMEC aufgenommenes Bakterium. Zur Invasion von *L. monocytogenes* EGD in HBMEC sind damit 35 min ausreichend. In Bild (E) könnte es sich um ein adhärenentes Bakterium handeln, welches gerade bei der Invasion in die Wirtszelle fixiert wurde. Obwohl weder *L. monocytogenes* $\Delta inlB$ noch *L. innocua* in der Lage ist, HBMEC zu invadieren, können beide an HBMEC binden. Wie Auszählungen der REM-Aufnahmen ergaben, waren in 90 % der Fälle, in denen *L. monocytogenes* EGD an HBMEC gebunden hatte, die Listerien mit Mikrovilli assoziiert. Bei *L. innocua* war dies zu 75 %, bei *L. monocytogenes* $\Delta inlB$ nur zu 10 % der Fall.

2.1.3 Adhäsion von Listerien an HBMEC

Ähnlich wie bereits in den Assoziationsexperimenten sollten in den Adhäsionsexperimenten *L. monocytogenes* EGD, *L. innocua* und *L. monocytogenes* $\Delta inlB$ auf ihre Fähigkeit hin untersucht werden, an HBMEC zu binden. Zusätzlich wurden die Experimente auf *L. monocytogenes* $\Delta prfA$ ausgeweitet. Um auszuschließen, daß die Ergebnisse durch eine unspezifische Bindung der Bakterien an die Gelatinebeschichtung der Näpfe verfälscht wurden, wurde zunächst die Bindung von *L. monocytogenes* an diese Beschichtung quantifiziert. Auch wenn bei konfluenten HBMEC-Monolayern kaum Gelatine-beschichtete Oberflächen exponiert sind, wäre es denkbar, daß Listerien während der Infektion an den Napfrändern adhäreren. Da sich im weiteren Verlauf des Experiments keine In-

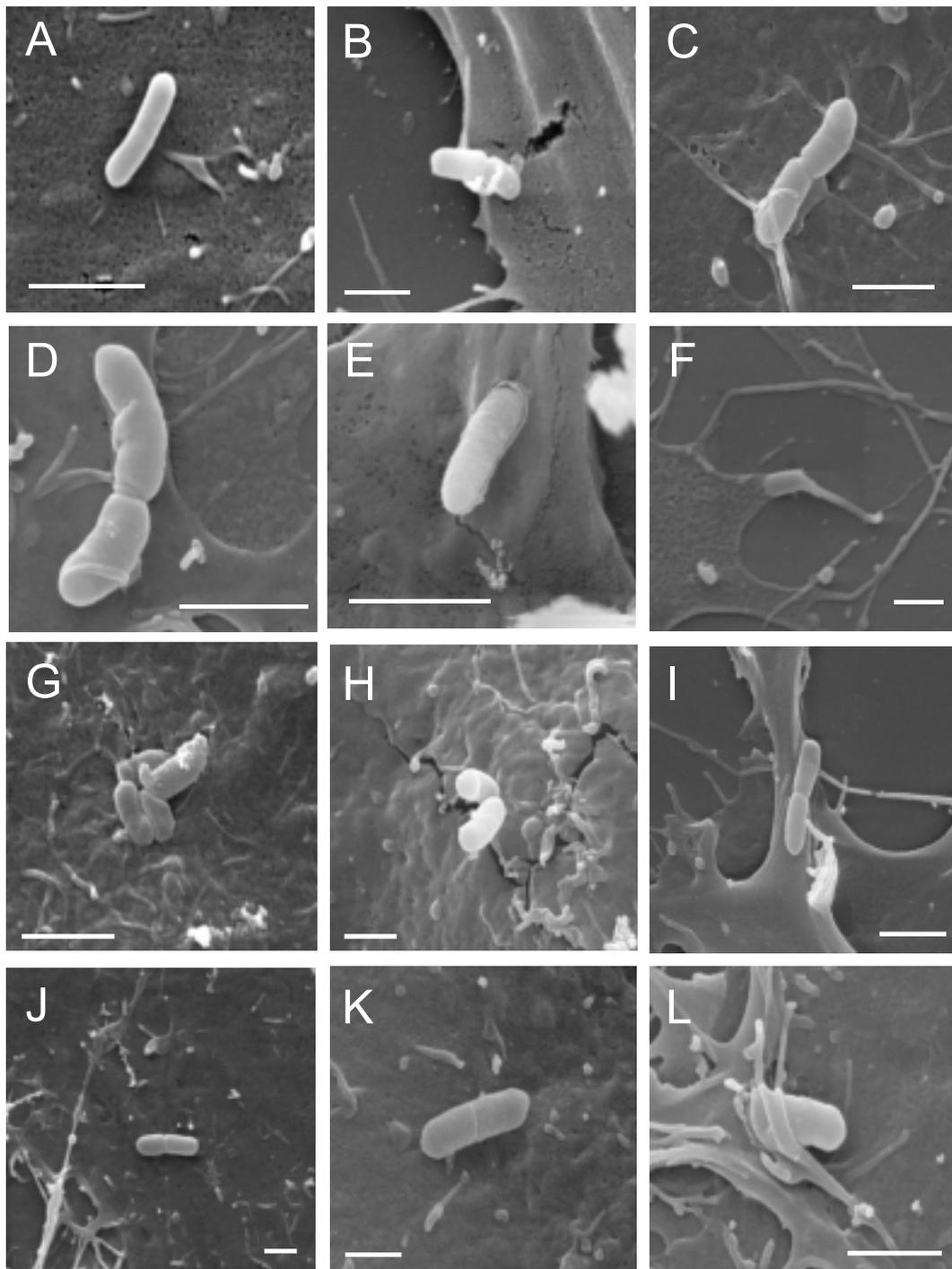


Abbildung 2.5:
 REM von infizierten HBMEC, 35 min nach Infektion. (A-F) *L. monocytogenes* EGD; (G-I) *L. monocytogenes* $\Delta inlB$; (J-L) *L. innocua*. Balken = 1 μm

kubation in Gentamycin-haltigem Medium anschließt, würden so an Gelatine gebundene Listerien nicht abgetötet und könnten das Ergebnis verfälschen. Um den maximal möglichen Fehler zu bestimmen, der hierdurch verursacht werden kann, wurden Gelatinebeschichtete Näpfe, in denen sich keine HBMEC befanden, wie die übrigen Näpfe „infiziert“ (s. Abb. 2.7). In den Abbildungen 2.6 und 2.7 werden der Einfluß von Humanserum im

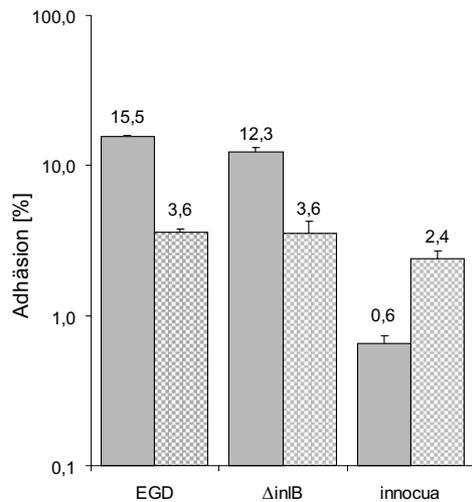


Abbildung 2.6:

Adhäsion von *L. monocytogenes* EGD, *L. monocytogenes* $\Delta inlB$ und *L. innocua* an HBMEC. Infektionsdauer = 90 min, MOI = 20. Der Monolayer wurde für 45 min mit 0,5 $\mu\text{g/ml}$ Cytochalasin D in Kulturmedium präinkubiert. Der Inhibitor war während der gesamten Infektion im Medium anwesend. Anschließend wurden die Zellen 5x mit PBS gewaschen, lysiert und in 150 mM NaCl auf BHI-Platten ausplattiert. Dargestellt ist die Adhäsion in % zur eingesetzten Bakterienzahl. Die Balken (jeweils) links repräsentieren die Adhäsionsraten in RPMI als Infektionsmedium. Die Balken (jeweils) rechts stellen die Adhäsionsraten in RPMI, welches inaktiviertes Humanserum (20 %) enthält, dar. Gemusterte Balken repräsentieren signifikante Adhäsionsunterschiede im Vergleich zur Adhäsion in serumfreiem RPMI-Medium.

Infektionsmedium (RPMI) auf die Adhäsion von Listerien an HBMEC dargestellt und die Adhäsionsraten von *L. monocytogenes* EGD, *L. monocytogenes* $\Delta inlB$, *L. innocua* und *L. monocytogenes* $\Delta prfA$ miteinander verglichen. Beide Versuche unterscheiden sich hinsichtlich ihrer MOI und können daher nicht in einer Grafik zusammengefasst werden. Betrachtet man die Adhäsionsdaten der Infektionen, die in serumfreiem RPMI-Medium durchgeführt wurden, so wies *L. monocytogenes* $\Delta inlB$ im Vergleich zum WT eine etwas verminderte Adhäsion (30-50 %) an HBMEC auf (s. Abb. 2.6 und 2.7). Die Adhäsion der $\Delta prfA$ -Mutante war um den Faktor 11, die von *L. innocua* um den Faktor 25 erniedrigt. Enthielt das Infektionsmedium inaktiviertes Humanserum (20 %), reduzierte sich die Adhäsion von *L. monocytogenes* EGD und der $\Delta inlB$ -Mutante beträchtlich. Im Gegensatz dazu, scheint Humanserum die Adhäsion von *L. monocytogenes* $\Delta prfA$ und *L. innocua* zu erhöhen. Die geringe Adhäsion vom Wildtyp (EGD) an Gelatine-beschichteten Kunststoffoberflächen, wie sie in Abbildung 2.7 als „Leerwert“ ausgewiesen ist, wurde durch Humanserum deutlich verstärkt.

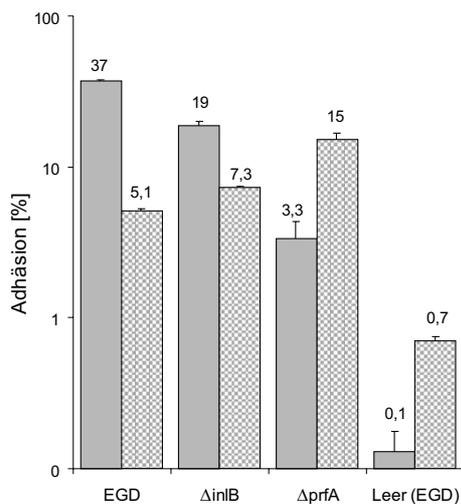


Abbildung 2.7:

Adhäsion von *L. monocytogenes* EGD, *L. monocytogenes* $\Delta inlB$ und *L. monocytogenes* $\Delta prfA$ an HBMEC. Infektionsdauer = 90 min, MOI = 10. Der Monolayer wurde für 45 min mit 0,5 $\mu\text{g/ml}$ Cytochalasin D in Kulturmedium präinkubiert. Der Inhibitor war während der gesamten Infektion im Medium anwesend. Anschließend wurden die Zellen bzw. Näpfe 5x mit PBS gewaschen, lysiert und in 150 mM NaCl auf BHI-Platten ausplattiert. Die Balken (jeweils) links repräsentieren die Adhäsionsraten in RPMI als Infektionsmedium. Die Balken (jeweils) rechts stellen die Adhäsionsraten in RPMI-Medium, welches inaktiviertes Humanserum (20 %) enthält, dar. Bei signifikanten Adhäsionsunterschieden im Vergleich zur Adhäsion in serumfreiem RPMI-Medium sind die Balken gemustert dargestellt. Beim Leerwert befanden sich keine Zellen in den Näpfen. Dargestellt ist die Adhäsion in % zur eingesetzten Bakterienzahl.

2.2 Invasion von Listerien in Endothelzellen

An der Invasion von *L. monocytogenes* in viele Zell-Typen sind Internaline maßgeblich beteiligt (s. 1.1.1). Zu Beginn unserer Untersuchungen war die Rolle, die Internaline bei der Invasion in Endothelzellen spielen, noch unklar. Von Drevets *et al.*, 1995, wurde InlA für die Aufnahme von *L. monocytogenes* in HUVEC verantwortlich gemacht. Indem alle verfügbaren Internalinmutanten von *L. monocytogenes* auf ihre Invasivität in HUVEC und HBMEC getestet wurden, sollte herausgefunden werden, welche(s) Internalin(e) bei der Invasion in Endothelzellen eine Rolle spielen.

Da es sich bei HUVEC und HBMEC um ganz unterschiedliche Endothelzell-Typen handelt, sollte überprüft werden, ob für die Invasion von *L. monocytogenes* in diese Zell-Typen dieselben Invasionsfaktoren benötigt werden oder ob sich HUVEC und HBMEC diesbezüglich unterscheiden. Die apathogene und nicht-invasive Art *L. innocua* (Seeliger, 1984) diente als Negativkontrolle. Wie in 1.1.1 näher beschrieben, können noch andere Faktoren die Invasion von *L. monocytogenes* in Wirtszellen beeinflussen: Um die Rolle von ActA bei der Invasion von *L. monocytogenes* in Endothelzellen zu bestimmen, wurde die Invasivität einer $\Delta actA$ -Mutante von *L. monocytogenes* quantifiziert. Die Invasionsdaten der $\Delta prfA$ -Mutante sollten die Frage nach der PrfA-Abhängigkeit der Invasion von *L. monocytogenes* in Endothelzellen beantworten. Als für die Invasionsexperimente mit HBMEC geeignete Infektionsbedingungen gesucht wurden, stellte sich heraus, daß viele Parameter einen Einfluß auf die Invasion von Listerien in diese Endothelzellen haben. In diesem Zusammenhang wurden viele Invasionsexperimente durchgeführt, in denen die Zusammensetzung des Infektionsmediums, die MOI, die Inkubationszeit und -art (mit und ohne Zentrifugation) variiert wurden. Da Humanserum die Invasivität von *L. monocytogenes* in HBMEC hemmt, wurde ein besonderes Gewicht auf die Analyse des Einflusses von Serum im Infektionsmedium bei der Invasion von *L. monocytogenes* in Endothelzellen gelegt.

2.2.1 Invasion von Listerien in HBMEC

Wie gezeigt werden konnte, ist InlB für die Bindung an HBMEC nicht notwendig (s.-Abb. 2.1). Die $\Delta inlB$ -Mutante bindet in etwa gleich gut an HBMEC wie der Wildtyp. *L. innocua* konnte unter den getesteten Bedingungen schlechter an HBMEC binden als der Wildtyp. Da der HBMEC-Monolayer nach der Infektion mit *L. innocua* mehrfach gewaschen wurde und sich trotzdem Bakterien auf der Endothelzelloberfläche befanden, ist es legitim, von einer Bindung an HBMEC zu sprechen. Daß InlB, welches offensichtlich keine essentielle Rolle bei der Bindung der Listerien an HBMEC spielt, dennoch für die Invasion in HBMEC unabdingbar ist, beweisen die Invasionsexperimente mit Internalinmutanten von *L. monocytogenes* (s.u.).

In den ersten Invasionsexperimenten dieser Arbeit, bei denen HBMEC-Medium als Infektionsmedium verwendet wurde, betragen die Invasionsraten von *L. monocytogenes* EGD in HBMEC trotz Zentrifugation selten mehr als 0,05 %. Da es durchaus möglich ist, daß solche geringen Invasionsraten auf die Zusammensetzung des Infektionsmediums zurückzuführen sind, wurden Infektionen mit unterschiedlichen Infektionsmedien durchgeführt. In Abbildung 2.8 sind die Invasionsraten von *L. monocytogenes* EGD in HBMEC unter Verwendung unterschiedlicher Infektionsmedien dargestellt. Wurden HBMEC mit *L. monocytogenes* EGD in RPMI-Medium infiziert, war die Invasivität der Listerien im Vergleich zur Infektion in HBMEC-Medium um den Faktor 14 erhöht. Fand die Infek-

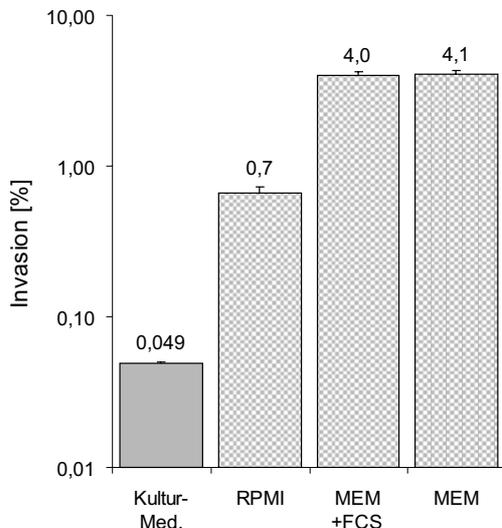


Abbildung 2.8:

Einfluß des Infektionsmediums auf die Invasion von *L. monocytogenes* EGD in HBMEC. MOI = 10. Infektionszeit = 10 min Zentrifugation (bei 1200 rpm) + 80 min. Anschließende Inkubation in Kulturmedium mit Gentamycin (100 µg/ml) für weitere 90 min. Danach wurden die Zellen 2x mit PBS gewaschen, lysiert und in 150 mM NaCl auf BHI-Platten ausplattiert. Gemusterte Balken repräsentieren signifikante Invasionsunterschiede im Vergleich zur Invasion in Kulturmedium. Die FCS-Konzentration im MEM-Medium betrug 10 %. Dargestellt ist die Invasion in % zur eingesetzten Bakterienzahl.

tion in MEM-Medium statt, wurden HBMEC von *L. monocytogenes* EGD 80mal besser invadiert, als dies in HBMEC-Medium der Fall war. Dabei war es unerheblich, ob das MEM-Medium FCS enthielt oder nicht. Da HBMEC-Medium auf RPMI basiert, wurde für alle folgenden Experimente serumfreies RPMI als Infektionsmedium verwendet. Wie sich später für *L. monocytogenes* EGD zeigte (s. Abb. 2.11), werden auch ohne Zentrifugation ähnlich viele Listerien von HBMEC „aufgenommen“.

Wurde eine definierte Anzahl Listerien 1,5 h bei 37 °C in HBMEC-Medium inkubiert und dieses Medium anschließend auf BHI-Platten ausplattiert, fanden sich nur etwa 1 % der eingesetzten Listerien auf den Platten wieder, 99 % wurden im HBMEC-Medium abgetötet. Das Kulturmedium für HBMEC enthält ECGS (s. 4.3.2). Dieses Supplement wurde separat in reiner Form hinzugegeben, befand sich aber auch in einem weiteren Mediumbestandteil, dem NuSerum. Laut Hersteller (SIGMA) enthält das lyophilisierte ECGS - neben dem ECGS-Protein - NaCl und Streptomycinsulfat. Die Konzentration des Antibiotikums Streptomycin erreichte im HBMEC-Medium vermutlich für Listerien toxische Konzentrationen.

Um die Rolle PrfA-abhängiger Faktoren bei der Invasion von *L. monocytogenes* in HBMEC genauer untersuchen zu können, wurde die Invasivität zweier hyperhämolytischer *Listeria*-Stämme in HBMEC getestet. In *L. monocytogenes* NCTC 7973 und *L. monocytogenes* P14A werden PrfA-abhängige Gene verstärkt exprimiert (Brehm *et al.*, 1996). Um herauszufinden, ob ActA einen Einfluß auf die Invasion in HBMEC hat, wurde die zu *L. monocytogenes* P14A isogene Mutante *L. monocytogenes* P14A Δ actA verwendet. Da die Expression von actA stark von PrfA abhängig ist, dürfte der Mengenunterschied des membrangebundenen ActA-Proteins auf der Listerienoberfläche zwischen *L. monocytogenes* P14A und *L. monocytogenes* P14A Δ actA besonders groß sein. Sollte ActA für die Invasion von Listerien in HBMEC wichtig sein, müßte *L. monocytogenes* P14A Δ actA deutlich weniger invasiv sein, als der isogene Wildtyp P14A. Da die von uns verwendete hly⁻-Mutante *L. monocytogenes* M3 eine wesentlich höhere Invasivität in HBMEC aufwies als *L. monocytogenes* EGD, sollte dies mit der pkp-1-Mutante verifiziert werden. In dieser Mutante ist das gesamte Gencluster von *plcA-plcB* - und damit auch *hly* - deletiert. Die Mutante M3 ist eine Tn916-Insertionsmutante des hyperhämolytischen Stammes SLCC 5764 und läßt sich daher von den getesteten Stämmen am ehesten mit *L. monocytogenes*

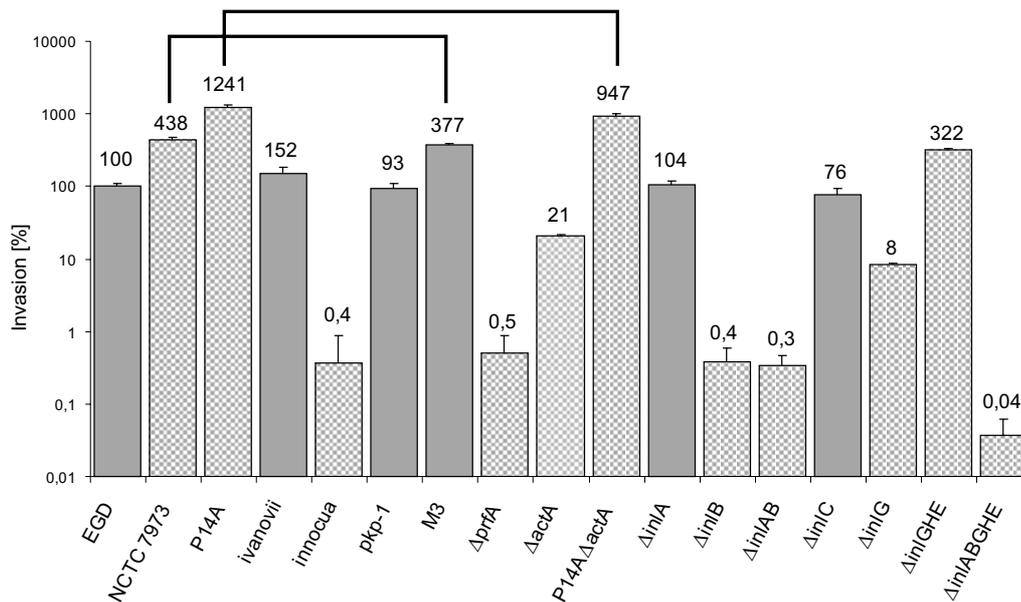


Abbildung 2.9:

Invasion von *L. monocytogenes* EGD, *L. monocytogenes* NCTC 7973, *L. monocytogenes* P14A, *L. ivanovii*, *L. innocua*, *L. monocytogenes* pkp-1, *L. monocytogenes* M3, *L. monocytogenes* ΔprfA, *L. monocytogenes* ΔactA, *L. monocytogenes* P14AΔactA, *L. monocytogenes* ΔinlA, *L. monocytogenes* ΔinlB, *L. monocytogenes* ΔinlAB, *L. monocytogenes* ΔinlC, *L. monocytogenes* ΔinlG, *L. monocytogenes* ΔinlGHE und *L. monocytogenes* ΔinlABGHE in HBMEC. Dargestellt sind die Ergebnisse aus drei voneinander unabhängigen, aber gleich durchgeführten Versuchen. Die Invasionsrate von *L. monocytogenes* EGD betrug in allen Versuchen 6 %. Die Monolayer wurden vor der Infektion 1x mit PBS gewaschen. Infektionsdauer = 90 min, MOI = 20. Die anschließende Inkubation in Kulturmedium + Gentamycin (100 μg/ml) dauerte 90 min. Danach wurden die Zellen 2x mit PBS gewaschen, lysiert und in 150 mM NaCl auf BHI-Platten ausplattiert. Gemusterte Balken repräsentieren signifikante Invasionsunterschiede im Vergleich zur Invasion des Wildtyps (EGD). Die Invasionsraten der zu *L. monocytogenes* EGD nicht isogenen Mutanten *L. monocytogenes* M3 (hly⁻) und *L. monocytogenes* P14AΔactA wurden jeweils mit denen der zu ihnen wildtypischen Stämme verglichen (schwarze Klammern über den Balken). Die Invasionsraten von *L. monocytogenes* NCTC 7973 und *L. monocytogenes* P14A wurden mit der von *L. monocytogenes* EGD verglichen. Dargestellt sind die relativen Invasionsraten (EGD = 100 %).

NCTC 7973 vergleichen.

Auf der linken Seite der Abbildung 2.9 werden die Invasionsraten der wildtypischen Stämme *L. monocytogenes* NCTC 7973, *L. monocytogenes* P14A, *L. ivanovii* und *L. innocua* mit der von *L. monocytogenes* EGD verglichen. Hierbei wird deutlich, daß die hyperhämolytischen Stämme NCTC 7973 und P14A in HBMEC deutlich invasiver sind als *L. monocytogenes* EGD. Da in diesen Stämmen PrfA-abhängige Gene vermehrt exprimiert werden, ist davon auszugehen, daß für die Invasion von Listerien in HBMEC PrfA-abhängige Proteine eine große Rolle spielen. *L. ivanovii* weist ebenso hohe Invasionsraten in HBMEC auf wie *L. monocytogenes* EGD. Die in der Literatur für alle getesteten Zell-Typen als nicht-invasiv beschriebene Art *L. innocua* vermag HBMEC ebenfalls nicht zu invadieren und eignet sich daher als Negativkontrolle für Invasionsexperimente in HBMEC. Alle Mutanten, deren Invasionsraten der von *L. innocua* entsprechen oder darunter liegen, werden hier deshalb ebenfalls als nicht invasiv bezeichnet.

Die mit der von *L. monocytogenes* EGD vergleichbar hohe Invasionsrate von *L. monocytogenes* pkp-1 deutet darauf hin, daß die Genprodukte von *plcA*, *hly*, *mpl*, *actA* und *plcB*, deren Gene in der pkp-1-Mutante deletiert sind, keinen Beitrag zur Invasion von *L. monocytogenes* in HBMEC leisten.

Um auszuschließen, daß nicht doch einige Genprodukte der in der *pkp-1*-Mutante deletierten Gene eine Rolle bei der Invasion von *L. monocytogenes* in HBMEC spielen, wurden Mutanten, die unfähig sind, LLO zu exprimieren (*L. monocytogenes* M3), bzw. kein funktionelles *actA* zu exprimieren vermögen ($\Delta actA$ und P14A $\Delta actA$) auf ihre Invasivität in HBMEC überprüft. Im Ergebnis zeigte sich, daß die Mutante M3 keine signifikant geringere Invasivität in HBMEC im Vergleich zum Stamm NCTC 7973 aufwies, was im Einklang mit der Invasionsrate der *pkp-1*-Mutante steht und bestätigte, daß LLO keine Rolle bei der Invasion von *L. monocytogenes* in HBMEC spielt. Aufgrund der Tatsache, daß sowohl die zu *L. monocytogenes* EGD isogene $\Delta actA$ -Mutante als auch die zu P14A isogene P14A $\Delta actA$ -Mutante eine signifikant geringere Invasivität im Vergleich zu ihrem wildtypischen Stamm in HBMEC besitzen, macht es wahrscheinlich, daß ActA eine Bedeutung bei der Invasion von *L. monocytogenes* in HBMEC hat. Warum dieser Effekt nicht auch bei der *pkp-1*-Mutante festzustellen war und wieso diese Reduktion gerade bei der P14A $\Delta actA$ -Mutante so gering ausfiel, ist unklar. Eine $\Delta prfA$ -Mutante von *L. monocytogenes* EGD ist, wie *L. innocua*, nicht in der Lage HBMEC, zu invadieren.

Um die Bedeutung der Internaline bei der Invasion von *L. monocytogenes* in HBMEC zu untersuchen, wurden die Invasionsraten verschiedener Internalinmutanten in HBMEC bestimmt. Wie sich herausstellte, sind alle Internalinmutanten, die eine Deletion im *inlB*-Gen aufweisen ($\Delta inlB$, $\Delta inlAB$, $\Delta inlABGHE$), in HBMEC nicht invasiv. InlB ist für die Invasion von *L. monocytogenes* EGD in HBMEC essentiell. Wurden in *L. monocytogenes* EGD die Gene *inlC* oder *inlA* deletiert, wirkte sich dies nicht auf die Invasivität in HBMEC aus. Da *L. monocytogenes* $\Delta inlG$ eine um 92 % verringerte Invasivität in HBMEC aufwies, spricht dies für eine Bedeutung von InlG bei der Invasion von *L. monocytogenes* EGD in HBMEC. Wurden in einer Mutante neben *inlG* noch die Gene für die Internaline H und E deletiert, wie dies in *L. monocytogenes* $\Delta inlGHE$ der Fall ist, war die Invasivität dieser Mutante in HBMEC im Vergleich zum Wildtyp allerdings um den Faktor 3,2 erhöht. Die Daten dieses unerwarteten Ergebnisses sind signifikant.

Um auszuschließen, daß der Unterschied zwischen den Invasionsraten des Wildtyps und der $\Delta inlGHE$ -Mutante nicht auf einer unterschiedlichen Gentamycin-Sensitivität beruht, wurden Wachstumskurven beider Stämme in BHI-Medium miteinander verglichen. Hierbei wurde, jeweils ab einer Bakteriendichte von 100 Kletteinheiten (KE), Gentamycin in einer Konzentration von 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ zum BHI-Medium gegeben und das Wachstumsverhalten beider Stämme miteinander verglichen. Gentamycin in einer Konzentration von 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ hemmte 30 min nach Zugabe effektiv das Wachstum beider Stämme in BHI-Medium. Wurden die so behandelten Listerien in BHI-Medium 60 min nach Gentamycingabe auf BHI-Platten ausplattiert, wuchsen auf diesen Platten keine Bakterienkolonien; die Listerien beider Stämme wurden also vom Gentamycin abgetötet. Die höhere Invasivität von *L. monocytogenes* $\Delta inlGHE$ im Vergleich zum Wildtyp beruht somit nicht darauf, daß die Internalinmutante weniger Gentamycin-sensitiv ist als der Wildtyp.

In einem weiteren Experiment wurden die Assoziation und Invasion von Listerien an HBMEC in einem Experiment direkt miteinander verglichen (s. Abb. 2.10). Unter den in der Abbildung 2.10 beschriebenen Versuchsbedingungen werden nach einer Infektion mit *L. monocytogenes* EGD etwa 50 % der mit HBMEC assoziierten Listerien von den Endothelzellen aufgenommen. Vergleicht man die Assoziation von *L. monocytogenes* EGD mit der von *L. innocua* und *L. monocytogenes* $\Delta inlB$ an HBMEC, so stellt man fest, daß *L. innocua* etwa halb so gut und *L. monocytogenes* $\Delta inlB$ mindestens ebenso gut mit HBMEC assoziiert, wie *L. monocytogenes* EGD. Obwohl *L. innocua* und *L. monocytogenes* $\Delta inlB$ befähigt sind, an HBMEC zu binden, sind beide unfähig, HBMEC zu invadieren.

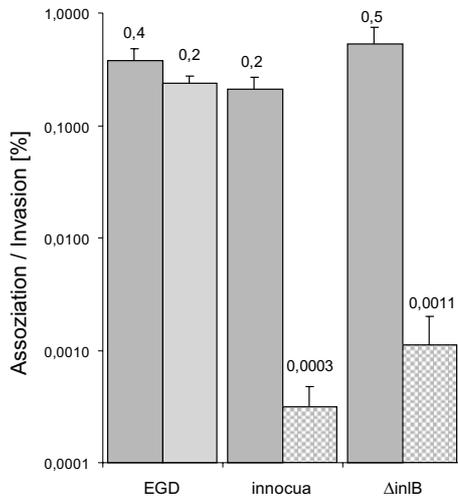


Abbildung 2.10:

Assoziation und Invasion von *L. monocytogenes* EGD, *L. innocua* und *L. monocytogenes* $\Delta inlB$ mit/in HBMEC. Infektion in RPMI-Medium. Der Monolayer wurde vor der Infektion 1x mit PBS gewaschen. Assoziation (linke Balken): Infektionsdauer = 35 min, MOI = 20. Anschließend wurde 5x mit PBS gewaschen. Invasion (rechte Balken): Infektionsdauer = 60 min, MOI = 20. Die sich anschließende Inkubation in Kulturmedium + Gentamycin (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) dauerte 90 min (nur bei Invasionsbestimmung). Danach wurden die Zellen 2x mit PBS gewaschen. Beide Ansätze wurden lysiert und in 150 mM NaCl auf BHI-Platten ausplattiert. Gemusterte Balken repräsentieren signifikante Unterschiede zwischen Assoziation und Invasion. Dargestellt ist die Assoziation bzw. Invasion in % zur eingesetzten Bakterienzahl.

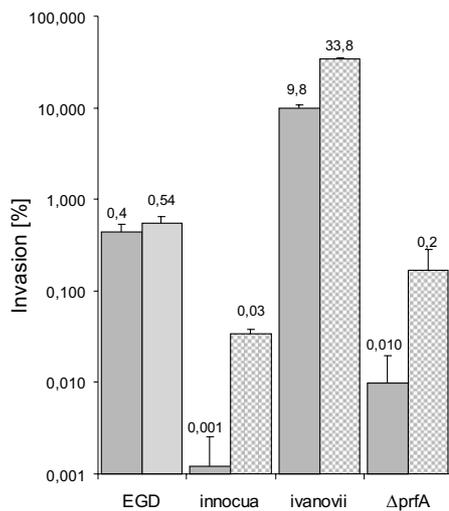


Abbildung 2.11:

Einfluß der Zentrifugation auf die Invasion von *L. monocytogenes* EGD, *L. innocua*, *L. ivanovii* und *L. monocytogenes* $\Delta prfA$ in HBMEC. Infektion in RPMI-Medium in 12er Zellkulturplatten. MOI = 10. Zur Infektion wurde eine Zellkulturplatte 10 min bei 1200 rpm zentrifugiert und dann für weitere 80 min inkubiert. Bei der Kontrolle ohne Zentrifugation betrug die Infektionszeit ebenfalls insgesamt 90 min. Die sich anschließende Inkubation in Kulturmedium + Gentamycin (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) dauerte 90 min. Danach wurden die Zellen 2x mit PBS gewaschen. Beide Ansätze wurden lysiert und in 150 mM NaCl auf BHI-Platten ausplattiert. Gemusterte Balken repräsentieren signifikante Invasionsunterschiede zwischen nicht zentrifugierten (linke Balken) und zentrifugierten (rechte Balken) Ansätzen. Dargestellt ist die Invasion in % zur eingesetzten Bakterienzahl.

In *in-vitro*-Infektionsexperimenten werden die Bakterien oft auf die Zellen zentrifugiert, um höhere Invasionsraten zu erzielen. Wurde *L. monocytogenes* 10 min bei 1200 rpm auf HUVEC zentrifugiert, konnte bei einer MOI von 5 eine Invasionsrate von über 10 % erreicht werden (Greiffenberg *et al.*, 1997).

Da es durchaus denkbar ist, daß die Zentrifugation nicht alle Listerienstämme hinsichtlich ihrer Invasivität in HBMEC gleichermaßen beeinflusst, sollte dies mit einigen Stämmen überprüft werden. Die Ergebnisse dieses Vergleichs zwischen der Invasionsrate mit und ohne Zentrifugation in HBMEC sind in Abbildung 2.11 zusammengefaßt. Eine Zentrifugation führte zu keiner signifikanten Erhöhung der Invasionsrate von *L. monocytogenes* EGD in HBMEC. Wurde *L. ivanovii* auf HBMEC zentrifugiert, verdreifachte sich die Invasivität im Vergleich zur Invasionsrate ohne Zentrifugation. Vergleicht man diese relativ geringfügigen Effekte mit der Auswirkung, den die Zentrifugation auf die Invasion von *L. innocua* und *L. monocytogenes* $\Delta prfA$ in HBMEC hat, stellt man fest, daß diese unter Standardbedingungen in HBMEC nicht-invasiven Listerien infolge der Zentrifugation

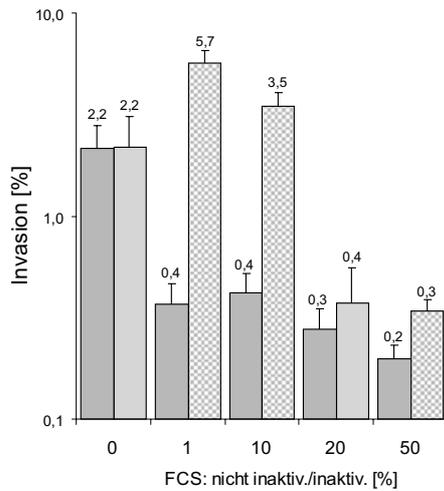


Abbildung 2.12:

Beeinflussung der Invasion von *L. monocytogenes* EGD in HBMEC durch FCS. Infektion in RPMI-Medium mit steigenden FCS-Konzentrationen (0; 1; 10; 20; 50 % FCS) - jeweils mit inaktiviertem FCS (20 min bei 56 °C) und nicht inaktiviertem FCS. MOI = 20. Infektionszeit = 60 min. Anschließende Inkubation in Kulturmedium mit Gentamycin (100 µg/ml) für weitere 60 min. Danach wurden die Zellen 2x mit PBS gewaschen, lysiert und in 150 mM NaCl auf BHI-Platten ausplattiert. Gemusterte Balken repräsentieren signifikante Invasionsunterschiede - verglichen wurden jeweils die Invasionsraten in nicht-inaktiviertem FCS (linke Balken) mit denen in inaktiviertem FCS (rechte Balken). Bei 0 % FCS werden die Positivkontrollen beider Napfplatten miteinander verglichen. Dargestellt ist die Invasion in % zur eingesetzten Bakterienzahl.

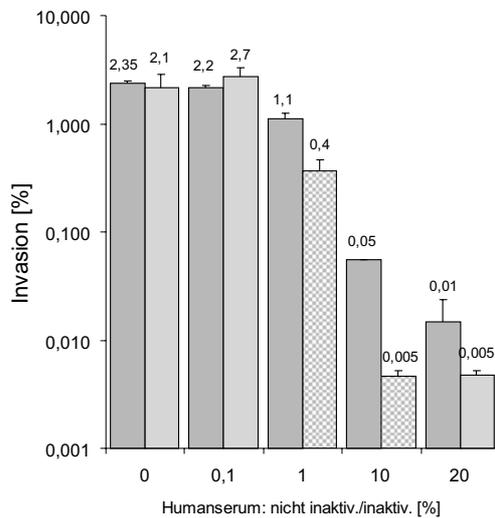


Abbildung 2.13:

Beeinflussung der Invasion von *L. monocytogenes* EGD in HBMEC durch Humanserum (HS). Infektion in RPMI-Medium mit steigenden HS-Konzentrationen (0,1; 1; 10; 20 % HS) - jeweils mit inaktiviertem HS und nicht-inaktiviertem HS. MOI = 20. Infektionszeit = 60 min. Anschließende Inkubation in Kulturmedium mit Gentamycin (100 µg/ml) für weitere 60 min. Danach wurden die Zellen 2x mit PBS gewaschen, lysiert und in 150 mM NaCl auf BHI-Platten ausplattiert. Gemusterte Balken repräsentieren signifikante Invasionsunterschiede - verglichen wurden jeweils die Invasionsraten in nicht-inaktiviertem HS (linke Balken) mit denen in inaktiviertem HS (rechte Balken). Bei 0 % HS werden die Positivkontrollen beider Ansätze miteinander verglichen. Dargestellt ist die Invasion in % zur eingesetzten Bakterienzahl.

HBMEC offenbar invadieren können: *L. innocua* invadierte HBMEC nach einer Zentrifugation 30mal besser als ohne Zentrifugation. Die Invasionsrate von *L. monocytogenes* $\Delta prfA$ in HBMEC erhöhte sich durch die Zentrifugation um den Faktor 20.

Nachdem die Auswirkung der Zentrifugation auf die Invasion von Listerien in HBMEC untersucht wurde, stellte sich die Frage, ob auch andere Infektionsbedingungen wie z.B. Mediumbestandteile einen Einfluß auf die Invasion von Listerien in HBMEC haben. Untersucht man den Einfluß von FCS im Infektionsmedium auf die Invasion von *L. monocytogenes* EGD in HBMEC (s. Abb. 2.12), stellt man fest, daß mit zunehmender Konzentration von nicht-hitzeinaktiviertem FCS im Infektionsmedium die Invasivität abnimmt. Eine Konzentration von 50 % nicht-inaktiviertes FCS im Medium hemmte die Invasivität von *L. monocytogenes* in HBMEC um den Faktor 11. Schon 1 % nicht-inaktiviertes FCS im Infektionsmedium verringerte die Invasivität von *L. monocytogenes* EGD in HBMEC um den Faktor 5,5. Hitzeinaktiviertes FCS hingegen erhöhte bei Konzentrationen bis 10 % die Invasivität von *L. monocytogenes* EGD in HBMEC im Vergleich zur Invasivität in RPMI; bei 1 % FCS wurden beispielsweise 2,6mal mehr Listerien von HBMEC aufgenommen. Ab einer Konzentration von 20 % inaktiviertem FCS in RPMI wirkte sich das Serum ebenfalls

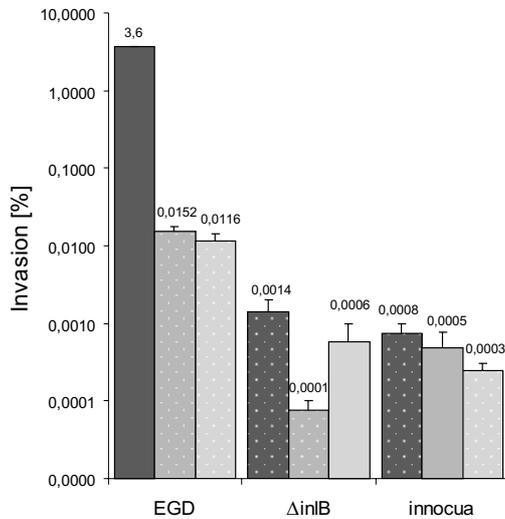


Abbildung 2.14:

Beeinflussung der Invasion von *L. monocytogenes* EGD, *L. innocua* und *L. monocytogenes* $\Delta inlB$ in HBMEC durch Humanserum (20 % im Infektionsmedium). MOI = 100. Infektionszeit = 90 min. Anschließende Inkubation in Kulturmedium mit Gentamycin (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) für weitere 90 min. Danach wurden die Zellen 2x mit PBS gewaschen, lysiert und in 150 mM NaCl auf BHI-Platten ausplattiert. Für jeden Stamm werden die Invasionsraten in (von links nach rechts) RPMI, RPMI + 20 % inaktiviertes HS, RPMI + 20 % nicht-inaktiviertes HS miteinander verglichen. Gemusterte Balken repräsentieren signifikante Invasionsunterschiede - verglichen wurden jeweils die Invasionsraten mit denen desselben Stammes in serumfreiem RPMI-Medium als Infektionsmedium. Die Invasionsraten der Stämme in RPMI-Medium wurden mit denen des Wildtyps (EGD) - in RPMI-Medium - verglichen. Dargestellt ist die Invasion in % zur eingesetzten Bakterienzahl.

hemmend auf die Invasion von *L. monocytogenes* EGD in HBMEC aus, verglichen mit der Invasivität in serumfreiem RPMI. Bei einem Anteil von 50 % inaktiviertem FCS in RPMI verringerte sich die Invasivität von *L. monocytogenes* EGD in HBMEC im Vergleich zur Invasionsrate in serumfreiem RPMI um einen Faktor 7,3. Wie diese Ergebnisse zeigen, kann sich FCS sehr unterschiedlich auf die Invasion von *L. monocytogenes* in HBMEC auswirken.

Humanserum verringert die Invasivität von *L. monocytogenes* EGD in HBMEC beträchtlich (s. Abb. 2.13 und 2.14). Aus Abbildung 2.13 wird deutlich, daß schon 1 % inaktiviertes Humanserum im Infektionsmedium RPMI die Invasionsrate von *L. monocytogenes* EGD in HBMEC um den Faktor 6 verringert. Ab einer Konzentration von 10 % inaktiviertem Humanserum im Infektionsmedium scheint eine Aufnahme von *L. monocytogenes* EGD in HBMEC nicht mehr stattzufinden. Die Interpretation der in beiden Abbildungen 2.13 und 2.14 als signifikant ausgewiesenen Unterschiede zwischen inaktiviertem Humanserum und nicht-inaktiviertem Humanserum bezüglich ihrer Auswirkung auf die Invasivität von *L. monocytogenes* EGD in HBMEC ist schwierig. Die sehr signifikanten Unterschiede bei 1 und 10 % Humanserum im Medium (s. Abb. 2.13) ließen sich bei einer Konzentration von 20 % Humanserum nicht mehr feststellen. Um herauszufinden, ob inaktiviertes oder nicht-inaktiviertes Humanserum im Infektionsmedium einen Einfluß auf die Invasion von *L. monocytogenes* $\Delta inlB$ und *L. innocua* in HBMEC hat, wurden deren Invasionsraten in HBMEC bestimmt (s. Abb. 2.14) und mit der von *L. monocytogenes* EGD verglichen. 20 % Humanserum im Infektionsmedium reduzierte die Invasivität von *L. monocytogenes* EGD in HBMEC etwa um den Faktor 250. Ein solch dramatischer Effekt war vorhanden, egal, ob das Humanserum zuvor inaktiviert wurde oder nicht. *L. monocytogenes* $\Delta inlB$ und *L. innocua* invadieren HBMEC nicht, wobei es keine Rolle spielt, ob die Invasion in serumfreiem RPMI oder in RPMI mit Humanserum stattfindet. Da eine Hitzeinaktivierung des Humanserums dessen inhibitorische Wirkung auf die Invasion von *L. monocytogenes* EGD in HBMEC nicht aufhebt, müssen der oder die dafür verantwortlichen Faktor(en) hitzestabil sein.

Nicht-hitzeinaktiviertes Humanserum enthält große Mengen an Komplementfaktoren und Antikörpern. Um eine mögliche bakterizide Wirkung dieser Serumkomponenten in Infektionsversuchen auszuschließen, wird Serum standardmäßig 20 min bei 56 °C hitzein-

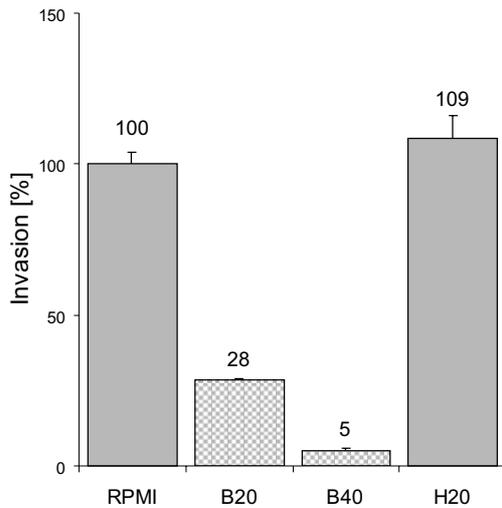


Abbildung 2.15:

Einfluß von bovinem und humanem Albumin im Infektionsmedium auf die Invasion von *L. monocytogenes* EGD in HBMEC. Das verwendete Albumin hat jeweils die Reinheitsstufe: „essentially globulin free“ B = bovin, H = human, Konzentrationen: 20 bzw. 40 mg/ml. MOI = 20. Infektionszeit = 60 min. Anschließende Inkubation in Kulturmedium mit Gentamycin (100 µg/ml) für weitere 60 min. Danach wurden die Zellen 2x mit PBS gewaschen, lysiert und in 150 mM NaCl auf BHI-Platten ausplattiert. Gemusterte Balken repräsentieren signifikante Invasionsunterschiede im Vergleich zur Invasionsrate in RPMI-Medium ohne Albumin. Dargestellt sind die relativen Invasionsraten (Invasion in RPMI-Medium = 100 %).

aktiviert. Zu Beginn dieser Untersuchungen wurden HUVEC mit *L. monocytogenes* EGD in HUVEC-Kulturmedium infiziert, welches 20 % nicht-hitzeinaktiviertes Humanserum enthielt (s. Abb. 2.18). Um die Auswirkung von Humanserum im Infektionsmedium auf *L. monocytogenes* EGD zu bestimmen, wurde eine definierte Anzahl Listerien für 2 Stunden jeweils in RPMI mit 20 % inaktiviertem oder nicht-inaktiviertem Humanserum bei 37 °C inkubiert. Dies entspricht in etwa der Zeit, die die Bakterien dem Serum im Infektionsversuch ausgesetzt sind. Anschließendes Ausplattieren auf BHI-Platten sollte zeigen, wieviel Prozent der Listerien diese Prozedur überlebt haben. Nach einer Inkubation in Medium mit 20 % inaktiviertem Humanserum konnten auf den BHI-Platten noch 83 % der eingesetzten Listerien gezählt werden. Zur Kontrolle wurden Listerien in reinem RPMI inkubiert. Handelte es sich jedoch um nicht-inaktiviertes Humanserum, so überlebten nur 34 % der Listerien diese Behandlung. Da in nicht-inaktiviertem Serum die Komplementfaktoren aktiv sind, könnten die Listerien durch den alternativen- oder klassischen Weg der Komplementkaskade abgetötet worden sein. Trotz dieser bakteriziden Wirkung hemmt nicht-inaktiviertes Humanserum die Invasion von *L. monocytogenes* in HBMEC nicht stärker als inaktiviertes Humanserum.

Da der Hauptbestandteil von Serum neben Wasser Albumin ist - die physiologische Konzentration von Albumin in humanem Plasma beträgt 50 mg/ml - sollte getestet werden, ob Albumin im Serum evtl. für die Hemmung der Invasion von *L. monocytogenes* EGD in HBMEC verantwortlich sein könnte. Die Abbildung 2.15 stellt die Auswirkungen von humanem und bovinem Albumin im Infektionsmedium auf die Invasion von *L. monocytogenes* EGD in HBMEC dar. Die hier eingesetzten Konzentrationen von 20 mg/ml entsprechen fast der Albumin-Konzentration in Medium mit 50 % humanem Serum. Humanes Albumin hat keinen Einfluß auf die Invasion von *L. monocytogenes* EGD in HBMEC. Bovines Albumin im Infektionsmedium hingegen hemmt die Invasion von *L. monocytogenes* EGD in HBMEC beträchtlich. Schon bei einer Endkonzentration von 20 mg/ml bovinem Albumin im Infektionsmedium verringerte sich die Invasivität auf 28 %. Betrug die Konzentration 40 mg/ml, wurde die Aufnahme von *L. monocytogenes* EGD in HBMEC um 95 % gehemmt. Bovines Albumin im Infektionsmedium könnte somit für die Hemmung der Invasion von *L. monocytogenes* in HBMEC durch FCS (s. Abb. 2.12) verantwortlich sein.

Nachdem gezeigt werden konnte, daß humanes Albumin für die beachtliche Hemmung

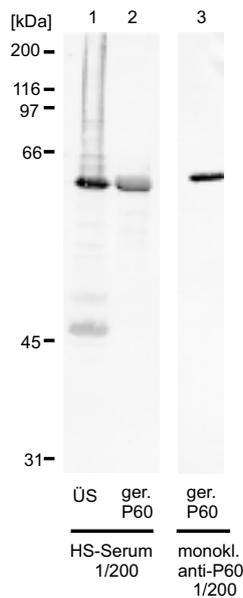


Abbildung 2.16:

Western-Blot zur Detektion von humanen Anti-p60-Antikörpern in inaktiviertem Humanserum. Die Proteine wurden in einem 12%igen Polyacrylamidgel in einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli, 1970, aufgetrennt und anschließend wie bei Towbin *et al.*, 1979, beschrieben, auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Danach wurde die Nitrozellulosemembran mit 3 % (w/v) BSA in PBS mit 0,05 % (v/v) Tween20 ÜN abgesättigt. Nach 3maligem Waschen mit PBS mit 0,05 % (v/v) Tween20 wurde die Membran mit Humanserum inkubiert, wieder wie oben gewaschen und anschließend mit Peroxidase-gekoppelten Antikörpern inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift wurde die Membran mit dem ECL-Kit (Amersham) entwickelt. Die Entwicklung dieser so präparierten Membran macht die Proteine auf einem darauf exponierten Röntgenfilm sichtbar. In Spur 1: TCA-gefällte Überstandsproteine von *L. monocytogenes* EGD. Spuren 2+3: gereinigtes p60 (Bubert *et al.*, 1992). 1. Antikörper: Spuren 1 und 2 wurden mit Humanserum (1/200) inkubiert, Spur 3 mit monoklonalem Anti-p60-Antikörper (1/200). 2. Antikörper: Spuren 1 und 2: Peroxidase gekoppelte IgM- IgG- IgA-Anti-human-Antikörper. Spur 3: Peroxidase-gekoppelte IgM- IgG- IgA-Anti-Maus-Antikörper.

der Invasion von *L. monocytogenes* EGD in HBMEC durch Humanserum nicht verantwortlich ist, sollte getestet werden, ob evtl. Anti-Listerien-Antikörper im verwendeten Humanserum vorhanden sind. In der Literatur wird das listerielle Oberflächenprotein p60 als möglicher Invasionsfaktor beschrieben (Bubert *et al.*, 1992; Kuhn und Goebel, 1989). Ferner ist bekannt, daß beim Menschen p60 ein wichtiges Antigen bei der Immunantwort auf eine Listerieninfektion darstellt und sich nach einer solchen Anti-p60-Antikörper im Serum nachweisen lassen. Im Humanserum vorhandene Anti-p60-Antikörper könnten für die durch Humanserum bedingte Hemmung der Invasion von *L. monocytogenes* in HBMEC verantwortlich sein.

Um dieser Frage nachzugehen, wurde untersucht, ob sich Anti-p60-Antikörper im verwendeten Humanserum nachweisen lassen. Im Humanserum vorhandene Antikörper erkennen im Western-Blot sowohl p60-Protein aus Listerien-Überstand als auch gereinigtes p60-Protein (s. Abb. 2.16, Spur 1 und 2). Die Bandenstärke läßt auf einen hohen Titer an Anti-p60-Antikörpern im getesteten Humanserum schließen. Es waren somit große Mengen Anti-Listerien-Antikörper im untersuchten Humanserum vorhanden, die sich gegen ein an der Invasion von *L. monocytogenes* in HBMEC möglicherweise beteiligtes, listerielle Oberflächenprotein richten.

Durch Inkubation des inaktivierten Humanserums mit Protein-A-Agarose sollte versucht werden quantitativ Antikörper aus dem Serum zu entfernen. Protein A aus *Staphylococcus aureus* bindet spezifisch Immunglobuline. Der sich bildende Komplex läßt sich abzentrifugieren. In Invasionsexperimenten, die mit dem so behandelten Serum durchgeführt wurden, blieb der inhibitorische Effekt von Humanserum auf die Invasion von *L. monocytogenes* EGD in HBMEC jedoch erhalten. Es wurde dabei nicht nachgewiesen, ob das mit Protein-A-Agarose behandelte Serum auch wirklich frei von Antikörpern war.

Um Informationen über den Aufnahmemechanismus von *L. monocytogenes* EGD in HBMEC zu erhalten, wurden Infektionen in Anwesenheit spezifischer Inhibitoren durchgeführt. Es sollte dabei untersucht werden, ob Aktin-Mikrofilamente und Mikrotubuli am Invasionsprozeß beteiligt sind. Da PI 3-Kinasen zusammen mit InlB an der Aufnahme von Listerien in bestimmten Zell-Typen eine wichtige Rolle spielen (Iretton und Cossart, 1997)

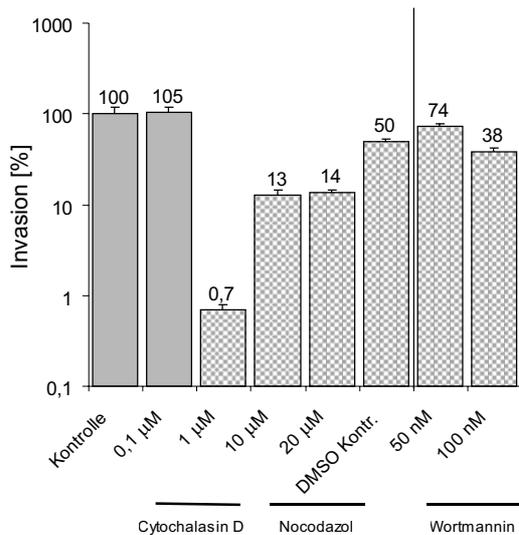


Abbildung 2.17:

Einfluß von Cytochalasin D, Nocodazol und Wortmannin auf die Invasion von *L. monocytogenes* EGD in HBMEC. MOI = 10. Der Monolayer wurde 30 min vor der Infektion mit Kulturmedium + Inhibitor präinkubiert. Infektionszeit = 90 min. Anschließende Inkubation in Kulturmedium mit Gentamycin (100 µg/ml) für weitere 90 min. Bei allen Schritten befanden sich die Inhibitoren in entsprechenden Konzentrationen im jeweiligen Medium. Danach wurden die Zellen 2x mit PBS gewaschen, lysiert und in 150 mM NaCl auf BHI-Platten ausplattiert. Gemusterte Balken repräsentieren signifikante Invasionsunterschiede im Vergleich zur Invasionsrate in RPMI ohne Inhibitor im Infektionsmedium (Kontrolle). Dargestellt sind die relativen Invasionsraten (Kontrolle = 100 %). Es handelt sich um zwei unabhängig voneinander durchgeführte Experimente, die in einer Abbildung zusammengefaßt wurden (getrennt durch den vertikalen Balken).

wurde untersucht, ob der PI 3-Kinase-Inhibitor Wortmannin die Invasion von *L. monocytogenes* in HBMEC zu hemmen vermag und somit auch in HBMEC PI 3-Kinasen an der Invasion von *L. monocytogenes* beteiligt sind. Indem HBMEC 30 min mit Medium, welches die jeweiligen Inhibitoren enthielt, präinkubiert wurden, sollte sichergestellt werden, daß die jeweilige Wirkung der Substanzen bereits zu Infektionsbeginn vorhanden war.

Wie aus Abbildung 2.17 ersichtlich, hemmt das Aktin-Mikrofilament depolymerisierende Cytochalasin D (Cyt.D) die Invasion von *L. monocytogenes* EGD in HBMEC bei einer Konzentration von 1 µM in RPMI fast vollständig. Dieser Effekt konnte auch schon mit einer Cyt.D-Konzentration von nur 0,5 µM erreicht werden (nicht gezeigt). Konzentrationen von nur 0,1 µM Cytochalasin D hatten keine Auswirkung auf die Invasion von *L. monocytogenes* EGD in HBMEC. Nocodazol, welches spezifisch Mikrotubuli depolymerisiert, hemmte die Aufnahme von *L. monocytogenes* EGD in HBMEC um ca. 87 % im Vergleich zur Invasion ohne Inhibitor. Dieser schon bei einer Konzentration von 10 µM auftretende Effekt konnte durch höhere Konzentrationen von Nocodazol im Infektionsmedium nicht weiter gesteigert werden. Der PI 3-Kinase-Inhibitor Wortmannin hemmt die Invasion von *L. monocytogenes* EGD in HBMEC kaum. Bei einer sehr hohen Konzentration von 100 nM, bei der die Wirkung des Inhibitors nicht mehr spezifisch ist, reduzierte sich die Aufnahme von *L. monocytogenes* EGD in HBMEC auf 38 %. Der ebenfalls inhibierende Einfluß des Lösungsmittels DMSO auf die Invasion von *L. monocytogenes* EGD in HBMEC verringert die Aussagekraft der in Abbildung 2.17 dargestellten Ergebnisse nicht, da die eingesetzte Konzentration nur der im Ansatz mit 20 µM Nocodazol entsprach. Der Anteil von DMSO im Medium in den übrigen Ansätzen war um ein Vielfaches niedriger. Um sicherzustellen, daß sich die in DMSO gelösten Inhibitoren nicht auf das Wachstum oder die Überlebensfähigkeit der Listerien auswirken, wurden Wachstumskurven von *L. monocytogenes* EGD in BHI-Medium, welches die Inhibitoren enthielt, erstellt. Dabei zeigte sich, daß kein Inhibitor in den in Abbildung 2.17 aufgeführten Konzentrationen das Wachstum von *L. monocytogenes* EGD in BHI-Medium beeinflusste.

2.2.2 Invasion von Listerien in HUVEC

Da die ersten in der Literatur beschriebenen Infektionsexperimente, in denen Endothelzellen mit Listerien infiziert wurden, mit Nabelschnurendothelzellen (HUVEC) durchgeführt wurden (Drevets *et al.*, 1995), sollten in der vorliegenden Arbeit ebenfalls HUVEC für Invasionsexperimente verwendet werden. Die in den Versuchen verwendeten HUVEC stammten von Herrn Prof. Dr. H. J. Schnittler, Anatomisches Institut, Würzburg. Es wurden frühe Passagen (bis Passage 5) verwendet. Genau wie bei den Invasionsexperimenten mit HBMEC sollten diverse Mutanten von *L. monocytogenes* EGD auf ihre Fähigkeit hin untersucht werden, HUVEC zu invadieren. Ein besonderer Schwerpunkt lag dabei auf dem Invasionsverhalten von Internalinmutanten. Invasionsexperimente in Anwesenheit des Inhibitors Cytochalasin D (Cyt.D) sollten Aufschluß darüber geben, inwieweit Aktinfilamente am Invasionsprozeß beteiligt sind. Analog zu den Invasionsversuchen mit HBMEC sollten der Einfluß von Serum im Infektionsmedium und die Auswirkungen einer Zentrifugation auf die Invasion von Listerien in HUVEC bestimmt werden.

Wie in Abbildung 2.18 ersichtlich, zeigen *L. monocytogenes* $\Delta inlA$, *L. monocytogenes* $\Delta inlBC$ und *L. monocytogenes* $\Delta actA$ keinen signifikanten Unterschied hinsichtlich ihrer Invasivität in HUVEC im Vergleich zum Wildtyp. *L. monocytogenes* $\Delta inlB$ invadiert HUVEC ca. 20 % schlechter als der Wildtyp. Bei folgenden Mutanten und Stämmen ist die Invasivität in HUVEC, verglichen mit dem Wildtyp, um etwa die Hälfte reduziert: *L. monocytogenes* NCTC 7973, *L. ivanovii*, *L. monocytogenes* $\Delta inlAB$, *L. monocytogenes* $\Delta inlC$ und *L. monocytogenes* $\Delta inlGHE$. Die Invasionsrate von *L. monocytogenes* $\Delta prfA$ in HUVEC ist im Vergleich zum Wildtyp um ca. 80 % verringert. Warum die $\Delta inlBC$ -Doppelmutante HUVEC ebenso gut invadiert wie der Wildtyp obwohl die Einzelmутanten eine verminderte Invasivität aufweisen, ist rätselhaft.

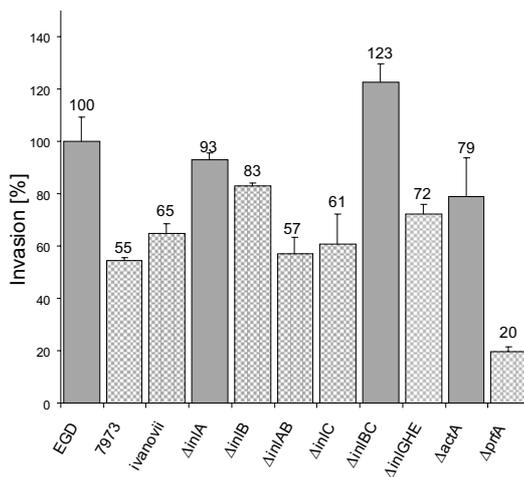


Abbildung 2.18:

Invasion von *L. monocytogenes* EGD, *L. monocytogenes* NCTC 7973, *L. ivanovii*, *L. monocytogenes* $\Delta inlA$, *L. monocytogenes* $\Delta inlB$, *L. monocytogenes* $\Delta inlAB$, *L. monocytogenes* $\Delta inlC$, *L. monocytogenes* $\Delta inlBC$, *L. monocytogenes* $\Delta inlGHE$, *L. monocytogenes* $\Delta actA$ und *L. monocytogenes* $\Delta prfA$ in HUVEC. Infektion in M199-Medium + 20 % nicht-hitzeinaktiviertes Humanserum + Heparin (HUVEC-Kulturmedium). Infektion = 10 min Zentrifugation bei 1200 rpm + weiter 80 min, MOI = 2. Die sich anschließende Inkubation in Kulturmedium + Gentamycin (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) dauerte 90 min. Danach wurden die Zellen 2x mit PBS gewaschen, lysiert und in 150 mM NaCl auf BHI-Platten ausplattiert. Gemusterte Balken repräsentieren signifikante Invasionsunterschiede im Vergleich zur Invasion des Wildtyps. Die Invasionsrate betrug für den Wildtyp 17 % zur eingesetzten Bakterienzahl. Dargestellt sind die relativen Invasionsraten (EGD = 100 %).

Wie in Abbildung 2.19 dargestellt, hemmt Cytochalasin D im Infektionsmedium die Invasion von *L. monocytogenes* EGD in HUVEC. Die Hemmung der Invasion von *L. monocytogenes* EGD in HUVEC bei einer Cyt.D-Konzentration im Infektionsmedium von 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ betrug 98 %. Eine Cyt.D-Konzentration von 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ scheint die Invasion von *L. monocytogenes* EGD in HUVEC noch weiter zu hemmen (99 %). Da derart hohe Konzentrationen von Cytochalasin D die Zellen schädigen, ist die Interpretation der daraus

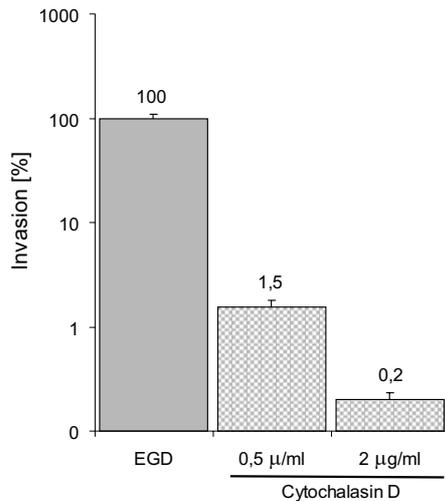


Abbildung 2.19:

Einfluß von Cytochalasin D auf die Invasion von *L. monocytogenes* EGD in HUVEC. Infektion in M199-Medium + Humanserum (20 %) + Heparin (Kulturmedium). Der Monolayer wurde 30 min vor der Infektion mit Kulturmedium + Inhibitor präinkubiert. Infektion = 10 min Zentrifugation bei 1200 rpm + weitere 80 min, MOI = 2. Die anschließende Inkubation in Kulturmedium + Gentamycin (50 µg/ml) dauerte 60 min. Bei allen Schritten befand sich Cytochalasin D in entsprechenden Konzentrationen im jeweiligen Medium. Danach wurden die Zellen 2x mit PBS gewaschen, lysiert und in 150 mM NaCl auf BHI-Platten ausplattiert. Gemusterte Balken repräsentieren signifikante Invasionsunterschiede im Vergleich zur Invasion in Abwesenheit von Cytochalasin D. Die Invasionsrate betrug für den Wildtyp 5 % zur eingesetzten Bakterienzahl. Dargestellt sind die relativen Invasionsraten (EGD in Medium ohne Cytochalasin D = 100 %).

resultierenden Daten schwierig.

Aus Abbildung 2.20 ist ersichtlich, daß sich die Invasionsraten von *L. monocytogenes* EGD in HUVEC durch Zentrifugation deutlich erhöhen lassen. Für die Invasion von *L. monocytogenes* EGD in serumfreiem RPMI-Medium und in RPMI-Medium mit 10 % Humanserum bedeutet dies eine Erhöhung der Invasionsrate um den Faktor 40. In RPMI, mit 10 % FCS fiel dieser Effekt mit einem Faktor 7 wesentlich geringer aus, wobei hier die Invasionsrate ohne Zentrifugation bereits deutlich höher war, verglichen mit der Invasionsrate in serumfreiem RPMI oder mit 10 % Humanserum. Humanserum im Infektionsmedium erhöht die Invasivität von *L. monocytogenes* EGD in HUVEC nicht. Werden die Bakterien auf die Zellen zentrifugiert, kommt es unabhängig vom Infektionsmedium zu einer vermehrten Aufnahme von *L. monocytogenes* EGD in HUVEC.

Die veröffentlichten Invasionsexperimente mit HUVEC aus dieser Arbeit (Greiffenberg *et al.*, 1997) stehen im Konflikt zu den von Parida *et al.*, 1998, veröffentlichten Daten. In Parida *et al.*, 1998 wird eine InlB-abhängige Invasion von *L. monocytogenes* EGD in HUVEC postuliert. Im Gegensatz dazu invadiert die in der vorliegenden Arbeit verwendete $\Delta inlB$ -Mutante von *L. monocytogenes* EGD HUVEC unter den in Abbildung 2.18 beschriebenen Bedingungen fast ebensogut wie der Wildtyp. Im Gegensatz zu den Invasionsexperimenten in Parida *et al.*, 1998 wurden die Bakterien in der vorliegenden Arbeit auf die HUVEC zentrifugiert, außerdem enthielt das verwendete Infektionsmedium 20 % Humanserum. Indem die Invasionsrate von *L. monocytogenes* $\Delta inlB$ in HUVEC mit und ohne Humanserum im Infektionsmedium bestimmt und auf eine Zentrifugation verzichtet wurde (s. Abb. 2.21), sollte überprüft werden, ob sich diese methodischen Parameter auf die Invasion von *L. monocytogenes* $\Delta inlB$ in HUVEC auswirken. Die Bedingungen entsprachen weitestgehend denen, die in Parida *et al.*, 1998 beschrieben wurden. In serumfreiem Infektionsmedium weist *L. monocytogenes* $\Delta inlB$ eine im Vergleich zum Wildtyp um ca. 50 % verringerte Invasivität in HUVEC auf. Humanserum erhöht die Invasivität der $\Delta inlB$ -Mutante (s. Abb. 2.21) in HUVEC, hat aber keine Auswirkung auf die Invasionsrate des Wildtyps in HUVEC (s. Abb. 2.20). Wurde auf Humanserum im Infektionsmedium verzichtet, konnte im Einklang mit den Ergebnissen von Parida *et al.*, 1998 eine deutlich verringerte Invasivität von *L. monocytogenes* $\Delta inlB$ im Vergleich zur Invasionsrate von *L. monocytogenes* EGD

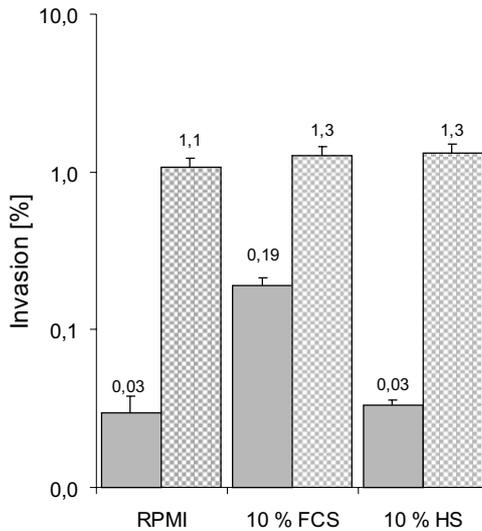


Abbildung 2.20:

Beeinflussung der Invasion von *L. monocytogenes* EGD in HUVEC durch FCS und Humanserum (HS) im Infektionsmedium RPMI und Einfluß der Zentrifugation. FCS und HS wurden zuvor inaktiviert. MOI = 10. Infektionszeit = 60 min bzw. 10 min Zentrifugation bei 1200 rpm + 50 min. Anschließende Inkubation in Kulturmedium (M199 +10 % FCS + Wachstumsfaktor) mit Gentamycin (100 µg/ml) für weitere 60 min. Danach wurden die Zellen 2x mit PBS gewaschen, lysiert und in 150 mM NaCl auf BHI-Platten ausplattiert. Gemusterte Balken repräsentieren signifikante Invasionsunterschiede. Verglichen wurden immer die Balkenpaare untereinander. Links ohne, rechts mit Zentrifugation. Dargestellt sind die Invasionsraten.

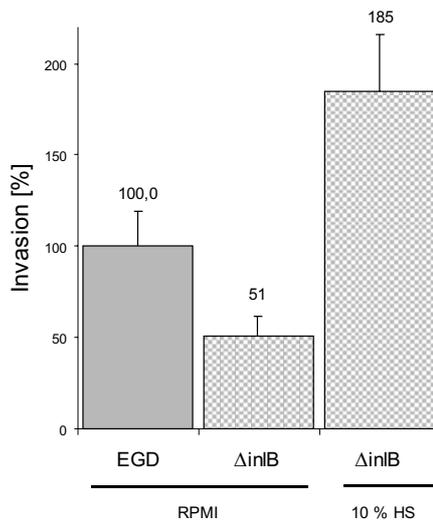


Abbildung 2.21:

Einfluß von inaktiviertem Humanserum im Infektionsmedium RPMI auf die Invasion von *L. monocytogenes* EGD und *L. monocytogenes* Δ*inlB* in HUVEC. MOI = 10. Infektionszeit = 60 min (ohne Zentrifugation). Anschließende Inkubation in Kulturmedium (M199 +10 % FCS + Wachstumsfaktor) mit Gentamycin (100 µg/ml) für weitere 60 min. Danach wurden die Zellen 2x mit PBS gewaschen, lysiert und in 150 mM NaCl auf BHI-Platten ausplattiert. Gemusterte Balken repräsentieren signifikante Invasionsunterschiede im Vergleich zur Invasion des Wildtyps in RPMI. Dargestellt sind die relativen Invasionsraten (EGD = 100 %).

in HUVEC festgestellt werden.

2.3 Intrazelluläre Vermehrung von *L. monocytogenes* in Endothelzellen

Wie bereits in 1.1 erläutert, können sich intrazelluläre Listerien im Zytoplasma aller bisher getesteten Wirtszellen vermehren und fortbewegen. Über Membranausstülpungen gelangen sie von Zelle zu Zelle und sind dabei immer von mindestens einer Wirtszellmembran umgeben (Kaufmann, 1993). Auch wenn die eukaryontischen Zellen nicht direkt nebeneinander liegen, können so Distanzen von ca. 10 µm überbrückt werden. Ausgehend von einer initial infizierten Zelle können Listerien *in vitro* einen ganzen Monolayer infizieren, ohne dabei jemals Kontakt zum umgebenden Medium zu haben. In allen für *L. monocytogenes* permissiven Zell-Typen findet diese Form der schnellen, interzellulären Ausbreitung statt.

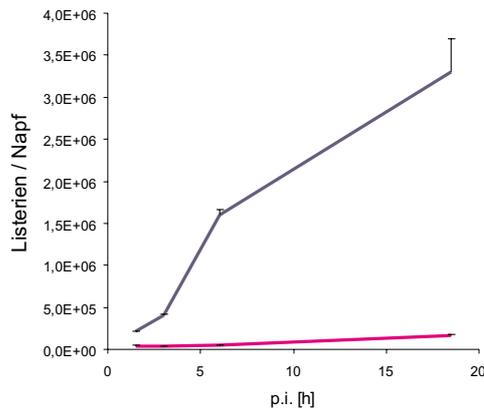


Abbildung 2.22:

Intrazelluläre Vermehrung von *L. monocytogenes* 10403S und *L. monocytogenes* Δhly DP-L2161 in HBMEC. MOI = 5. Infektionszeit = 90 min. Anschließende Inkubation in Kulturmedium mit Gentamycin (100 µg/ml) für weitere 90 min. Für alle Nüpfle mit längerer Post-Inkubationszeit als 90 min wurde das Kulturmedium durch solches mit einer Gentamycinkonzentration von 10 mg/ml ersetzt; zuvor wurde 1x mit PBS waschen. Nach entspr. Zeit wurden die Zellen 2x mit PBS gewaschen, lysiert und in 150 mM NaCl auf BHI-Platten ausplattiert.

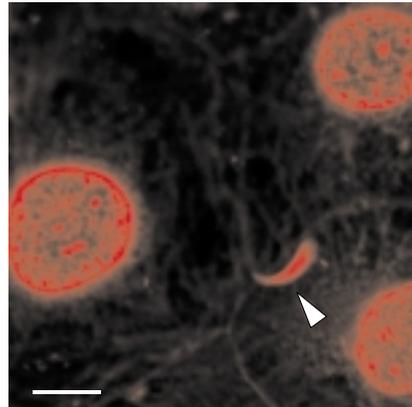


Abbildung 2.23:

Intrazellulärer Aktinschweif von *L. monocytogenes* in HBMEC. HBMEC wurden wie in 5.5.3 beschrieben infiziert, nach 20 h fixiert und mit TRITC-Phalloidin gefärbt um das filamentöse Aktin anzufärben. Der Pfeil zeigt auf einen typischen Aktinschweif eines intrazellulären Bakteriums. Der Balken entspricht 10 µm.

Ob in Endothelzellen - insbesondere in den erst wenig beschriebenen HBMEC - eine solche Ausbreitung von *L. monocytogenes* ebenfalls möglich ist, sollte überprüft werden. In einem ersten Schritt sollte untersucht werden, ob sich die Listerien nach einer Infektion von HBMEC frei im Zytoplasma der Wirtszellen befinden. Ferner sollte die interzelluläre Ausbreitung und Vermehrung von *L. monocytogenes* in HBMEC über einen längeren Zeitraum beobachtet und quantifiziert werden. In Wirtszellen aufgenommene Listerien benötigen LLO, um aus dem Phagosom ins Zytoplasma der Zelle zu entkommen. LLO-negative Mutanten von *L. monocytogenes* verbleiben im Phagosom der Wirtszelle und können sich daher weder wie oben beschrieben im Zytoplasma der Wirtszelle vermehren, noch von Zelle zu Zelle ausbreiten (Tilney und Portnoy, 1989). Um dies in *L. monocytogenes*-infizierten HBMEC zu überprüfen, wurde die Anzahl intrazellulärer Listerien 1, 3, 6 und 18 Stunden nach der Infektion bestimmt. Gentamycin im Medium soll dabei verhindern, daß durch Zell-Lyse freiwerdende Bakterien erneut HBMEC invadieren können. In einem anderen Ansatz wurden HBMEC mit GFP-exprimierenden Listerien (LM-GFP) infiziert. Auf diese Weise war es möglich, mit dem Fluoreszenzmikroskop die intrazelluläre Vermehrung und interzelluläre Ausbreitung der Listerien in HBMEC in Echtzeit zu beobachten. Weiterhin sollte geklärt werden, ob konfluente und semikonfluente HBMEC-Monolayer gleichermaßen gut mit LM-GFP infiziert werden können.

Wie in der Wachstumskurve in Abbildung 2.22 gezeigt, vermehrte sich *L. monocytogenes* in HBMEC kontinuierlich über einen Zeitraum von 18 Stunden in Gegenwart von 10 µg/ml Gentamycin im Medium. In diesem Zeitraum vermehrte sich *L. monocytogenes* intrazellulär um den Faktor 15. Die *L. monocytogenes* Mutante DP-L2161, die eine „in frame“ Deletion im *hly*-Gen aufweist, welches für Listeriolysin O (LLO) kodiert,

verfügt über eine etwas geringere Invasionsrate in HBMEC als der dazu isogene Wildtyp *L. monocytogenes* 10403S. In den ersten 6 Stunden nach der Infektion blieb die Anzahl intrazellulärer, LLO-defizienter Listerien nahezu konstant. Die sich dann anschließende leichte intrazelluläre Vermehrung könnte ein Hinweis darauf sein, daß es wenigen Listerien gelingt LLO-unabhängig ins Zytoplasma der Wirtszelle zu entkommen.

In dem der Abbildung **2.23** zugrundeliegenden Experiment wurde filamentöses Aktin einer mit *L. monocytogenes* EGD infizierten HBMEC mit TRITC-Phalloidin fluoreszenzgefärbt und so Aktinschweife intrazellulärer Listerien sichtbar gemacht (Pfeil). Das mit diesem Schweif assoziierte Bakterium befindet sich folglich im Zytoplasma der Endothelzelle. Auch in HUVEC konnte die intrazelluläre Vermehrung von *L. monocytogenes* EGD sowie die Ausbildung von Aktinschweifern nachgewiesen werden (Greiffenberg *et al.*, 1997).

2.3.1 Beobachtung der intrazellulären Vermehrung von *L. monocytogenes* in HBMEC mit GFP-exprimierenden Listerien

Das grünfluoreszierende Protein (GFP) der biolumineszierenden Qualle *Aequorea victoria* wird seit 1994 in Reportersystemen für die Genexpression in pro- und eukaryotischen Zellen eingesetzt (Chalfie *et al.*, 1994). Wird GFP mit blauem Licht bestrahlt, emittiert es ein helles grünes Licht. Diese Fluoreszenz benötigt weder Kofaktoren noch Substrate oder weitere Gene von *A. victoria*. Eine Expression von GFP in Gewebe, Zellen oder auch Bakterien kann daher über dessen Grünfluoreszenz einfach nachgewiesen werden. Da keine Fixierung der Proben nötig ist, eignet sich das System ideal zur „Live“-Beobachtung in der Zellkultur.

Infiziert man HBMEC mit dem Listerien-Stamm LM-GFP, der ein Plasmid enthält, auf dem *gfp* unter der Kontrolle des *actA*-Promotors steht (Bubert *et al.*, 1999), so sind 2 Stunden nach der Infektion unter dem Fluoreszenzmikroskop grün leuchtende Bakterien zu erkennen (s. Abb. **2.24**). Da der *actA*-Promotor nur dann aktiv ist, wenn sich die Bakterien im Zytoplasma der Wirtszelle (HBMEC) befinden (Bubert *et al.*, 1999), kann man davon ausgehen, daß es sich bei allen grün leuchtenden Bakterien um intrazelluläre Listerien handelt. Die Bilder D und E zeigen frühe Stadien der Infektion. Die Bilder A, B und C geben denselben mit LM-GFP-infizierten Ausschnitt des konfluenten Monolayers, (A) im Phasenkontrast, (B) in einer Überlagerung aus Fluoreszenz und Phasenkontrast und (C) nur als Fluoreszenzaufnahme wieder. Solche stark infizierten Regionen waren immer mit Stellen kolokalisiert, an denen sich HBMEC abgekugelt hatten und z.T. übereinander lagen. Trotz der großen Anzahl intrazellulärer Listerien in solchen Regionen lösten sich die Zellen nicht vom Untergrund ab. Bild F zeigt einen semikonfluenten Monolayer von HBMEC, welcher sich ebenfalls effizient mit LM-GFP infizieren ließ. Um von *L. monocytogenes* EGD invadiert werden zu können, müssen also HBMEC nicht konfluent sein.

2.3.2 Rasterelektronenmikroskopische Analyse von HBMEC nach der Infektion mit *L. monocytogenes*

Um einen optischen Eindruck von mit *L. monocytogenes* EGD infizierten HBMEC zu erhalten, wurden infizierte Monolayer 4 Stunden nach Infektionsbeginn rasterelektronenmikroskopisch untersucht (s. Abb. **2.25**). Da die Endothelzellen in Zellkultur extrem flach sind, können sogar intrazelluläre Bakterien durch die Wirtszellmembran gesehen werden. Das Bild A in Abbildung **2.25** zeigt zwei intrazelluläre, sich in der Teilung befindende Listerien. Im Bild B können Aktinschweife hinter intrazellulären Listerien durch die Wirtszellmembran hindurch gesehen werden. Vermutlich aus sterischen Gründen - mikrovaskuläre

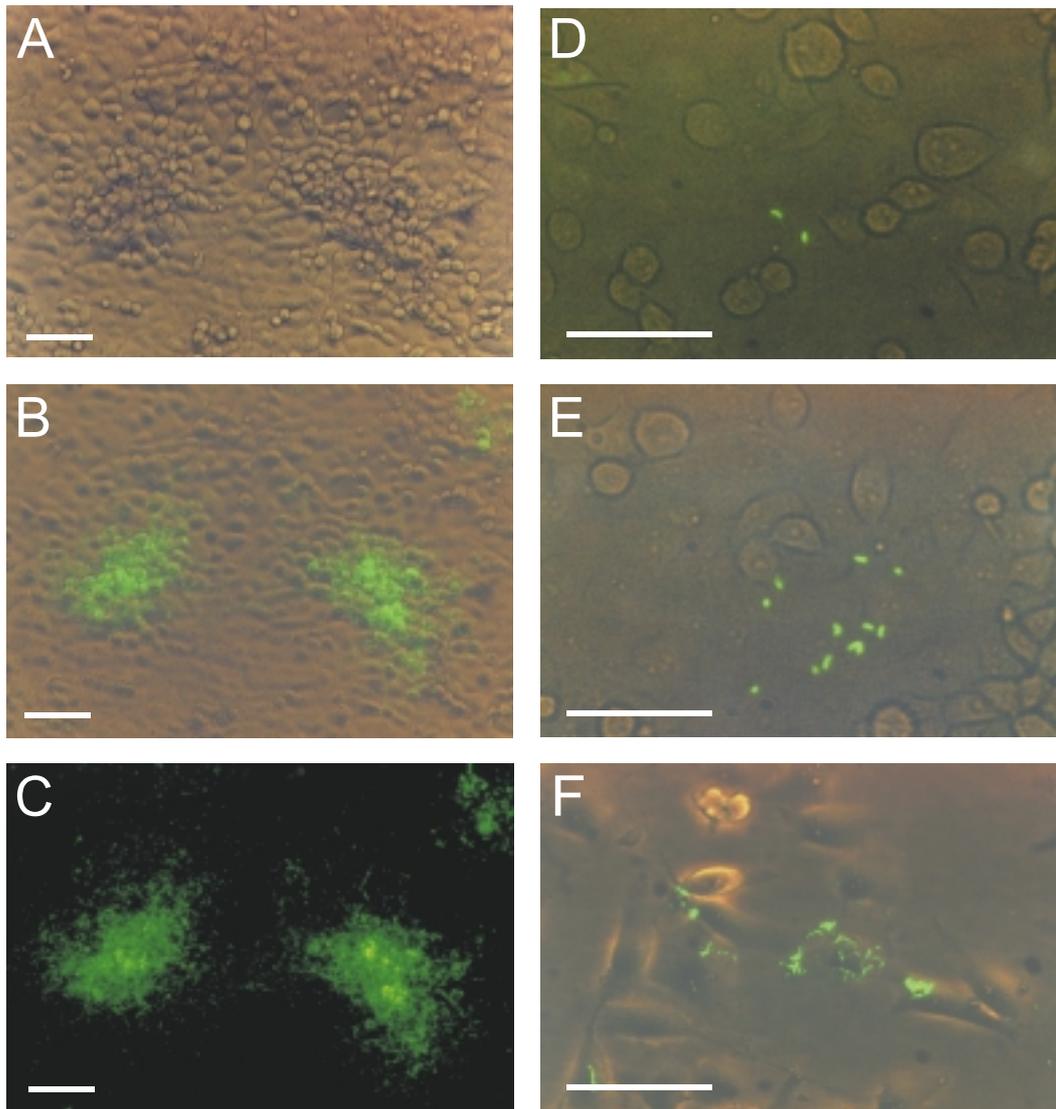


Abbildung 2.24:

Invasion und intrazelluläre Vermehrung des GFP-exprimierenden Stammes *L. monocytogenes* LM-GFP in HBMEC. Die Zellen wurden in 75 ml Zellkulturflaschen kultiviert und mit einer geringen MOI (= 5) infiziert. Die Bilder zeigen den infizierten Monolayer zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Infektion und wurden mit einem Fluoreszenzmikroskop aufgenommen. (A-E) Konfluenten Monolayer, infiziert mit einem GFP-exprimierenden *L. monocytogenes*-Stamm. Infizierte HBMEC: (D) 2,5 h, (E) 4,5 h und (A, B und C) 21 h nach der Infektion. (B, D, E und F) Phasenkontrastbilder, die mit dem Fluoreszenzbild überlagert wurden. Bilder A, B und C zeigen denselben Ausschnitt des infizierten Monolayers von (A) nur Phasenkontrast bis (C) nur Fluoreszenz. (F) Infektion eines subkonfluenten HBMEC Monolayers 17 h nach der Infektion (überlagert). Die Balken repräsentieren 50 μm .

Endothelzellen sind selten dicker als 1 μm - befinden sich 4 Stunden nach der Infektion viele intrazelluläre Listerien in der Spitze von Membranausstülpungen, sogenannten Protrusionen (D, E, F, G, H, I). Das Bild C zeigt ein frühes Stadium einer Protrusion. In Bild D und E ist deutlich zu erkennen, daß sich die Ausstülpungen zur Basis hin immer mehr verjüngen und die Bakterien nur über einen sehr dünnen Membranschlauch weiterhin mit der Zelle verbunden sind. In Bild G berühren sich zwei Protrusionen extrazellulär. Die Bilder H und I verdeutlichen, wie weit sich intrazelluläre Listerien in Protrusionen von ihren Zellen entfernen können, ohne daß die Verbindung mit dem Zytoplasma abreißt.

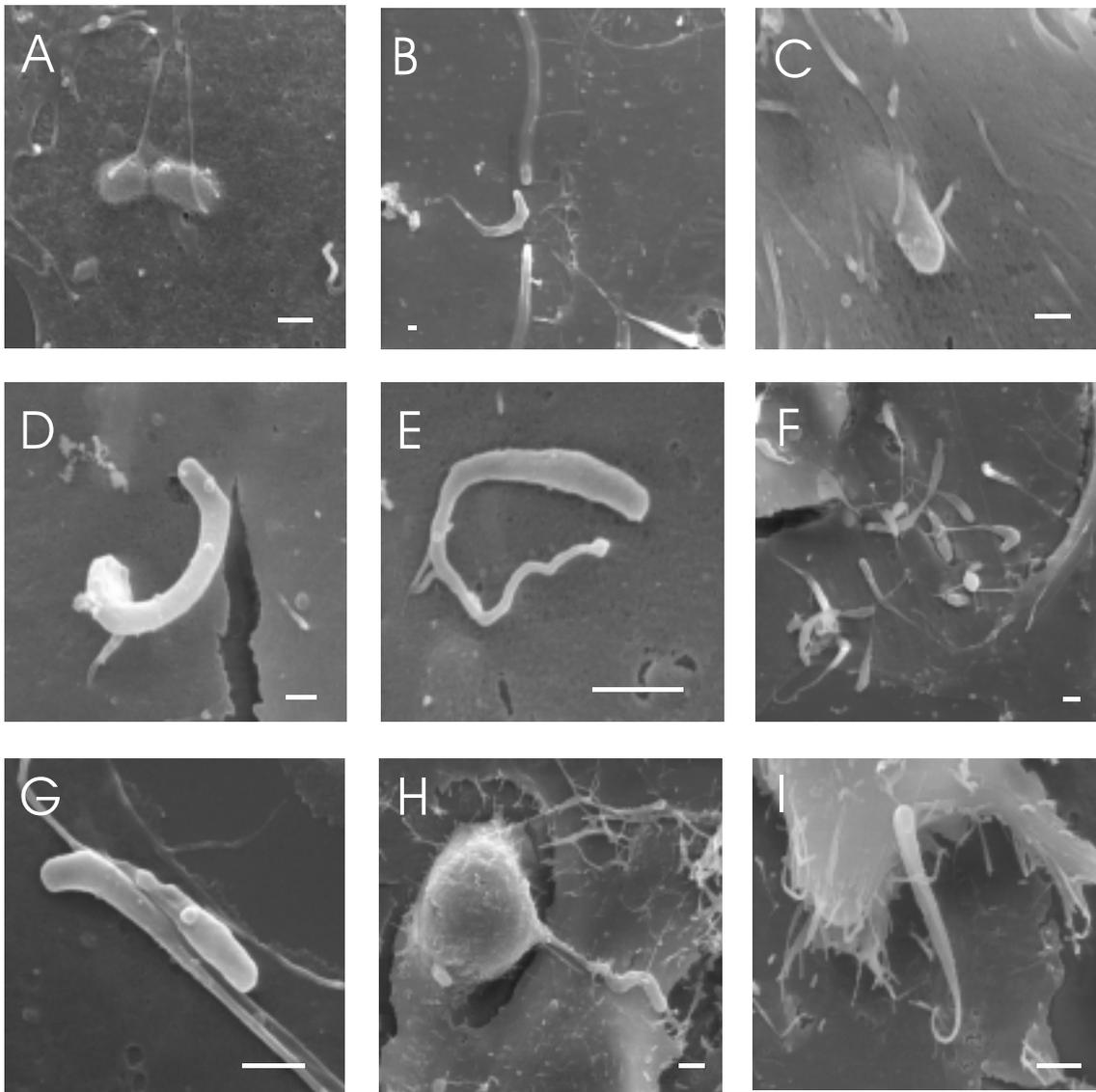


Abbildung 2.25:

REM von HBMEC, 4 h nach Infektion mit *L. monocytogenes* EGD. (A) Sich intrazellulär teilende und (B) bewegende Bakterien, sichtbar durch die Zellmembran. (C) Ein Bakterium induziert eine Membranausstülpung (Protrusion). Verschiedene Protrusions-Stadien (D-I). Die Balken repräsentieren 1 μm .

Bild F zeigt eine Übersicht eines typischen Ausschnitts eines mit *L. monocytogenes* EGD infizierten HBMEC-Monolayers 4 Stunden nach der Infektion. Alle sichtbaren Listerien befanden sich in Membranausstülpungen.

2.4 Einfluß einer Listerien-Infektion auf die Transkription einzelner Endothelzellgene

Um der Frage nachzugehen, ob eine *L. monocytogenes*-Infektion die Transkription einzelner Gene von Endothelzellen beeinflusst, wurde mittels RT-PCR die Transkription verschiedener Gene, die für Zytokine, Chemokine und Adhäsionsmoleküle kodieren, untersucht.

In allen Versuchen wurden Endothelzellen mit *L. monocytogenes* EGD infiziert (s. 5.2.5), aus dem Zell-Lysat die Gesamt-RNA isoliert (s. 5.3.1) und die eukaryotische RNA mittels reverser Transkriptase und Oligo-dT-Primern in cDNA umgeschrieben (s. 5.3.2). Unter Verwendung spezifischer Primer, die von den Zielgenen abgeleitet wurden, konnten mittels PCR (s. 5.3.3) Abschnitte aus den entsprechenden Genen amplifiziert werden. In der sich daran anschließenden Agarose-Gelelektrophorese wurden die Fragmente aufgetrennt und sichtbar gemacht (s. 5.3.4).

Es wurden immer zwei Zustände miteinander verglichen; die Menge bestimmter Transkripte in Zell-Lysaten aus infizierten Zellen (I) mit denen aus nicht-infizierten Zellen (NI). Bei unterschiedlich starken Banden desselben Produkts im Agarosegel kann davon ausgegangen werden, daß sich im PCR-Ansatz unterschiedliche Mengen der cDNA befanden, die mit den spezifischen Primern in der PCR-Reaktion amplifiziert wurden. Bei der RT-PCR ist ein solcher Unterschied nur dann möglich, wenn sich bereits die Mengen der entsprechenden mRNA im Lysat voneinander unterscheiden haben. Um auszuschließen, daß die Unterschiede auf unterschiedliche Ausbeuten bei der Isolation der Gesamt-mRNA beruhen, wurde in jedem Ansatz die Menge an β -Aktin-mRNA mitbestimmt. Nur wenn sich die Menge β -Aktin Transkript nicht unterscheidet, ist es legitim, bei unterschiedlich starken Banden anderer Transkripte in den zu vergleichenden Ansätzen auf eine durch die Infektion bedingte veränderte Transkription zu schließen. Es wird dabei angenommen, daß die Infektion keinen Einfluß auf die Transkription von β -Aktin hat. Die Versuche geben keine Auskunft darüber, ob die verstärkt transkribierten Gene auch wirklich translatiert werden.

HUVEC, die mit *L. monocytogenes* infiziert wurden (s. Abb. 2.26), wiesen 4 Stunden nach der Infektion eine verstärkte Transkription der Gene, die für IL-8 und IL-6 kodieren, im Vergleich zur nicht-infizierten Kontrolle auf. MCP-1- und VCAM-1-spezifische mRNAs konnten detektiert werden, befanden sich aber in gleichen Mengen in *L. monocytogenes*-infizierten und nicht-infizierten HUVEC. TNF- α -, IL-1 β - und ICAM-1-spezifische mRNAs konnten nicht nachgewiesen werden.

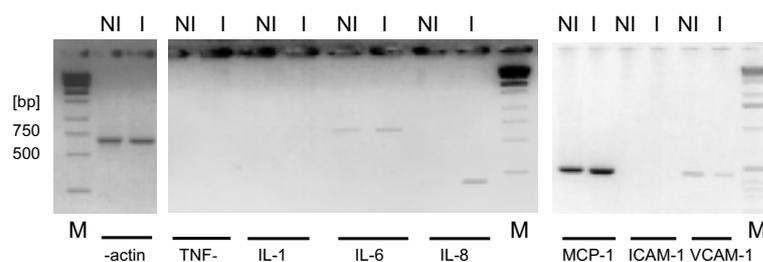


Abbildung 2.26:

Expression der mRNA in mit *L. monocytogenes* EGD infizierten HUVEC. 4 h nach der Infektion wurde Gesamt-RNA isoliert und die Transkripte mittels RT-PCR analysiert. MOI = 5, NI = nicht-infiziert, I = infiziert, M = Marker, β -actin = interne Kontrolle.

Mit einem IL-8-ELISA sollte herausgefunden werden, ob die festgestellte Induktion der IL-8-mRNA-Expression in mit *L. monocytogenes* EGD infizierten HUVEC zu einer vermehrten Freisetzung von IL-8 in den Zellüberstand führt. In Abbildung 2.27 wurden die Daten eines IL-8-ELISA mit den Ergebnissen einer RT-PCR auf IL-8 in einer Grafik zusammengefaßt. Die Menge an IL-8 im Überstand war 6 Stunden nach der Infektion von HUVEC mit *L. monocytogenes* EGD 8fach erhöht, im Vergleich zur IL-8 -Konzentration im Überstand nicht-infizierter HUVEC. Dies korrelierte mit einer deutlichen Zunahme

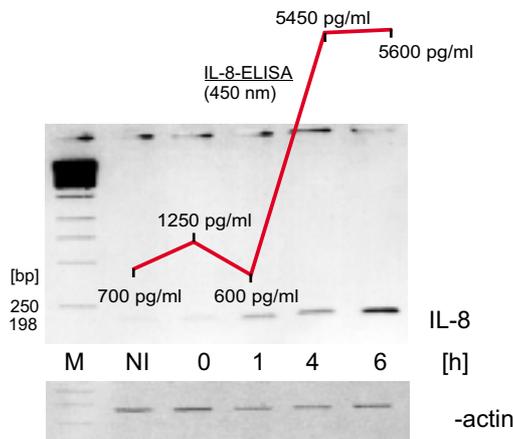


Abbildung 2.27:

Kinetik einer induzierten IL-8 mRNA-Expression in mit *L. monocytogenes* EGD-infizierten HUVEC. Die Daten eines IL-8-ELISA wurden mit den Ergebnissen einer IL-8-spezifischen RT-PCR in einer Grafik zusammengefaßt. Im IL-8-ELISA wurde die Menge an IL-8 im Zellüberstand von mit *L. monocytogenes* EGD infizierten HUVEC gemessen. Der Versuch wurde mit einem ELISA-Reader bei 450 nm ausgewertet und die IL-8-Konzentration im Zellüberstand in pg/ml berechnet. Die Ergebnisse aus dem IL-8-ELISA und der RT-PCR für die Zeitpunkte 0, 1, 4 und 6 h nach der Infektion (p.i.) von HUVEC mit *L. monocytogenes* EGD stammen aus demselben Infektionsexperiment und können deshalb direkt miteinander verglichen werden. M = Marker, NI = nicht-infiziert (neg. Kontrolle), β -actin = interne Kontrolle.

detektierbarer IL-8-spezifischer mRNA bis 6 Stunden nach der Infektion von HUVEC mit *L. monocytogenes* EGD. Schon 90 min nach Infektionsbeginn (0 h p.i.) befindet sich im Überstand infizierter HUVEC mehr IL-8 als im Überstand von nicht-infizierten HUVEC. Zu diesem Infektionszeitpunkt konnte keine verstärkte Expression von IL-8-spezifischer mRNA nachgewiesen werden.

Da HUVEC nur begrenzt zur Verfügung standen, wurden Transkriptionsstudien auch mit Zellen der Endothelfusionszelllinie EA.hy-926 durchgeführt. Diese Zell-Linie entstand durch Fusion von HUVEC mit epithelialen Lungenkarzinomzellen. Aufgrund ihrer Morphologie und der Expression einiger endothelzelltypischer Marker wird sie als endothelzellähnliche Zell-Linie bezeichnet (Edgell *et al.*, 1983). In EA.hy-926 konnte ebenfalls eine verstärkte IL-8-mRNA-Expression 4 Stunden nach einer Infektion mit *L. monocytogenes* EGD festgestellt werden (s. Abb. 2.28). IL-6-, ELAM-1- oder MCP-1-spezifische mRNAs waren nicht detektierbar.

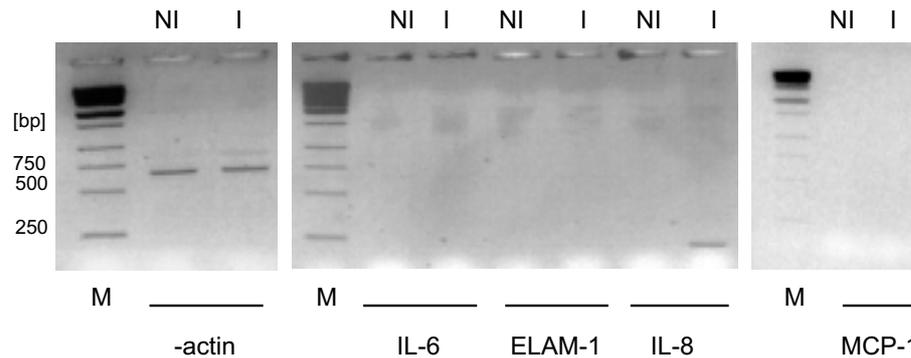


Abbildung 2.28:

Expression der mRNA in mit *L. monocytogenes* EGD infizierten EA.hy-926-Zellen. 4 h nach der Infektion wurde Gesamt-RNA isoliert und die Transkripte mittels RT-PCR analysiert. MOI = 5, NI = nicht-infiziert, I = infiziert, M = Marker, β -actin = interne Kontrolle (siehe Text), (ELAM-1 = E-Selektin).

Wurden hingegen EA.hy-926-Zellen mit den Überständen *L. monocytogenes*-infizierter P388₁-Makrophagen inkubiert (s. Abb. 2.29), kam es zu einer Induktion der mRNA-Expression von MCP-1, ICAM-1, IL-6 und IL-8. VCAM-1- und ELAM-1-spezifische mRNAs konnten jedoch weiterhin nicht nachgewiesen werden. Die Zellüberstände von

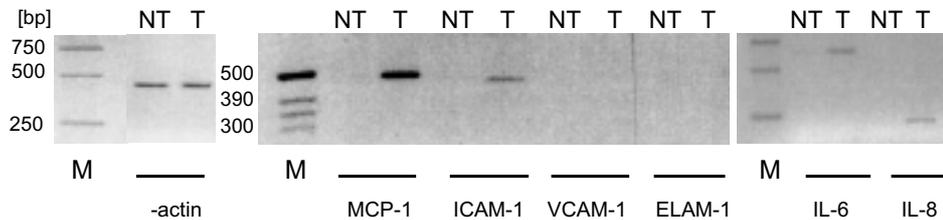


Abbildung 2.29:

Expression der mRNA von mit Medienüberständen inkubierten EA.hy-926-Zellen. P388D₁-Makrophagen wurden mit *L. monocytogenes* EGD mit einer MOI = 50 infiziert. Der Gentamycin (50 µg/ml) enthaltene Überstand dieser infizierten Makrophagen wurde 6 h nach der Infektion mit *L. monocytogenes* EGD sterilfiltriert und eingefroren. Die EA.hy-926-Zellen wurden 4 h mit diesem unverdünnten Überstand inkubiert - Gesamt-mRNA isoliert und die Transkripte mittels RT-PCR analysiert.

mit *L. monocytogenes* EGD infizierten P388₁-Makrophagen enthalten große Mengen an IL-1 α , TNF- α und IL-6 (Kuhn und Goebel, 1994).

2.5 Ein Zwei-Zell-*in-vitro*-Modell des *choroid plexus*

Im Verlauf einer Listeriose können Listerien ins Gehirn gelangen und dort Entzündungsreaktionen hervorrufen (s. 1.3.2). Trotz der Blut-Hirn- und Blut-Liquor-Schranken des Gehirns sind Listerien offenbar in der Lage, zumindest eine dieser Barrieren zu überwinden. In der Literatur wird häufig das Epithel des *choroid plexus* als erster Vermehrungsort der Listerien auf dem Weg ins Gehirn vorgeschlagen (Berche, 1995; Schlüter *et al.*, 1999). Haben Listerien das Plexusepithel erfolgreich infiziert, steht ihnen der Weg in den Liquor offen und nach der sich anschließenden Vermehrung im Liquor ist eine Infektion der Hirnhäute sehr wahrscheinlich (Schlüter *et al.*, 1999). Stark vereinfacht besteht der *choroid plexus* - vom Liquor aus gesehen - aus polarisierten, über Tight Junctions miteinander verbundenen Epithelzellen. Eine Basalmembran trennt die Epithelzellen von den darunterliegenden mikrovaskulären Endothelzellen der Gefäße ab. Die Endothelzellen weisen keine Tight Junctions auf und sind gefenstert. Die Barrierefunktion übernimmt daher das Plexusepithel (s. 1.2). *In vivo* gelangen die Listerien vermutlich aus dem Gefäßlumen durch das vaskuläre Endothel in das Plexusepithel und von dort weiter in den Liquor.

Kultiviert man Caco-2-Zellen auf einem Filter, so weist der nach 14 Tagen ausdifferenzierte Monolayer einen hohen elektrischen Widerstand auf. Dies ist besonders dann der Fall, wenn ein Subklon der Zell-Linie verwendet wird, dessen Zellen sich im ausdifferenzierten Zustand durch einen besonders dichten Bürstensaum auszeichnen (Peterson und Mooseker, 1992). Die in der vorliegenden Arbeit in Infektionsstudien verwendeten HBMEC bilden keine Tight Junctions aus (Kwang Sik Kim, persönliche Mitteilung) und erreichen auf einem Filter kultiviert auch keine hohen elektrischen Widerstände. Mit HBMEC und Caco-2-Zellen standen uns einfach kultivierbare Zell-Linien zur Verfügung, deren Eigenschaften in etwa denen des Plexusepithels und des darunterliegenden Endothels entsprechen. Indem Caco-2-Zellen auf der einen und HBMEC auf der anderen Seite eines Filters bis zur Konfluenz kultiviert wurden, wurde versucht, ein *in vitro*-Modell des *choroid plexus* zu etablieren. Die verwendeten Filter-Membranen haben einen Porendurchmesser von 3 µm, der den Durchtritt von Listerien zulässt. Derartige Bilayer wurden von der Endothelzelleseite mit *L. monocytogenes* EGD infiziert. Es sollte

untersucht werden, ob es den Bakterien im weiteren Verlauf der Infektion möglich ist, durch die Filterporen in die Epithelzellen zu gelangen. Gentamycin im Medium sollte nach der Infektion verhindern, daß durch Zell-Lyse frei gewordenen Listerien die darunterliegenden Epithelzellen direkt infizieren können.

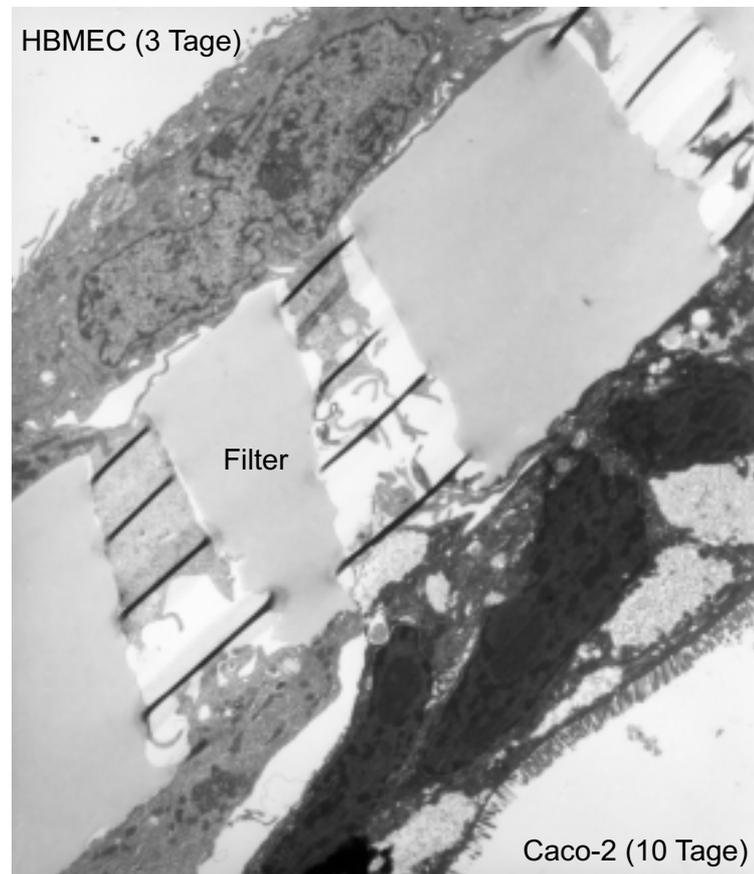


Abbildung 2.30:

TEM eines nicht-infizierten Bilayers auf Transwell-Filtern (Costar). Der Filter hat einen Porendurchmesser von $3\ \mu\text{m}$. Caco-2-Zellen wurden 10 Tage, HBMEC 3 Tage vor der Fixierung ausgesät. Die Ausbildung des Bürstensaumes bei den Caco-2-Zellen ist deutlich zu erkennen (unten).

Abbildung 2.30 zeigt einen solchen, von einer Membran getrennten Bilayer. Ein solches Zweizell-System weist einen elektrischen Widerstand von ca. $300\ \Omega\text{cm}^2$ auf. Die Caco-2-Zellen sind voll ausdifferenziert, was man an dem geschlossenen Bürstensaum erkennen kann. Beide Zelltypen haben, wie in Abbildung 2.30 gut zu sehen, die Möglichkeit, über die Filterporen miteinander in Kontakt zu treten. Die in diesem Präparat erkennbaren schwarzen Querstreifen sind Präparationsartefakte; an diesen Stellen hatte sich das Präparat, vermutlich beim Aufziehen auf das Kupfernetz (s. 5.5.2), gefaltet.

Neben der Ionendichte sollte zusätzlich die Durchlässigkeit der Bilayer für Partikel bestimmt werden, die in etwa der Größe eines Bakteriums entsprechen. Inkubierte man einen derartigen Bilayer auf der Endothelzelseite (oben) mit Medium, in dem sich fluoreszierende Latex-Kügelchen ($\text{Ø} = 0,2\ \mu\text{m}$ und $1\ \mu\text{m}$) befanden, konnten 4 Stunden nach Inkubationsbeginn im unteren Kompartiment keine Latex-Kügelchen nachgewiesen werden, was für die strukturelle Dichtigkeit des Systems spricht. In dem nun etablierten, stark vereinfachten Modell sollte eine Infektion des *choroid plexus* mit *L. monocytogenes* EGD

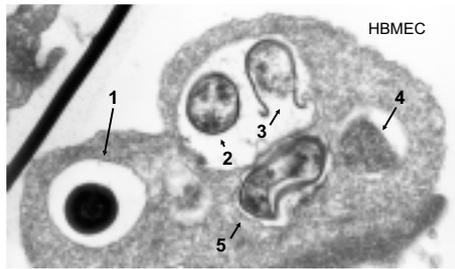


Abbildung 2.31:

L. monocytogenes EGD infizierte HBMEC. 3 h nach der Infektion, MOI = 50. (1) Membran eines Phagosoms, in dem sich ein intaktes Bakterium befindet. (2) Bakterium in Phagosom. (3) Bakterium in Phagosom - Bakterienzellwand bricht auf. (4) Lysosom. (5) Bakterium in Phagosom. Bakterien in (1-3) querschnittten, in (5) längsgeschnitten.

aus dem Blut simuliert werden. Da die Listerien *in vivo* dazu zuerst vaskuläres Endothel überwinden müssen, wurde der Bilayer im Modell ebenfalls von der Endothelzelle aus infiziert.

Die Abbildungen 2.31-2.33 zeigen Ausschnitte desselben Bilayers 3 Stunden nach der Infektion mit *L. monocytogenes* EGD. Wie im Bild 2.31 zu sehen, befanden sich 3 Stunden nach der Infektion intrazelluläre Listerien in HBMEC in Phagosomen. Pfeil (1) zeigt auf die Membran eines solchen Phagosoms, in dem sich ein querschnittenes Bakterium befindet. Im Gegensatz zu diesem vermutlich intakten Bakterium scheinen im benachbarten Phagosom beide Listerien (2 und 3) lysiert zu werden. Pfeil (3) zeigt auf ein Bakterium, dessen Zellwand aufbricht, wobei der Bakterieninhalt ins Phagosom entlassen wird. Das längsgeschnittene Listerium (5) hat seine typische Stäbchenform verloren und ist vermutlich auch in Degradation begriffen. Pfeil (4) zeigt auf ein Vesikel, bei dem es sich aufgrund der granulären Struktur um ein Lysosom handeln könnte.

Die Abbildung 2.32 zeigt einen größeren Ausschnitt des infizierten Bilayers, in dem HBMEC und Caco-2-Zellen zu erkennen sind. Listerien befinden sich in HBMEC (1), im Zwischenraum zwischen HBMEC und Caco-2-Zellen (2) und in Caco-2-Zellen (3). Das Listerium, welches sich zwischen den Zellschichten in der Filterpore befindet, ist offensichtlich extrazellulär. Es ist jedoch auch denkbar, daß es sich hierbei um einen Präparationsartefakt handelt und sich das Bakterium vor der Fixierung in einer Zelle befand. Auch in einer höheren Vergrößerung dieses Bildausschnitts ist nicht zu erkennen, ob die intrazellulären Listerien in der Caco-2-Zelle von Membranen umgeben sind oder nicht. Eine solche Beobachtung ist deshalb wichtig, da man daraus auf die Art der Aufnahme der Listerien in die Caco-2-Zellen schließen kann. Wären die Listerien von nur einer Membran umgeben, so spräche dies dafür, daß eine Phagozytose freier Listerien stattgefunden hat. Handelt es sich jedoch um eine Doppelmembran, ist es wahrscheinlich, daß die Zelle Bakterien phagozytiert hat, die sich in Protrusionen von HBMEC befanden. Die Bakterien wären so durch einen in der Literatur als „cell-to-cell spread“ bezeichneten Vorgang in die Caco-2-Zelle gelangt (Tilney und Portnoy, 1989). Die Tatsache, daß die infizierte Caco-2-Zelle der infizierten Endothelzelle direkt gegenüberliegt und sich in der Filterpore, die beide Zellen miteinander verbindet, ebenfalls ein Listerium befindet, macht es wahrscheinlich, daß die Listerien in diesem Beispiel von der infizierten Endothelzelle in die Caco-2-Zelle gelangt sind.

Neben diesem Einzelbeispiel spricht auch der während des Versuchs gemessenen elektrische Widerstand des Bilayers dafür, daß die Listerien die Endothelzellen invadieren müssen, um Zugang zu den Epithelzellen zu erhalten. Der elektrische Widerstand eines mit *L. monocytogenes* EGD infizierten Bilayers aus HBMEC und Caco-2-Zellen war 3 Stunden nach der Infektion ebenso hoch wie der eines nicht-infizierten Bilayers. Wären im Zeitraum des Infektionsversuchs Endothelzellen zerstört worden, hätte sich dies nega-

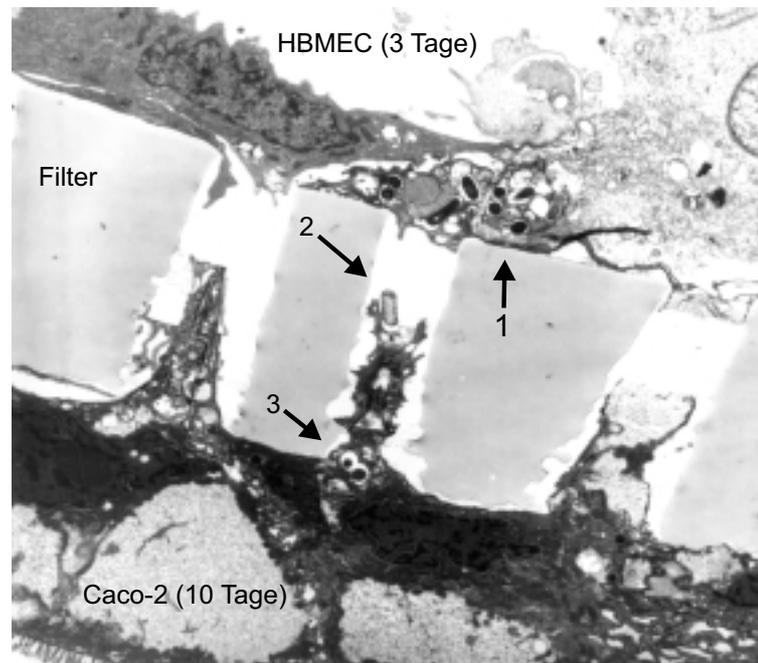


Abbildung 2.32:

Ein wie in Abbildung 2.30 gezeigter Bilayer wurde mit *L. monocytogenes* EGD infiziert. MOI = 50. Infiziert wurde von der Endothelseite (HBMEC), 90 min ohne Zentrifugation in RPMI als Infektionsmedium. Danach wurde 3x mit PBS gewaschen. Die Post-Infektionszeit von 3 h fand im jeweiligen Kulturmedium + 50 µg/ml Gentamycin statt. Anschließend wurde 2x mit PBS gewaschen und mit Karnovsky-Reagenz fixiert. Der Pfeil (1) deutet auf intrazelluläre Listerien in HBMEC. Pfeil (2) auf ein Bakterium zwischen HBMEC und Caco-2-Zellen. Pfeil (3) auf intrazelluläre Listerien in Caco-2-Zellen. Links unten: Bürstensaum von Caco-2-Zellen.

tiv auf die Ionendichtigkeit des Zweizell-Systems ausgewirkt. Auch bei einem möglichen parazellulären Durchtritt der Listerien zwischen den Endothelzellen hätte dies vermutlich eine Reduktion des elektrischen Widerstandes zur Folge gehabt. Somit ist es sehr unwahrscheinlich, daß Listerien während der Infektion direkten Zugang zu Caco-2-Zellen hatten.

In Abbildung 2.33 sind zwei Listerien zu erkennen, die sich wahrscheinlich frei im Zytoplasma einer Caco-2-Zelle befinden. Diese Listerien haben vermutlich zuerst HBMEC auf der anderen Seite des Filters invadiert und sind von dort aus durch die Filterporen in die abgebildete Caco-2-Zelle gelangt. Für diese Ausbreitung von der ursprünglich infizierten HBMEC in die Caco-2-Epithelzelle sind 4,5 Stunden offensichtlich ausreichend.

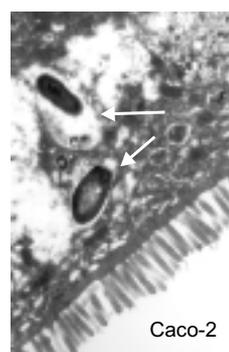


Abbildung 2.33:

L. monocytogenes EGD infizierte Caco-2-Zelle. 3 h nach der Infektion, MOI = 50. Pfeile zeigen auf Listerien, die sich frei im Zytoplasma einer Caco-2-Zelle befinden. Unten im Bild ist der charakteristische Bürstensaum deutlich zu erkennen.

3 Diskussion

L. monocytogenes ist ein Verursacher von ZNS-Erkrankungen beim Menschen (Burn, 1934) (s. 1.3.2). Da das ZNS normalerweise durch seine Blut-Hirn-Barrieren (s. 1.2) gegen Bakterien abgeschirmt ist, sind Listerien offenbar befähigt, mindestens eine dieser Barrieren zu überwinden. Alle drei bisher bekannten Barrieren des ZNS (Saunders *et al.*, 1999) haben eines gemeinsam: Um aus den Blutkapillaren in tiefere Regionen vordringen zu können, müssen die Listerien zuerst mikrovaskuläres Hirnendothel überwinden. In den ersten Infektionsmodellen, in denen Endothelzellen mit Listerien infiziert wurden, wurden primäre makrovaskuläre Nabelschnurendothelzellen (HUVEC) verwendet. Dabei zeigte sich, daß *L. monocytogenes* in der Lage ist, HUVEC zu invadieren, sich in diesen zu vermehren und auszubreiten (Drevets *et al.*, 1995; Greiffenberg *et al.*, 1997). Da sich makrovaskuläre Endothelzellen von mikrovaskulären Endothelzellen in vielerlei Hinsicht unterscheiden (s. 1.5), stellte sich die Frage, ob sich die mit HUVEC gewonnenen Ergebnisse auf HBMEC übertragen lassen. Aufgrund der Tatsache, daß primäre HBMEC nur durch ein sehr aufwendiges Verfahren aus Gehirngewebe isoliert werden können (Stins *et al.*, 1994) und nur wenig Ausgangsmaterial verfügbar ist, waren umfangreiche Versuche mit HBMEC über eine lange Zeit hinweg nicht möglich. Dies änderte sich jedoch, als es gelang, eine einfach zu kultivierende (HBMEC)-Zell-Linie zu etablieren (Stins *et al.*, 1997). In der vorliegenden Arbeit wurden die Wechselwirkungen von *L. monocytogenes* mit solchen durch Transfektion immortalisierten HBMEC untersucht.

3.1 Wichtige Faktoren für die Invasion von *L. monocytogenes* in Endothelzellen

Sieht man von zwei Ausnahmen ab (Wilson und Drevets, 1998; Greiffenberg *et al.*, 1997), wird in der Literatur InlA oder InlB für die Aufnahme von *L. monocytogenes* in Endothelzellen verantwortlich gemacht. Welches Internalin die Hauptrolle bei der Invasion von Listerien in Endothelzellen spielt, wurde lange Zeit kontrovers diskutiert. Die Abbildung 3.1 gibt einen Überblick über die in Invasionsexperimenten verwendeten Mutanten und zeigt zugleich deren Fähigkeit bzw. Unfähigkeit, HUVEC bzw. HBMEC zu invadieren. Nahezu alle denkbaren Abhängigkeiten wurden publiziert:

Die Aufnahme von *L. monocytogenes* in HBMEC wurde sowohl als von InlB abhängig (Greiffenberg *et al.*, 1998) als auch von InlA unabhängig beschrieben (Wilson und Drevets, 1998). Ebenso verhält es sich mit der Invasion von *L. monocytogenes* in HUVEC. In den Experimenten der vorliegenden Arbeit konnte nur eine leicht verminderte Invasivität der $\Delta inlB$ -Mutante im Vergleich zum Wildtyp in HUVEC festgestellt werden (s. Abb. 2.18 und 2.21). Anders bei den Ergebnissen von Parida *et al.*, 1998, dessen $\Delta inlB$ -Mutante nur noch eine Restinvasivität in HUVEC von 8 % im Vergleich zum

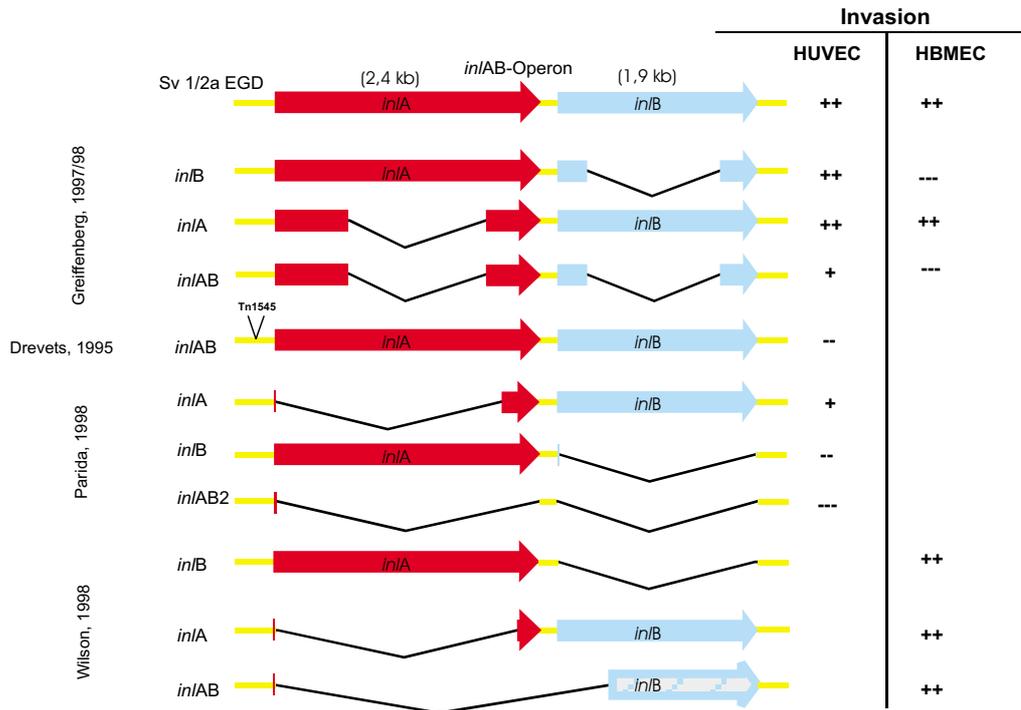


Abbildung 3.1:

Übersicht über die wichtigsten, in der Literatur beschriebenen und in Invasionsexperimenten in Zusammenhang mit Endothelzellen verwendeten Internalinmutanten von *L. monocytogenes* Sv 1/2 EGD. Der Ausgangsstamm für die Tn1545-Transposonmutante ist *L. monocytogenes* EGD-SmR (Gaillard *et al.*, 1986). Hierbei handelt es sich um eine Streptomycin-resistente Spontanmutante von *L. monocytogenes* NCTC 7973. Die Namen (links) ordnen die Mutanten den entsprechenden Veröffentlichungen zu. Rechts ist die Auswirkung der Mutation auf die Invasion in HUVEC und HBMEC dargestellt wobei + = invasiv und - = nicht invasiv bedeutet. Tn1545 = Insertionsort des gleichnamigen Transposons

Wildtyp aufwies. In einer Arbeit von Drevets *et al.*, 1995, wird sogar InlA für die Aufnahme von *L. monocytogenes* in HUVEC verantwortlich gemacht. Wie kommen diese Abweichungen zustande?

Die in Drevets *et al.*, 1995 beschriebenen Invasionsversuche wurden mit einer Transposon-Insertionsmutante durchgeführt, die vermutlich weder InlA noch InlB exprimiert. Aus der bloßen Tatsache, daß diese Mutante nicht in der Lage ist, HUVEC zu invadieren, kann noch nicht geschlossen werden, daß die Invasion am Fehlen von InlA scheiterte. Daß InlA die Hauptrolle bei der Invasion spielt, wurde daraus geschlossen, daß ein monoklonaler Anti-InlA-Antikörper die Invasion des Wildtyps in HUVEC blockierte. Unterstellt man, daß sich der Antikörper gegen die leucinreichen Wiederholungssequenzen im N-terminalen Bereich von InlA richtet, ist eine Kreuzreaktion mit InlB, welches ebenfalls derartige Wiederholungssequenzen aufweist, nicht auszuschließen. Eine Hemmung der Invasion von *L. monocytogenes* in HUVEC durch einen solchen kreuzreagierenden Antikörper wäre damit kein Beweis dafür, daß InlA für die Aufnahme der Listerien in HUVEC verantwortlich ist. In der Arbeit von Parida *et al.*, 1998, wird InlB für die Invasion von *L. monocytogenes* in HUVEC verantwortlich gemacht. Wie ebenso aus der Arbeit hervorgeht, liefert auch InlA einen geringen Beitrag zur Aufnahme von *L. monocytogenes* in HUVEC. Die Invasivität einer $\Delta inlAB$ -Doppelmutante von *L. monocytogenes* in HUVEC liegt deutlich unter der von *L. monocytogenes* $\Delta inlB$. Diese Ergebnisse aus

Parida *et al.*, 1998 können durch die vorliegende Arbeit nur in der Tendenz bestätigt werden. Vergleicht man die Daten aus Parida *et al.*, 1998 mit denen aus der vorliegenden Arbeit (s. Abb. 2.18; Greiffenberg *et al.*, 1997), wird deutlich, daß die in dieser Arbeit festgestellte Restinvasivität von *L. monocytogenes* $\Delta inlB$ im Vergleich zum Wildtyp in HUVEC deutlich über der in Parida *et al.*, 1998 beschriebenen liegt.

Es stellt sich die Frage, wie diese Abweichung zustande kommt. Geht man davon aus, daß sich die verwendeten $\Delta inlB$ -Mutanten nicht maßgeblich voneinander unterscheiden und auch die Zellen vergleichbar sind, könnte die Abweichung auf Unterschiede in der Versuchsdurchführung zurückzuführen sein. Tatsächlich unterscheiden sich die Infektionsbedingungen hinsichtlich des Infektionsmediums, der MOI, der Infektionsdauer sowie der Inkubationsbedingungen während der Infektion. Wie in Abbildung 2.20 und 2.21 ersichtlich, wirken sich derartige methodische Unterschiede deutlich auf die Invasivität von *L. monocytogenes* in HUVEC aus. Befinden sich die Listerien während der Infektion in Medium, welches 10 % Humanserum enthält, so erhöht dies die Invasivität von *L. monocytogenes* $\Delta inlB$ in HUVEC beträchtlich (s. Abb. 2.21). Eine solche Erhöhung der Invasionsrate in HUVEC durch Humanserum ist beim Wildtyp nicht feststellbar (s. Abb. 2.20). In den Invasionsexperimenten, die der Abbildung 2.18 zugrunde liegen, fand die Infektion in Medium statt, welches 20 % Humanserum enthielt. Es ist denkbar, daß im Infektionsmedium vorhandenes Humanserum, welches sich nicht gleichermaßen auf die Invasivität des Wildtyps und der $\Delta inlB$ -Mutante in HUVEC auswirkt, dazu beiträgt, daß die Invasionsrate der $\Delta inlB$ -Mutante fast der des Wildtyps entspricht.

Um diese Vermutung zu verifizieren, wurden weitere Invasionsexperimente mit HUVEC durchgeführt: Wie in Abbildung 2.21 ersichtlich, beträgt die Invasionsrate von *L. monocytogenes* $\Delta inlB$ in HUVEC nur noch ca. 50 % im Vergleich zu *L. monocytogenes* EGD, wenn auf Humanserum im Infektionsmedium und Zentrifugation der Bakterien auf die Zellen verzichtet wird. Unter Umständen ließe sich die Invasionsrate von *L. monocytogenes* $\Delta inlB$ in HUVEC im Vergleich zu der des Wildtyps durch zusätzliche Veränderungen der Infektionsbedingungen noch weiter reduzieren. Eine höhere MOI und längere Infektionszeiten könnten die Invasivitätsunterschiede zwischen *L. monocytogenes* $\Delta inlB$ und dem Wildtyp weiter vergrößern.

Schließt man Unterschiede der in den Invasionsexperimenten verwendeten Mutanten nicht aus, wäre die Unstimmigkeit der Invasionsdaten hinsichtlich der Invasion der $\Delta inlB$ -Mutante in HUVEC auch folgendermaßen zu erklären: Wie in Abbildung 3.1 zu erkennen, sind bei der in dieser Arbeit verwendeten „in frame“-*inlB*-Deletionsmutante nur 65 % des Gens deletiert. Der verbleibende Genabschnitt kodiert noch für einen LRR und ein GW-Motif (s. 1.1.1). Gesetzt den Fall, es würde ein verkürztes *InlB* exprimiert, exportiert und mit der Bakterienzellwand assoziiert, könnte dieses vielleicht zu einer geringen Restinvasivität in HUVEC führen. Unklar bleibt jedoch, warum ein verkürztes *inlB* für die Aufnahme von *L. monocytogenes* in HUVEC ausreicht, es bei HBMEC jedoch keine Invasion ermöglicht.

Die Regulation des *inlB*-Gens ist noch weitgehend ungeklärt: Bislang war man der Meinung, daß das *inlAB*-Operon derart PrfA-abhängig reguliert wird, daß eine PrfA-Induktion die Menge von *InlA*-Transkript vermindert (Bohne *et al.*, 1996). Da davon ausgegangen wurde, daß das *inlAB*-Operon primär bicistronisch transkribiert wird, würde sich, PrfA-induziert, somit auch die Menge von *InlB* reduzieren. 51 bp stromaufwärts von *inlB* befindet sich jedoch ein zusätzlicher, in seiner Regulation unbekannter Promotor, der eine von *inlA* unabhängige Transkription von *inlB* zulassen könnte (Lingnau *et al.*, 1995). Tatsächlich konnte im Überstand von *L. monocytogenes* nach einem sogenannten „MEM-

shift“, der PrfA induziert, mehr InlB nachgewiesen werden als in der Kontrolle in BHI (Engelbrecht und Goebel, nicht veröffentlicht). Diese Daten stützen die Annahme einer positiven Regulation von *inlB* durch PrfA. Wie in Abbildung 2.8 dargestellt, ist die Invasionsrate von *L. monocytogenes* in HBMEC vierfach erhöht, wenn in MEM statt in RPMI infiziert wird. Hier könnte MEM in *L. monocytogenes* die Expression von *prfA* induziert haben, wodurch sich entsprechend dem oben vorgeschlagenen Mechanismus die Menge an InlB auf der Listerienoberfläche erhöht. Geht man davon aus, daß sich infolge einer vermehrten *inlB*-Expression auch die Invasivität von *L. monocytogenes* in HBMEC erhöht, ließe sich die hohe Invasionsrate in MEM durch eine PrfA-induzierte *inlB*-Expression erklären. Vor diesem Hintergrund wird ebenfalls plausibel, warum in den in dieser Arbeit durchgeführten Invasionsexperimenten mit HUVEC nur *L. monocytogenes* $\Delta prfA$ eine deutlich geringere Invasivität in HUVEC im Vergleich zum Wildtyp aufwies (s. Abb. 2.18). *L. monocytogenes* $\Delta inlB$ könnte, PrfA-induziert, ein funktionales *inlB* exprimieren und so HUVEC invadieren. Damit wäre in diesem speziellen Fall nur die $\Delta prfA$ -Mutante unfähig, ein funktionales InlB zu exprimieren. Als Folge erweist sich diese Mutante in HUVEC als nur gering invasiv. Geht man von einer positiven Regulation von *inlB* durch PrfA aus und nimmt man weiter an, daß Zellwand-assoziiertes InlB für die Invasion von *L. monocytogenes* in Endothelzellen von Bedeutung ist, müßten sich Listerienstämme, die viel PrfA exprimieren, in Endothelzellen als besonders invasiv erweisen. Indem die Invasionsrate des hyperhämolytischen Stammes *L. monocytogenes* NCTC 7973 in HUVEC und HBMEC bestimmt wurde, sollte überprüft werden, ob die in diesem Stamm vermehrte Expression PrfA-abhängiger Gene dessen Invasivität erhöht.

Während *L. monocytogenes* NCTC 7973 HBMEC 4,3mal besser invadierte, konnte in HUVEC keine höhere Invasivität dieses Stammes festgestellt werden. Da die absolute Invasionsrate von *L. monocytogenes* EGD in HUVEC oft größer als 12 % ist, erscheint es denkbar, daß unter diesen Bedingungen auch eine vermehrte Expression von *inlB* die Aufnahme in HUVEC nicht weiter zu steigern vermag. Geht man bei der Invasion von *L. monocytogenes* in Wirtszellen von einer rezeptorvermittelten Invasion aus, könnten bei der Invasion von *L. monocytogenes* in HUVEC bei einer Invasionsrate von 12 % und mehr bereits alle Bindungsstellen auf Endothelzelleseite mit Liganden (hier *inlB*) belegt sein. In diesem Fall würde eine vermehrte Expression der Liganden auf Listerienseite die Invasivität nicht weiter erhöhen. Die Invasionsraten von *L. monocytogenes* EGD in HBMEC sind mit maximal 6 % deutlich geringer. Es erscheint möglich, daß sich in diesem Fall die Invasionsrate von *L. monocytogenes* durch eine verstärkte Expression PrfA-abhängiger Gene, und somit auch von *inlB*, erhöhen ließe.

Faßt man alle Daten zusammen und berücksichtigt auch die noch nicht veröffentlichten Ergebnisse aus der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. P. Cossart, die ebenfalls eine von InlB abhängige Invasion von *L. monocytogenes* in HUVEC feststellen konnte, so kann man postulieren, daß InlB bei der Invasion von *L. monocytogenes* in makro- und mikrovaskulären Endothelzellen eine entscheidende Rolle spielt.

Warum hingegen die von Wilson und Drevets, 1998 in Invasionsstudien verwendeten mikrovaskulären Hirnendothelzellen von *L. monocytogenes* $\Delta inlB$ ebensogut invadiert werden wie vom Wildtyp, ist noch ungeklärt. In der dort verwendeten $\Delta inlB$ -Mutante ist das *inlB*-Gen vollständig deletiert (s. Abb. 3.1). In der Arbeit von Wilson und Drevets, 1998 wurden HBMEC verwendet, die zusammen mit einem speziellen Kulturmedium (CS-C 4Z0-500) der Firma Cell Systems (Kirkland, WA) bezogen wurden. Denkbar ist, daß Bestandteile des Mediums oder die Zellen selbst eine von InlB unabhängige Invasion von *L. monocytogenes* in diese HBMEC begünstigen.

Vergleicht man die Restinvasivität von *L. monocytogenes* ΔinB in HUVEC mit der in HBMEC, ergibt sich ein beachtlicher Unterschied: Beträgt die Restinvasivität der Mutante im Vergleich zum Wildtyp in HUVEC noch 8 % der eingesetzten Listerien (Parida *et al.*, 1998), können in Invasionsexperimenten mit HBMEC nur 0,4 % der eingesetzten Listerien als invasiv bezeichnet werden (Greiffenberg *et al.*, 1998). Allein aus diesen Daten könnte man schließen, daß es in HUVEC zu einer geringen, von InlB unabhängigen Invasion kommt, in HBMEC jedoch nicht. Einen weiteren Hinweis zur Untermauerung dieser These lieferten rasterelektronenmikroskopische Studien infizierter HBMEC. Da diese Form der Mikroskopie nur eine Betrachtung der Zelloberfläche zuläßt, müßte man annehmen, daß sich mit ihr keine Aussagen über intrazelluläre Listerien treffen lassen. Wie in Abbildung 2.25 im Bild (A) jedoch erkennbar ist, sind die fixierten Zellen derart flach, daß selbst intrazelluläre Bakterien durch die Zellwand hindurch gesehen werden können. Darüber hinaus befindet sich die Mehrzahl intrazellulärer Listerien ca. 4 Stunden nach der Infektion in Membranausstülpungen (Bild F), die sich sehr deutlich von der Zelloberfläche abheben. Wäre in HBMEC eine von InlB unabhängige Invasion möglich, müßten rasterelektronenmikroskopisch intrazelluläre Bakterien bzw. Bakterien in Protrusionen sichtbar sein. Die mit *L. monocytogenes* ΔinB infizierten HBMEC-Monolayer wurden ca. 4 Stunden nach der Infektion rasterelektronenmikroskopisch auf intrazelluläre Listerien hin untersucht und bis auf einzelne adhärenente Bakterien waren in keinem Fall vermeindlich intrazelluläre Bakterien oder Ausstülpungen erkennbar. Auch aus den Invasionsexperimenten geht klar hervor, daß *L. monocytogenes* ΔinB HBMEC nicht invadieren kann (s. Abb. 2.9).

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß *L. monocytogenes* ΔinB in HUVEC gering und in HBMEC gar nicht invasiv ist. Anhanddessen konnte zum ersten Mal gezeigt werden, daß ein bestimmtes Internalin für die Aufnahme in einen Zelltyp essentiell ist.

L. monocytogenes $\Delta inIGHE$, eine Mutante, in der die Gene für die Internaline G, H und E deletiert sind, weist eine 3mal höhere Invasivität in HBMEC auf als der Wildtyp. Für die Invasion von *L. monocytogenes* in eukaryontische Zellen werden, je nach Wirtszell-Typ unterschiedliche Internaline benötigt (Cossart, 1998). Es erscheint möglich, daß sich im Zeitpunkt der Infektion auf *L. monocytogenes* neben dem für die Invasion in HBMEC essentiellen InlB noch weitere Internaline befinden. Da aber vermutlich nur InlB für die Invasion in HBMEC erforderlich ist, könnte sich die Anwesenheit zusätzlicher Internaline aus sterischen Gründen negativ auf die Invasivität auswirken. Ohne eine derartige sterische Behinderung könnte das für die Invasion spezifische Internalin besser mit der Wirtszelloberfläche interagieren. Die Invasionsrate würde sich erhöhen. Eine Mutante, in der nur das *inIG*-Gen deletiert ist, verfügt jedoch nur noch über 8 % der Invasivität des Wildtyps in HBMEC. Man könnte nun postulieren, daß sich die Internaline H und E negativ auf die Invasivität auswirken, das Internalin G hingegen die Invasion von *L. monocytogenes* in HBMEC fördert. Diese Hypothese würde bestätigt, wenn eine *L. monocytogenes*-Mutante, der nur die Gene für die Internaline H und E fehlen, in HBMEC deutlich invasiver wäre als die $\Delta inIGHE$ -Mutante. Eine derartige $\Delta inIHE$ -Mutante war aber zum Zeitpunkt der Versuche nicht verfügbar. Bei Internalin G kann es sich um kein eigenständiges Invasin handeln, da die ΔinB -Mutante, die ja noch *inIG* exprimiert, in HBMEC nicht invasiv ist.

Es scheint nicht ausgeschlossen, daß Internaline auf der Bakterienoberfläche dimerisieren müssen, um eine Invasion in eukaryontische Zellen zu ermöglichen. Hierbei könnte der bevorzugte Bindungspartner für InlB das InlG sein. Fehlt InlG, könnte die Internalisation dennoch stattfinden, wenn InlB mit einem anderen Internalin dimerisierte. Ein solches Heterodimer könnte zwar noch die Aufnahme in HBMEC vermitteln, allerdings

mit geringerer Invasivität. Es besteht auch die Möglichkeit, daß InlB als Monomer oder Homodimer nur eine geringe Invasivität in HBMEC aufweist.

Die Ergebnisse der Invasionsexperimente mit Internalinmutanten und HBMEC lassen sich wiederum nicht auf die makrovaskulären HUVEC übertragen. Während *L. monocytogenes* $\Delta inlGHE$ in HBMEC eine größere Invasivität aufweist als der Wildtyp, ist die Invasivität dieser Mutante in HUVEC um 30 % vermindert. InlC scheint bei der Invasion von *L. monocytogenes* in HBMEC keine Rolle zu spielen (s. Abb. 2.9). In HUVEC jedoch ergibt sich eine signifikante Reduktion der Invasivität von *L. monocytogenes* $\Delta inlC$ (s. Abb. 2.18).

Ein weiteres Beispiel für unterschiedliche Eigenschaften von HUVEC und HBMEC hinsichtlich ihrer Fähigkeit, von Listerien invadiert zu werden, liefert die Rolle von ActA bei der Invasion. Das ebenfalls auf der Bakterienoberfläche lokalisierte Protein wurde bereits mit der Invasion von *L. monocytogenes* in Säugerzellen in Verbindung gebracht (Alvarez-Domínguez *et al.*, 1997). Der Rezeptor für ActA soll hierbei HSPG (Heparan Sulfat Proteoglykan) sein. ActA scheint an der Invasion von *L. monocytogenes* in HUVEC nicht beteiligt zu sein (s. Abb. 2.18). HBMEC hingegen invadiert eine $\Delta actA$ -Mutante 5mal schlechter als der Wildtyp. Da HSPG auf HUVEC bereits nachgewiesen wurde (Soeda *et al.*, 1995), könnten auch andere Endothelzellen HSPG auf ihrer Oberfläche exprimieren. Die unterschiedlichen Invasionsraten der $\Delta actA$ -Mutante in HUVEC und HBMEC könnten auf eine unterschiedlich starke Expression von HSPG auf diesen Endothelzellen zurückzuführen sein.

Sowohl aus der vorliegenden Arbeit (s. Abb. 2.10) als auch aus der Literatur (Wilson und Drevets, 1998; Greiffenberg *et al.*, 2000) geht hervor, daß *L. monocytogenes* $\Delta inlB$ ebensogut an HBMEC adhären kann wie der Wildtyp. Es scheint somit eine von InlB unabhängige Adhäsion von *L. monocytogenes* an HBMEC zu existieren. Im Rahmen einer Transposonmutagenese in *L. monocytogenes* $\Delta inlAB$ konnte eine Transposon-Insertionsmutante (G48) isoliert werden, die eine stark verminderte Adhäsion an SK-MEL-28-Zellen im Vergleich zum Ausgangsstamm zeigt (Milohanic *et al.*, 2000). Zuvor konnte in der Arbeit gezeigt werden, daß *L. monocytogenes* $\Delta inlAB$ ebensogut an SK-MEL-28-Zellen adhären kann wie der Wildtyp *L. monocytogenes* EGD. Dies ist ein weiteres Beispiel dafür, daß auch ohne die für die Invasion wichtigen Internaline InlA und InlB eine Adhärenz an eukaryontische Zellen möglich ist. In der Mutante G48 fand eine Transposon-Insertion stromaufwärts vom *ami*-Gen statt. Das *ami* Genprodukt ist ein Autolysin mit einem charakteristischen C-terminalen GW-Ankermotiv, ähnlich dem von InlB. Obwohl das Transposon nicht unmittelbar in *ami* inseriert, kann G48 kein *ami* exprimieren. Die Transposon-Insertion scheint deshalb in einem für die Expression von *ami* wichtigen Bereich stattgefunden zu haben. Neben *iap* ist *ami* das zweite Gen, welches für ein Autolysin in *L. monocytogenes* kodiert, das mit der Invasion bzw. Adhäsion von *L. monocytogenes* in bzw. an eukaryontische Zellen in Verbindung gebracht wird.

Die apathogene, nicht-invasive Art *L. innocua* ist ebenfalls in der Lage, an HBMEC zu binden (s. Abb. 2.5. J-L). Da bisher in *L. innocua* keine Internaline sicher nachgewiesen werden konnten, könnten hier auch listerientypisches p60 oder Lipoteichonsäuren zur Adhäsion beitragen.

Zur Zeit steht keine Deletionsmutante von *L. monocytogenes* zur Verfügung, in der alle Internaline deletiert sind. Es ist deshalb schwierig, den Stellenwert, den Internaline bei der Bindung und Invasion von *L. monocytogenes* an bzw. in Endothelzellen spielen, richtig einzuordnen. Die Konstruktion einer solchen Mutante ist zudem erst dann möglich, wenn das gesamte Listeriengenom sequenziert und alle Gene, die für Internaline kodieren,

bekannt sind.

3.2 Mechanismus der Invasion

Wenig ist bislang über die Mechanismen bekannt, die es *L. monocytogenes* ermöglichen, eukaryontische Zellen zu invadieren. Einigkeit besteht in der Literatur lediglich darüber, daß für die Aufnahme von *L. monocytogenes* in Wirtszellen Internaline notwendig sind. Von den insgesamt neun bisher bekannten Internalinen von *L. monocytogenes* (Engelbrecht *et al.*, 1998b) konnten nur zwei, InlA und InlB, eindeutig mit der Invasion in Verbindung gebracht werden (Cossart, 1998). Während Epithelzellen von *L. monocytogenes* InlA-abhängig invadiert werden, ist für die Aufnahme von Listerien in HeLa-, Vero-, CHO- und Endothelzellen InlB notwendig (s. 1.1.1). Die Funktion der übrigen Internaline ist noch weitgehend ungeklärt. Auch über die Liganden, die mit Internalinen in Wechselwirkung treten, weiß man wenig. Nur von InlA ist bekannt, daß es an humanes E-Cadherin bindet (Mengaud *et al.*, 1996b). Im Folgenden wird versucht, mit den aus der vorliegenden Arbeit gewonnenen Erkenntnissen den Verlauf einer Infektion von HBMEC mit *L. monocytogenes* zu beschreiben.

Die Adhäsion von *L. monocytogenes* an Wirtszellen ist vermutlich eine Voraussetzung der sich anschließenden Invasion. Wie Experimente aus dieser Arbeit zeigen, wird InlB, welches für die Invasion in HBMEC erforderlich ist, für die Adhäsion an HBMEC nicht benötigt (Greiffenberg *et al.*, 2000). Dies läßt den Schluß zu, daß Adhäsion und Invasion nicht von denselben Strukturen vermittelt werden. Da auch *L. innocua* an HBMEC binden kann, ist diese nicht-invasive Art ebenfalls zur Zytoadhärenz fähig.

Wie in Parida *et al.*, 1998 beschrieben, werden an HUVEC gebundene *L. monocytogenes* bei der Invasion von der Zellmembran „umflossen“, was dem auch für andere Zell-Typen beschriebenen „Zipper-Mechanismus“ entspricht (Mengaud *et al.*, 1996b; Isberg und Nhieu, 1994). Der Mechanismus, der zur Aufnahme von Listerien in HBMEC führt, ist noch unbekannt. Aus den Ergebnissen der rasterelektronenmikroskopischen Studien (s. Abb. 2.5) geht hervor, daß für die Bindung von *L. monocytogenes* an HBMEC Mikrovilli auf der Zelloberfläche verantwortlich sein könnten. In nahezu allen Fällen, in denen adhärente wildtypische Listerien auf der Zelloberfläche erkennbar waren, waren diese stets mit Mikrovilli assoziiert. Wie aus den Aufnahmen B, C, D, und L in Abbildung 2.5 ersichtlich, scheinen die Listerien dabei förmlich von den Mikrovilli umschlungen und damit festgehalten zu werden. Die Aufnahme F, die ein intrazelluläres Listerium zeigt, macht deutlich, daß *L. monocytogenes* EGD in der Lage ist, innerhalb von 35 min HBMEC zu invadieren. Als möglicher Aufnahmemechanismus sind zwei Formen denkbar: (1) Die an die Listerien gebundenen Mikrovilli (Bild D) könnten auf den Bakterien flächig werden, verschmelzen, und so letztlich das Bakterium aufnehmen. (2) Die Mikrovilli könnten nur für die Bindung der Listerien an die HBMEC verantwortlich sein und die Aufnahme würde dann ähnlich, wie in Parida *et al.*, 1998 beschrieben, erfolgen. Die das Bakterium an der Basis umfassenden Membranstrukturen in Bild E könnten den Beginn einer Invasion nach einem solchen „Zipper-Mechanismus“ wiedergeben.

Nicht alle HBMEC eines Monolayers verfügen über gleich viele Mikrovilli auf der Zelloberfläche. Besonders abgekugelte HBMEC sind über und über mit Mikrovilli bedeckt. In Abbildung 2.4 ist im Bild A eine solche stark abgekugelte Zelle zu sehen. Wenn Listerien bevorzugt an Mikrovilli auf der Oberfläche von HBMEC binden und diese Bindung die Invasion einleitet, sollten Zellen, die viele Mikrovilli ausbilden, stärker infizierbar sein als solche mit wenig Mikrovilli. Wie in Abbildung 2.24 in den Bildern A-C zu sehen,

sind beide Infektionsfoci mit solchen Regionen kolokalisiert, in denen besonders viele abgekugelte Zellen vorkommen. Diese Zellen, die vermutlich über viele Mikrovilli verfügen, könnten von den Listerien bevorzugt invadiert worden sein. Wie gezeigt werden konnte (Demuth *et al.*, 1994), verstärkt das von Listerien intrazellulär sezernierte LLO in 3T6- und L2-Zellen deren Proliferation. Die abgekugelten Zellen in den Infektionsfoci könnten auch erst dadurch entstanden sein, daß infizierte HBMEC durch LLO zur Teilung angeregt wurden.

Wie Invasionsexperimente aus dieser Arbeit zeigen, ist für die Invasion von *L. monocytogenes* InlB essentiell. Es kann davon ausgegangen werden, daß durch die Bindung von InlB an einen oder mehrere Rezeptoren auf HBMEC der eigentliche Invasionsprozeß eingeleitet wird. Wie erst jüngst bekannt wurde (P. Cossart, persönliche Mitteilung), konnte als Ligand für InlB auf zellulärer Seite der C1q-Rezeptor (C1q-R) zusammen mit einem noch unbekanntem Corezeptor verantwortlich gemacht werden. Röntgenstrukturanalysen von InlB geben einen Hinweis darauf, daß sich im N-Terminalen-Bereich des Proteins zwei Ca^{2+} -Bindungsstellen befinden (Cossart, persönliche Mitteilung). Da EDTA die Bindung von InlB an HUVEC inhibiert (Parida *et al.*, 1998), könnten zweiwertige Ionen für die Wechselwirkung zwischen InlB und seinem Rezeptor notwendig sein. Weil C1q-R von makrovaskulären und mikrovaskulären Endothelzellen exprimiert wird (Andrews *et al.*, 1981; Guo *et al.*, 1999), ist es denkbar, daß auch die in der vorliegenden Arbeit verwendeten HBMEC über diesen Komplementrezeptor verfügen. C1q-Rezeptoren werden aber auch von Zellen exprimiert, die von *L. monocytogenes* InlB-unabhängig invadiert werden. Wie von Bordin *et al.*, 1992 beschrieben, verfügen auch Epithelzellen über C1q-Rezeptoren. Mit C1q-R allein läßt sich die InlB-abhängige Invasion von *L. monocytogenes* in Zellen somit nicht erklären. Es wäre aber denkbar, daß nur solche Zellen von *L. monocytogenes* InlB-abhängig invadiert werden, die C1q-R zusammen mit seinem Corezeptor exprimieren.

Wenn Listerien mit InlB an C1q-Rezeptoren auf Endothelzellen binden müssen um aufgenommen zu werden, wäre es denkbar, daß sich die Invasion von *L. monocytogenes* durch C1q, dem natürlichen Liganden des C1q-Rezeptors, hemmen ließe. Humanserum enthält große Mengen C1q (0,1 mg/ml) (Antes *et al.*, 1984), so daß es nicht verwunderlich wäre, wenn Humanserum die Invasion von *L. monocytogenes* in HBMEC hemmen würde. Wie mit Invasionsexperimenten in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, hemmt Humanserum im Infektionsmedium die Invasion von *L. monocytogenes* in HBMEC beträchtlich. Dem Infektionsmedium zugefügtes C1q verringert die Invasivität von *L. monocytogenes* in HUVEC (P. Cossart, persönliche Mitteilung). Dieses Ergebnis konnte in der vorliegenden Arbeit mit HBMEC nicht bestätigt werden. Gegen die Annahme, daß C1q für die durch Humanserum verursachte Hemmung der Invasion verantwortlich ist, spricht außerdem, daß eine Hitzeinaktivierung von Humanserum den Hemmeffekt nicht aufhebt. C1q ist hitzelabil (Lozada *et al.*, 1995) und müßte durch die Hitzebehandlung die Fähigkeit an C1q-Rezeptor zu binden verloren haben. Auch der Umstand, daß Humanserum keinen Einfluß auf die Invasion von *L. monocytogenes* in HUVEC hat, läßt die angebliche Schlüsselrolle des C1q-Rezeptors in diesem Zusammenhang fragwürdig erscheinen. Es kann aber nicht ausgeschlossen werden, daß die Bindung von InlB an den C1q-Rezeptor in anderen Zell-Typen, die von *L. monocytogenes* ebenfalls InlB-abhängig invadiert werden, für die Invasion von *L. monocytogenes* eine wichtige Rolle spielt.

Der Aufnahmemechanismus, der sich der Adhäsion anschließt, ist noch nicht hinreichend aufgeklärt. Schon geringe Konzentrationen des Inhibitors Cytochalasin D, welcher Aktin-Mikrofilamente depolymerisiert, hemmen die Invasion von *L. monocytogenes* in HUVEC und HBMEC fast vollständig (Drevets, 1998; Greiffenberg *et al.*, 1998). Daraus kann

geschlossen werden, daß für die Internalisation der Bakterien in Endothelzellen ein intaktes Aktin-Zytoskelett notwendig ist. Mikrotubuli scheinen am Invasionsprozeß ebenfalls beteiligt zu sein. Die durch Nocodazol, welches Mikrotubuli depolymerisiert (Kuhn, 1998), erzielbare Hemmung der Invasion von *L. monocytogenes* in HBMEC bleibt aber weit hinter der von Cytochalasin D zurück. Mikrotubuli scheinen somit nur einen gewissen Teil zur Invasion von *L. monocytogenes* HBMEC beizutragen.

In Vero-Zellen, die von *L. monocytogenes* genau wie Endothelzellen von InlB abhängig invadiert werden, löst eine Infektion mit *L. monocytogenes* eine rasche Erhöhung der intrazellulären Konzentration der Inositolphosphate PIP₂ und PIP₃ aus (Iretton *et al.*, 1996; Iretton und Cossart, 1997; Braun *et al.*, 1999). Wie mit Wortmannin, einem spezifischen PI 3-Kinase-Inhibitor, gezeigt werden konnte, ist dafür die Phosphoinositid PI 3-Kinase p85 α -p110 verantwortlich (Iretton *et al.*, 1996). Da Wortmannin die Aufnahme von *L. monocytogenes* in Vero-Zellen hemmt, scheint die Aktivierung dieser PI 3-Kinase für den Invasionsprozeß notwendig zu sein. Dies steht im Einklang mit der Beobachtung, daß p85 α -p110 an der Regulation des Aktin-Zytoskeletts beteiligt ist (Carpenter und Cantley, 1996). Wenn an der Invasion von *L. monocytogenes* in HBMEC ebenfalls die PI 3-Kinase p85 α -p110 maßgeblich beteiligt ist, müßte Wortmannin auch in dieser Zell-Linie die Invasion von Listerien inhibieren. Wie in Abbildung 2.20 ersichtlich, tritt ein solcher, auf Wortmannin zurückzuführender Hemmeffekt nur dann ein, wenn sehr hohe Konzentrationen (100 nM) eingesetzt werden. Bei derart hohen Konzentrationen ist die Hemmung wahrscheinlich auf unspezifische Wirkungen des Inhibitors zurückzuführen. Auch die Arbeitsgruppe von Kwang Sik Kim (Los Angeles) konnte bestätigen, daß Wortmannin die Invasion von *L. monocytogenes* in HBMEC nicht zu hemmen vermag. Offensichtlich ist in HBMEC eine andere PI 3-Kinase beteiligt, die sich mit dem Inhibitor LY 294002 hemmen läßt. Werden HBMEC in Anwesenheit von LY 294002 mit *L. monocytogenes* infiziert, wird die Aufnahme der Listerien gehemmt (Kwang Sik Kim, persönliche Mitteilung).

Nach einer Invasion von *L. monocytogenes* in HBMEC können sich die Bakterien intrazellulär vermehren und über eine Ausbreitung von Zelle zu Zelle schließlich den gesamten Monolayer infizieren (s. Abb. 2.24). Obwohl in infizierten HBMEC-Monolayern ca. 21 Stunden nach der Infektion nahezu jede Zelle infiziert war, lösten sich die Zellen nicht vom Untergrund ab und schienen zudem intakt zu sein. Bereits 4 Stunden nach der Infektion von HBMEC mit *L. monocytogenes* befanden sich die meisten intrazellulären Listerien in Membranausstülpungen (s. Abb. 2.25, F). Das Bild C könnte ein frühes Stadium einer solchen Ausstülpung wiedergeben. Ähnliche Strukturen bilden sich in mit *Shigella flexneri* infizierten HeLa-Zellen aus. Auch dort kommt es zur Ausbildung von Protrusionen (Goldberg und Sansonetti, 1993). Bei genauerer Betrachtung ergeben sich aber deutliche Unterschiede: In mit *L. monocytogenes*-infizierten HBMEC scheint die Ausbildung solcher Protrusionen häufiger vorzukommen als in mit *Shigella* infizierten HeLa-Zellen (s. Abb. 2.25, F). Shigellen scheinen in HeLa-Zellen an der Basis ihrer Protrusionen starke Veränderungen des Zytoskeletts zu induzieren. Durch viele kleine Membranausstülpungen rund um den Austrittsort der Protrusion, ist der Ursprung der Protrusion kaum zu erkennen (Goldberg und Sansonetti, 1993). In mit *L. monocytogenes*-infizierten HBMEC entstehen die Ausstülpungen ohne sichtbare Veränderungen in unmittelbarer Umgebung der Austrittsstelle. Der das Bakterium umschließende Membranschlauch hat an seiner Basis einen Durchmesser, der nur noch einem Bruchteil eines Bakteriendurchmessers entspricht (s. 2.25, D). Eine Ursache für die häufige Bildung der Ausstülpungen könnte die räumlich stark eingeschränkte zytoplasmatische Beweglichkeit der intrazellulären Listerien in den extrem flachen HBMEC sein.

3.3 Wirtszell-Antwort von Endothelzellen auf eine Infektion mit *L. monocytogenes*

Zellen reagieren auf viele Umweltreize mit einer Veränderung ihrer Genexpression. Eine bakterielle Infektion ist nur *ein* denkbarer Stimulus, der das Expressionsmuster in der betroffenen Wirtszelle moduliert. Wie schon in der Einleitung beschrieben (s. 1.4), reagieren auch Endothelzellen auf eine Listerien-Infektion mit der Expression von Zytokinen, Oberflächenmolekülen und Chemokinen. (Kayal *et al.*, 1999; Greiffenberg *et al.*, 1997; Drevets, 1997). Zum Nachweis einer durch die Infektion bedingten, veränderten Genexpression eignet sich die Methode der RT-PCR. Vorhandene mRNA-Transkripte werden hierbei revers transkribiert und anschließend in einer PCR mit spezifischen Primern amplifiziert.

Wie in einem ELISA, mit dem sich IL-8 nachweisen läßt, gezeigt werden konnte (s. Abb. 2.27), befindet sich ca. 4 Stunden nach der Infektion im Kulturüberstand 7mal mehr IL-8 als im Überstand nicht-infizierter Zellen (Greiffenberg *et al.*, 1997). Schon 90 min nach Infektionsbeginn (0 h p.i.) befindet sich im Überstand infizierter HUVEC mehr IL-8 als im Überstand von nicht-infizierten HUVEC. Zu diesem Infektionszeitpunkt konnte keine verstärkte Expression von IL-8-spezifischer mRNA nachgewiesen werden. Daraus könnte man schließen, daß für eine transiente IL-8-Freisetzung eine Transkription nicht erforderlich ist. Humane mikrovaskuläre Endothelzellen der Haut und des respiratorischen Traktes speichern IL-8 zusammen mit dem Faktor VIII in sogenannten „Weibel-Palade-Körpern“ (Wolff *et al.*, 1998; Wagner, 1993). Diese im Zytoplasma vorkommenden granulären Speicherkompartimente erlauben eine Ausschüttung von IL-8 schon wenige Minuten nach der Aktivierung der Endothelzelle durch Histamin (Wolff *et al.*, 1998). In HUVEC führt die Stimulation mit IL-1 zu einer solchen Freisetzung von zytoplasmatisch zwischengespeichertem IL-8 (Utgaard *et al.*, 1998). Vermutlich verfügen alle Endothelzellen über die Möglichkeit, schon kurz nach ihrer Aktivierung größere Mengen an IL-8 an die Umgebung abzugeben. Allerdings scheinen die Stimuli, die zur schnellen Freisetzung von IL-8 führen, je nach Zell-Typ zu variieren. Es ist sehr wahrscheinlich, daß auch HBMEC infolge einer Infektion mit *L. monocytogenes* oder Stimulation mit IL-1 oder TNF vermehrt IL-8 sezernieren. IL-8 ist ein potentes Chemoattraktant für polymorphkernige Leukozyten (PMN) (Hechtman *et al.*, 1991). Besonders neutrophile Granulozyten, die bei einer bakteriell verursachten Meningitis eine wichtige Rolle spielen, werden von IL-8 angelockt (Leonard und Yoshimura, 1990). Wie in 1.3 genauer beschrieben, sind Leukozyten in der Lage vaskuläres Endothel zu transmigrieren. Auf diese Weise können sie auch Blut-Hirn- oder Blut-Liquor-Barrieren überwinden. Da Listerien nach einer Infektion sowohl frei im Blut vorkommen (Berche, 1995), als auch phagozytiert in Leukozyten überleben können (Drevets, 1999), könnte man sich folgendes Szenario vorstellen: Frei im Blut flottierende Listerien könnten Hirnendothelzellen in einer von InlB abhängigen Weise invadieren. Die Bakterien wären zwar in der Lage, sich durch eine Vermehrung von Zelle zu Zelle in den Endothelzellen weiter auszubreiten, es ist aber fraglich, ob sie dabei die Basalmembran durchbrechen können, die Endothelzellen vom angrenzenden Gewebe trennt. Die infizierten Endothelzellen würden als Antwort auf die Infektion große Mengen IL-8 sezernieren. Neutrophile Granulozyten, die von IL-8 zum Infektionsherd geleitet würden, könnten an infizierte Endothelzellen binden und im weiteren Verlauf Endothelzellen parazellulär transmigrieren. Geht man davon aus, daß zur Transmigration auch solche Leukozyten fähig sind, die Listerien in sich tragen, könnten Listerien Immunzellen als Träger benutzen, um Endothelzellbarrieren zu überwinden. Dadurch, daß Granulozyten im An-

schluß an die Transmigration auch die endotheliale Basalmembran überwinden können, könnten Listerien in Immunzellen auch dieses Hindernis passieren. Im Mausmodell konnten im Verlauf einer experimentell durch Listerien hervorgerufenen Meningitis infizierte Leukozyten mit Infektionsherden im Gehirn kolokalisiert werden. Besonders häufig waren dabei mit Listerien beladene Leukozyten in der Nähe von Hirnhautgefäßen zu erkennen (López *et al.*, 1999).

Neben der Expression von IL-8 wurden in HUVEC noch Transkripte, die für MCP-1, VCAM-1 und IL-6 kodieren nachgewiesen. Abgesehen von einer geringen Induktion der IL-6-mRNA-Expression, verstärkte eine *L. monocytogenes*-Infektion die Transkription der Gene, die für VCAM-1 und MCP-1, kodieren nicht. Dies steht im Widerspruch zu den Veröffentlichungen von Krull *et al.*, 1997 und Kayal *et al.*, 1999. Aus diesen Arbeiten geht hervor, daß mit Listerien infizierte HUVEC verstärkt ICAM-1 und VCAM-1 exprimieren. Während in diesen Arbeiten serumfreies Infektionsmedium verwendet wurde, enthielt das Infektionsmedium in den Versuchen der vorliegenden Arbeit nicht-hitzeinaktiviertes Humanserum. In Humanserum vorkommendes C1q induziert in HUVEC die Expression von IL-8, VCAM-1 und MCP-1 (van den Berg *et al.*, 1998). Es ist somit denkbar, daß in den vorliegenden Versuchen im Infektionsmedium vorhandenes C1q die Transkription der Gene für VCAM-1 und MCP-1 in HUVEC verstärkt hat. Möglich ist außerdem, daß die infektionsbedingte Induktion der mRNA-Expression diesen Effekt nicht weiter steigern konnte. Warum hingegen die IL-8-Expression nach einer Infektion von HUVEC mit *L. monocytogenes* deutlich induziert wurde, obwohl eine IL-8-Expression ebenfalls durch C1q induzierbar ist, bleibt unklar. MCP-1 ist ein wichtiges Chemoattraktant für Monozyten (Cai *et al.*, 1996), und VCAM-1 ermöglicht die Bindung der Monozyten an Endothelzellen. Beide Moleküle sind maßgeblich an der transendothelialen Migration von Monozyten beteiligt. Somit können, neben Granulozyten auch Monozyten den Listerien als Vehikel dienen, um aus dem Blut ins Gehirn zu gelangen.

Die Interpretation der Daten, die mit der Zell-Linie EA.hy-926 erlangt wurden, gestaltet sich einfacher: Nach einer Infektion von EA.hy-926-Zellen mit *L. monocytogenes* konnte eine Induktion der IL-8-Transkription festgestellt werden. Die Menge der Transkripte, die für MCP-1, ICAM-1 und IL-6 kodieren, veränderte sich durch die Infektion jedoch nicht. Werden EA.hy-926-Zellen mit Überständen Listerien-infizierter Makrophagen inkubiert, induziert dies die Transkription von MCP-1, ICAM-1, IL-6 und IL-8.

Makrophagen geben nach einer Infektion mit *L. monocytogenes* IL-1 und TNF ins Medium ab (Kuhn und Goebel, 1994). Gerade diese proinflammatorischen Zytokine sind bekannt dafür, in Endothelzellen die Transkription von IL-6, IL-8, ICAM-1 und MCP-1 auszulösen (s. 1.3.1). In diesen Experimenten mit EA.hy-926 wurden die Zellen in Medium mit 10 % FCS kultiviert und infiziert. Es ist anzunehmen, daß FCS kein oder für humane Zellen inaktives C1q enthält und sich FCS somit auch nicht störend auf die Transkriptionsuntersuchungen auswirkt.

3.4 Schlußfolgerungen aus dem Zwei-Zell-*in-vitro*-Modell des *choroid plexus*

Der *choroid plexus* wird in der Literatur als mögliche Eintrittspforte für Listerien ins Gehirn beschrieben. Diese Aussage beruht auf der Beobachtung, daß bei einer durch Listerien verursachten Meningitis bei der Maus, die Listerien zuerst in Bereichen des *choroid plexus* oder der angrenzenden Ventrikel zu sehen sind. Bedingt durch eine Vermehrung der

Listerien in diesen Regionen des Gehirns wird häufig eine Choroiditis oder Ventrikulitis ausgelöst (Berche, 1995; Prats *et al.*, 1992). Die funktionale Einheit des *choroid plexus* besteht aus zwei Zelltypen; aus dem für die Liquorproduktion verantwortlichen Plexusepithel und dem gefensterten mikrovaskulären Endothel der Blutgefäße. Zwischen beiden Zelltypen befindet sich eine dem Plexusepithel anliegende Basalmembran sowie vereinzelt vorkommende Fibrozyten (s. Abb. 3.2, linke Aufnahme). In der vorliegenden Arbeit sollte versucht werden, ein *in-vitro*-Modell des *choroid plexus* zu etablieren. In einem stark vereinfachten Modell sollten dabei geeignete Epithel- und Endothelzellen, jeweils auf gegenüberliegenden Seiten einer Filtermembran, bis zur Konfluenz kultiviert werden.

Wie gezeigt werden konnte, ist es möglich, Plexusepithel aus den Gehirnen von Ratten und Schweinen zu isolieren und für *in-vitro*-Studien auf Filtern zu kultivieren. Konfluente Monolayer bilden dabei hohe elektrische Widerstände aus und sind sogar in der Lage, auf der apikalen Seite Liquorflüssigkeit zu sezernieren (Gath *et al.*, 1997; Zheng *et al.*, 1998). Da *L. monocytogenes* ein humanpathogener Erreger ist, dessen Interaktionen mit Zellen außerordentlich wirtsspezifisch zu sein scheinen (Lecuit *et al.*, 1999), erschien es sinnvoll, für ein *in-vitro*-Modell des *choroid plexus* humane Zellen zu verwenden. Wie von Birkness *et al.*, 1995 gezeigt wurde, ist es möglich humane HecIB-Epithelzellen durch einen Filter getrennt von humanen mikrovaskulären Endothelzellen bis zur Konfluenz zu kultivieren.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein ähnliches System mit humanen Caco-2-Epithelzellen und humanen mikrovaskulären Hirndothelzellen (HBMEC) etabliert. Die im Durchmesser 3 μm großen Filterporen erlauben sowohl den Kontakt zwischen beiden Zelltypen als auch den Durchtritt von Listerien. In den elektronenmikroskopischen Aufnahmen der Abbildung 3.2 wird die *in-vivo*-Situation im dritten Ventrikel einer Ratte dem *in-vitro*-Modell gegenübergestellt. Dabei ist deutlich zu erkennen, daß im Modell (rechts) Caco-2-Zellen und HBMEC über die Filterporen miteinander in Kontakt treten oder zumindest in die Poren einwachsen. Vergleicht man das Modell mit dem *choroid plexus* einer Ratte (links), stellt man fest, daß in beiden Fällen die Epithelzellen (jeweils unten) Mikrovilli ausbilden. Der Abstand des Endothels vom Plexusepithel im *choroid plexus* der Ratte stimmt beachtlich genau mit dem Abstand überein, der im Modell durch den Filter vorgegeben wird. Es ist anzunehmen, daß sowohl das Plexusepithel (links unten) als auch die ausdifferenzierten Caco-2-Zellen (rechts unten) über Tight Junctions miteinander verbunden sind. Die Endothelzellen der arteriellen und venösen Gefäße sind im Bereich des *choroid plexus* gefenstert (s. 1.4); die winzigen Öffnungen sind mit kleinen Scheidewänden bedeckt (Schmidley und Wissig, 1986). Die im Modell verwendeten HBMEC bilden ebenfalls keine Tight Junctions aus (Kwang Sik Kim, persönliche Mitteilung). Ein solcher Bilayer aus konfluenten Caco-2-Zellen und HBMEC weist einen elektrischen Widerstand von 300 Ωcm^2 auf. Elektrische Widerstände in dieser Höhe können nur dann erreicht werden, wenn sich enge Zell-Zell-Verbindungen ausgebildet haben. Da konfluente HBMEC-Monolayer nur Widerstände von etwa 100 Ωcm^2 aufweisen, ist davon auszugehen, daß für die hohen elektrischen Widerstände der Bilayer hauptsächlich die Zellen des Caco-2-Monolayers verantwortlich sind. Da auch Latex-Kügelchen mit einem Durchmesser von 0,2 μm nicht von einer Seite des Bilayers durch die Poren auf die andere Seite gelangen konnten, kann davon ausgegangen werden, daß der Bilayer keine Lücken aufwies.

Durch Infektion des Caco-2/HBMEC-Bilayers von der Endothelzellseite mit *L. monocytogenes* EGD wurde versucht, die Situation nachzustellen, in der sich im Blut flottierende Listerien befinden, wenn sie den *choroid plexus* infizieren. Welchen Weg sie dabei *in vivo* einschlagen, ist noch völlig unbekannt. Um aus dem Blut in den Liquor zu gelan-

gen, könnten sie dabei sowohl die endotheliale als auch die epitheliale Barriere parazellulär überwinden. Da das gefensterte Endothel der Blutgefäße keine Tight Junctions aufweist und deshalb vermutlich kein großes Hindernis darstellt, müßten die Listerien zumindest die Fähigkeit besitzen, die Zell-Zell-Verbindungen des Plexusepithels zu lockern oder zu lösen. Bisher konnte noch nicht gezeigt werden, ob Listerien Zell-Zell-Verbindungen verändern können. Darüber hinaus ist zu bedenken, daß Endothelzellen wie Epithelzellen neben Tight Junctions noch weitere Zelljunctionen ausbilden können (Huber, 1999; Kowalczyk *et al.*, 1998), die ebenfalls von den Bakterien bei einem parazellulären Weg überwunden werden müßten. Insbesondere die Ca^{2+} -abhängigen Zell-Zell-Verbindungen der *zonula adherens*, die über das zelluläre Aktin-Zytoskelett stabilisiert werden, könnten einen parazellulären Durchtritt der Erreger erschweren.

Ebenso denkbar wäre es, daß Listerien zunächst vaskuläre Endothelzellen invadieren müssen, um anschließend über Membranausstülpungen in das Plexusepithel zu gelangen. Eine starke intrazelluläre Vermehrung der Listerien in den Epithelzellen könnte dann dazu führen, daß die infizierten Epithelzellen zerstört werden und die Listerien so in den Liquor gelangen. Könnten die Listerien auch ohne die Ausbildung von Protrusionen ins Plexusepithel gelangen, so müßten sie dazu die Plexusepithelzellen von ihrer basalen Seite invadieren. Zuvor jedoch müßten sie aus den Blutgefäßen in den Zwischenraum zwischen Endothel und Plexusepithel gelangen. Bei allen bisher vorgeschlagenen Infektionswegen wurde außer Acht gelassen, daß sich zwischen den Gefäßen und dem Plexusepithel noch eine Basalmembran befindet. Bisher gibt es keine Informationen darüber, ob Basalmembranen für Listerien ein Hindernis darstellen.

Wurde ein Caco-2/HBMEC-Bilayer von Endothelzelleseite mit *L. monocytogenes* EGD infiziert, befanden sich drei Stunden nach der Infektion sowohl in HBMEC als auch in Caco-2-Zellen intrazelluläre Listerien (s. Abb. 2.31-2.33). Viele der intrazellulären Listerien, die sich in HBMEC befanden, waren noch von einer phagosomalen Membran umgeben (s. Abb. 2.31). Dies ist verwunderlich, da sich Listerien normalerweise kurz nach ihrer Aufnahme aktiv aus dem Phagosom befreien können. Möglicherweise wurden diese Listerien von Gentamycin-haltigem Medium abgetötet und erst danach von einer HBMEC phagozytiert. Dies würde auch erklären, warum sich diese Listerien nicht der Lyse im Phagosom entziehen konnten.

Da sich wie in Abbildung 2.32 zu sehen, infizierte HBMEC und infizierte Caco-2-Zellen direkt gegenüberliegen und sich in der Filterpore dazwischen auch ein Bakterium befindet, ist anzunehmen, daß eine Ausbreitung von HBMEC nach Caco-2-Zellen stattgefunden hat. Ob dazu, wie es in Abbildung 2.32 zu sehen ist, die Bakterien in der Pore zwischen HBMEC und Caco-2-Zellen frei werden, ist fraglich. Es kann sich hier auch um einen Präparationsartefakt handeln, wobei sich das Bakterium zuvor in einer Protrusion befand. Auch wenn keine Aussage darüber getroffen werden kann, wie die Listerien von den HBMEC in die Caco-2-Zellen gelangt sind, läßt sich doch feststellen, daß für diese Ausbreitung 4,5 Stunden (3 h p.i.) ausreichen. Der elektrische Widerstand eines infizierten Bilayers war 3 Stunden nach der Infektion noch ebenso hoch wie der eines nicht-infizierten. Es ist somit davon auszugehen, daß es während der Infektion zu keiner Zell-Lyse oder einer Ablösung von Zellen aus dem Zellverband gekommen ist.

Könnten in einer Caco-2-Zelle intrazelluläre Listerien gefunden werden, die von einer Doppelmembran umgeben sind, so wäre dies ein Beweis dafür, daß diese Caco-2-Zelle eine Protrusion phagozytiert hat. Es hätte dann eine Zell-zu-Zell Ausbreitung zwischen HBMEC und Caco-2-Zellen stattgefunden. Weitere Informationen über den Ausbreitungsmechanismus könnte man erhalten, wenn man zur Infektion anstelle des Wildtyps eine

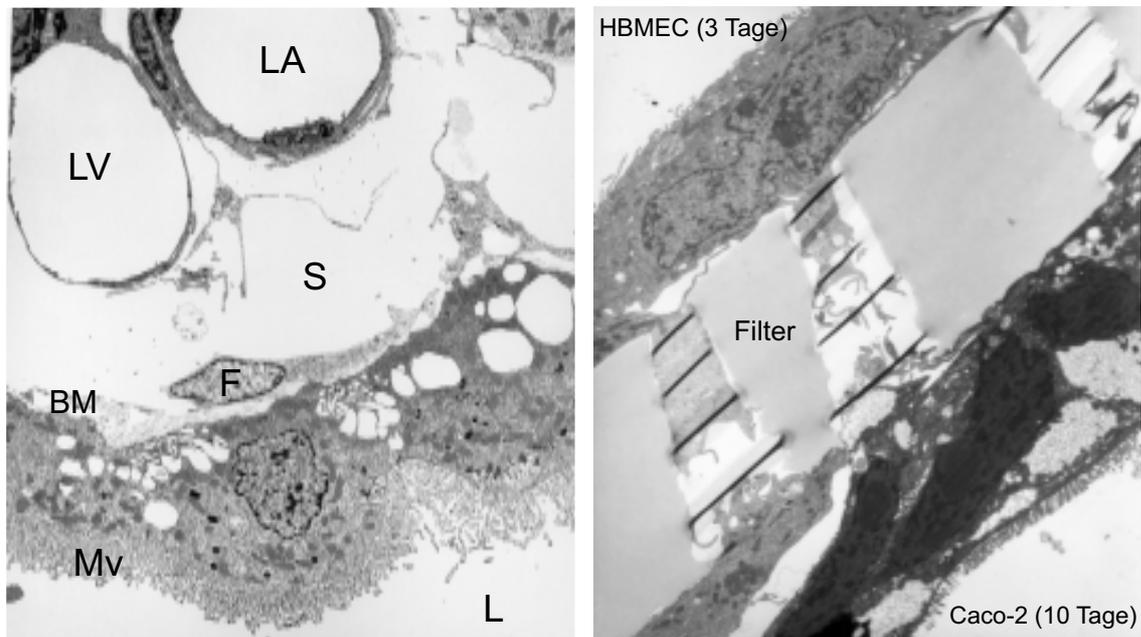


Abbildung 3.2:

Bild links: Blut-Liquor-Schranke am dritten Ventrikel der Ratte: LV = Lumen Venole, LA = Lumen Arteriole, S = Interzellularrast (wegen Plasmastrom dilatiert), F = Fibrozyt, BM = Basalmembran, Mv = Mikrovilli, L = Lumen Liquorraum. Die Endothelzelle der Arteriole ist untypischerweise nicht gefenestert (*endotheliocytus nonfenestratus*). Mit freundlicher Genehmigung von Dr. med. Holger Jastrow, Anatomisches Institut, Johannes-Gutenberg-Universität, Mainz. Bild rechts: Nicht-infizierter Bilayer auf Transwell-Filter. Der Filter hat einen Porendurchmesser von $3\ \mu\text{m}$. Caco-2-Zellen wurden 10 Tage, HBMEC 3 Tage vor der Fixierung ausgesät. Die Ausbildung des Bürstensaumes bei den Caco-2-Zellen ist deutlich zu erkennen (unten).

$\Delta inlA$ -Mutante verwenden würde. Die $\Delta inlA$ -Mutante würde HBMEC mit derselben Effizienz wie der Wildtyp invadieren (vgl. Abb. 2.9). Da InlA jedoch für die Aufnahme in Caco-2-Zellen benötigt wird, könnten freie Listerien die Caco-2-Zellen nicht invadieren. Würde *L. monocytogenes* $\Delta inlA$ dennoch den Weg in Caco-2-Zellen finden, so spräche dies ebenfalls für eine von Internalinen unabhängige Zell-zu-Zell-Ausbreitung.

Wie die ersten Infektionsversuche zeigen konnten, eignet sich das Zwei-Zell-*in-vitro*-Modell des *choroid plexus* um zu untersuchen, auf welchem Wege Listerien von infizierten Endothelzellen in benachbarte Epithelzellen gelangen können. Da dieses Modell in groben Zügen dem Aufbau des *choroid plexus* entspricht, erscheint es sinnvoll, die aus dem Modell gewonnenen Erkenntnisse in ein Tiermodell einfließen zu lassen.

3.5 Der Einfluß der Infektionsbedingungen

Im Laufe der letzten Jahre sind *in vitro*-Infektionsversuche, in denen Zellen in Zellkultur mit Bakterien infiziert werden, immer populärer geworden. Trotz der oftmals ähnlichen Fragestellungen, die solchen Versuchen zugrunde liegen, hat sich kein methodischer Standard etabliert. Dies hat zur Folge, daß die Ergebnisse nicht miteinander verglichen werden dürfen, obwohl gleiche Zell-Typen und Bakterienstämme für die Infektion verwendet wurden. Wie aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit ersichtlich ist, wirken sich manche methodische Parameter nicht auf alle Stämme gleichermaßen aus. Wie schon oben diskutiert wurde, könnten für die Unstimmigkeiten der Ergebnisse in Parida *et al.*, 1998 und

A		<i>L. monocytogenes</i> EGD	Zentrifugation	Humanserum 10 %	FCS 10 %
		HUVEC	1 ↑ 36	2 k. E.	3 ↑ 6
HBMEC	4 k. E.	5 ↓ ↓ > 400	6 ↑ 1,5		

B		HBMEC	Zentrifugation
		EGD	7 k. E.
<i>prfA</i>	8 ↑ 20		
<i>L. innocua</i>	9 ↑ 30		

C		HUVEC	Humanserum 10 %
		EGD	10 k. E.
<i>inlB</i>	11 ↑ 3,6		

Abbildung 3.3: Einfluß von Zentrifugation und Serum im Infektionsmedium auf die Invasion von *L. monocytogenes* EGD, *L. monocytogenes* $\Delta inlB$, *L. monocytogenes* $\Delta prfA$ und *L. innocua* in HUVEC und HBMEC. Die Zahlen direkt neben den Pfeilen geben die faktorielle Erhöhung oder Erniedrigung der jeweiligen Invasionsrate an. Wird dies für den Einfluß der Zentrifugation angegeben, bezieht sich der Faktor auf die Invasionsrate, die ohne Zentrifugation erreicht wurde. Beim Einfluß von Serum wird auf die Invasionsrate in serumfreiem RPMI-Medium bezug genommen. Der Bezug zu den Einzelexperimenten wird durch die kleinen Zahlen jeweils links unten hergestellt: (1, 2, 3, 10) s. Abb. 2.20; (4, 7, 8, 9) s. Abb. 2.11; (5) s. Abb. 2.13; (11) s. Abb. 2.21; (6) s. Abb. 2.12. k. E. = kein Effekt.

Greiffenberg *et al.*, 1997 unterschiedliche Infektionsbedingungen verantwortlich sein.

Die nachfolgenden Beispiele, die zur Verdeutlichung der Problematik herangezogen werden, sind zur besseren Übersicht in den Abbildungen 3.3 und 3.4 schematisch zusammengefaßt. In den in Greiffenberg *et al.*, 1997 veröffentlichten Invasionsexperimenten (s. Abb. 2.18), in denen Invasionsraten unterschiedlicher Listerienstämme in HUVEC miteinander verglichen wurden, wurden die Endothelzellen strikt nach einer Methode von Frau Dr. Z. Sokolovic (Lehrstuhl für Mikrobiologie, Biozentrum, Würzburg) mit Listerien infiziert. Diese Methode wurde in Zusammenarbeit mit Herrn Prof. Dr. H. J. Schnittler (Institut für Anatomie, Universität Würzburg) etabliert. Hierbei wurden die Listerien mit einer MOI von 2 in HUVEC-Kulturmedium, welches 20 % nicht-inaktiviertes Humanserum enthielt, auf einen konfluenten HUVEC-Monolayer zentrifugiert und anschließend für weitere 80 min inkubiert (s. Abb. 2.18). Um der physiologischen Situation, wie sie bei einer Listeriose im Menschen vorliegen könnte, möglichst nahe zu kommen, wurde die MOI gering gehalten. Außerdem sollte auf diese Weise möglichst vermieden werden, daß HUVEC während der Infektion von bakteriellen Stoffwechselprodukten geschädigt werden. Auf die Zentrifugation konnte deshalb nicht verzichtet werden, weil sonst die Invasionsraten für eine Auswertung vermutlich zu gering gewesen wären.

Allein durch die Zentrifugation werden 36mal mehr Listerien von HUVEC aufgenom-

Adhäsion	HBMEC	Humanserum 10 %
	EGD	↓ 7
	<i>inlB</i>	↓ 2,5
	<i>prfA</i>	↑ 4,5
	<i>L. innocua</i>	↑ 4

Abbildung 3.4:
Einfluß von 10 % Humanserum im Infektionsmedium auf die Adhäsion von *L. monocytogenes* EGD, *L. monocytogenes* $\Delta inlB$, *L. monocytogenes* $\Delta prfA$ und *L. innocua* an HBMEC. Die Zahlen direkt neben den Pfeilen geben die faktorielle Erhöhung oder Erniedrigung der jeweiligen Adhäsionsrate an, verglichen mit der Adhäsionsrate, die in serumfreiem RPMI-Medium erreicht wird. Der Bezug zu den Einzelexperimenten wird durch die kleinen Zahlen jeweils links unten hergestellt: (1, 2, 3) s. Abb. 2.7; (4) s. Abb. 2.6.

men als in einem vergleichbaren Ansatz, in dem die Bakterien nicht auf den HUVEC-Monolayer zentrifugiert wurden (s. Abb. 2.20). Dabei ist es unerheblich, ob das Infektionsmedium - hier RPMI - Humanserum enthält oder nicht. Die absoluten Invasionsraten in diesem Experiment sind trotz Zentrifugation wesentlich geringer als dies der Fall ist, wenn M199-Medium mit 20 % Humanserum als Infektionsmedium verwendet wird (s. Abb. 2.18). Wie bereits erläutert, kann die Invasivität von Listerien in Endothelzellen durch die Wahl des Infektionsmediums beeinflusst werden.

Die Auswirkung von Humanserum auf die Invasivität von *L. monocytogenes* $\Delta inlB$ und *L. monocytogenes* EGD in HUVEC kann als Beispiel dafür herangezogen werden, daß sich bestimmte Infektionsbedingungen nicht auf alle Listerienstämme gleichermaßen auswirken (s. Abb. 2.21). Während Humanserum im Infektionsmedium die Invasivität von *L. monocytogenes* $\Delta inlB$ in HUVEC um einen Faktor von 3,6 erhöht, beeinflußt Humanserum die Invasivität des Wildtyps in HUVEC nicht (s. Abb. 2.20). Findet die Infektion von HUVEC mit Listerien in serumfreiem RPMI-Medium ohne Zentrifugation statt, invadiert *L. monocytogenes* $\Delta inlB$ die Nabelschnurendothelzellen nur halb so gut wie der Wildtyp (s. Abb. 2.21). In Gegenwart von Humanserum allerdings ist die Invasionsrate von *L. monocytogenes* $\Delta inlB$ in HUVEC fast doppelt so hoch wie die Invasionsrate des Wildtyps. An diesem Beispiel wird deutlich, welchen Einfluß die Zusammensetzung des Infektionsmediums auf das Ergebnis eines Invasionsexperiments haben kann.

Um für die Infektionsexperimente mit Listerien und HBMEC geeignete Infektionsbedingungen zu finden, wurden viele der möglichen Parameter variiert und die Ergebnisse miteinander verglichen. Ziel war es, Bedingungen zu finden, in denen Invasionsraten meßbar sind, sich aber noch nicht im Sättigungsbereich befinden. Invasionsraten befinden sich dann im Sättigungsbereich, wenn es trotz einer Erhöhung der MOI zu keiner Mehraufnahme von Listerien in HBMEC kommt. Da die Invasion von *L. monocytogenes* in Endothelzellen vermutlich ein rezeptorvermittelter Vorgang ist, ist es für Invasionsstudien optimal, wenn man sich in etwa im Bereich der halben Sättigung befindet. Nur so ist es möglich, gleichermaßen höhere und niedrigere Invasionsraten zu messen. Ganz besonders problematisch ist die Interpretation von Invasionsexperimenten, in denen die absoluten Invasionsraten derart niedrig sind, daß sich nach der Infektion im unverdünnten Zell-Lysat weniger als 100 Bakterien/ml befinden. Für die Auswertung bedeutet dies, daß sich auf den BHI-Platten, auf denen das unverdünnte Zell-Lysat ausplattiert wurde, weniger als 10 Bakterienkolonien befinden.

Von den hier getesteten Medien erwies sich serumfreies RPMI als geeignetes Infektionsmedium. Obwohl in MEM-Medium noch höhere Invasionsraten von *L. monocytogenes* in HBMEC erzielt werden konnten (s. Abb. 2.8), wurde aus oben genannten Gründen RPMI vorgezogen.

Geht man bei der Infektion von vaskulärem Endothel davon aus, daß die Infektion hämatogen, also aus dem Blut heraus, erfolgt, erscheint es sinnvoll, den Einfluß von Humanserum bei der Infektion von HBMEC mit *L. monocytogenes* zu untersuchen. Überraschenderweise stellte sich dabei heraus, daß die Invasion von *L. monocytogenes* in HBMEC durch nur 10 % Humanserum im Infektionsmedium fast vollständig gehemmt wird. Berücksichtigt man die für Listerien toxischen Auswirkungen der Komplementfaktoren im Blut, drängt sich die Frage auf, ob humane mikrovaskuläre Hirnendothelzellen *in vivo* überhaupt von frei flottierenden Listerien aus dem Blut heraus infiziert werden können. Bovines Serum hemmt die Invasion von *L. monocytogenes* in HBMEC zwar auch, dies jedoch erst ab einer Konzentration von 20 % im Infektionsmedium. Der inhibitorische Effekt ist dabei jedoch viel geringer als bei der durch Humanserum verursachten Hemmung. Diese durch bovines Serum hervorgerufene Hemmung könnte durch den Hauptbestandteil im Serum, dem Albumin, verursacht werden. In Experimenten, in denen bovines Albumin dem Infektionsmedium zugefügt wurde, reduzierte sich die Invasivität von *L. monocytogenes* etwa in dem Maß, in dem dies auch bei Invasionsexperimenten in Anwesenheit von entsprechenden FCS-Konzentrationen der Fall war. Warum inaktiviertes FCS im Infektionsmedium bis zu einer Konzentration von 10 % die Invasivität von *L. monocytogenes* EGD in HBMEC und HUVEC erhöht, bleibt unklar.

Humanes Albumin im Infektionsmedium hingegen hat keinen Einfluß auf die Invasionsrate von *L. monocytogenes* in HBMEC. Die Hemmung der Invasion von *L. monocytogenes* durch Humanserum kann somit nicht auf Serumalbumin zurückgeführt werden.

In den ersten Versuchen der vorliegenden Arbeit, in denen der Einfluß von humanem Albumin auf die Invasivität von *L. monocytogenes* in HBMEC bestimmt werden sollte, wurde Albumin verwendet, welches laut Hersteller noch mit Antikörpern verunreinigt war. Dieses Albumin hemmte im Gegensatz zu nachweislich Antikörper-freiem, humanem Albumin die Invasion von *L. monocytogenes* in HBMEC (nicht gezeigt). Dies war ein erster Hinweis darauf, daß Antikörper für den inhibitorischen Effekt von Humanserum auf die Invasion von *L. monocytogenes* in HBMEC verantwortlich sein könnten. Das in den Invasionsexperimenten verwendete Humanserum entstammte einem Serumvorrat, der sich aus vielen miteinander vereinigten Seren gesunder Spender zusammensetzte. Auch im Blut gesunder Menschen, die nie an einer Listeriose erkrankt waren, lassen sich oft Anti-Listerien-Antikörper nachweisen (Gagliardi *et al.*, 1977; Grenningloh *et al.*, 1997). Da Listerien ubiquitär vorkommen, haben Menschen häufig Kontakt mit Listerien. Die wichtigsten Listerien-Antigene für die humorale Immunantwort sind LLO und InlC. Es können aber auch Antikörper gegen InlB, ActA oder p60 im Blut gesunder Spender nachgewiesen werden (Grenningloh *et al.*, 1997). Da das in dieser Arbeit verwendete Humanserum von vielen Spendern stammt, ist die Wahrscheinlichkeit sehr hoch, daß es Anti-Listerien-Antikörper enthält. Tatsächlich ließ sich mit diesem Humanserum in einem Western-Blot p60-Protein nachweisen (s. Abb. 2.16). Wie schon Hess *et al.*, 1995 zeigen konnten, inhibieren Anti-p60-Antikörper teilweise die Invasion von *L. monocytogenes* in Hepatozyten. Da Hepatozyten ebenso wie HBMEC von *L. monocytogenes* InlB-abhängig invadiert werden (Braun *et al.*, 1998), könnten Anti-p60-Antikörper im Humanserum für den oben beschriebenen Hemmeffekt verantwortlich sein. Es ist aber auch denkbar, daß andere Anti-Listerien-Antikörper im verwendeten Humanserum eine Aufnahme von *L. mo-*

monocytogenes in HBMEC verhindern. Wie in Parida *et al.*, 1998 gezeigt, läßt sich die Aufnahme von *L. monocytogenes* in HUVEC durch Antikörper inhibieren, die sich gegen InlB richten. Da in humanem Serum Anti-InlB-Antikörper nachgewiesen wurden (Grenningloh *et al.*, 1997), könnte auch das in der vorliegenden Arbeit verwendete Humanserum Anti-InlB-Antikörper enthalten haben. Solche Antikörper, die sich gegen das für die Invasion von *L. monocytogenes* in HBMEC wichtige InlB richten, könnten für die stark verringerte Invasivität von *L. monocytogenes* in HBMEC in Anwesenheit von Humanserum verantwortlich sein. Warum hingegen Humanserum nicht die Invasivität von *L. monocytogenes* in HUVEC beeinflußt, bleibt ungeklärt. Obwohl HUVEC und HBMEC von Listerien in einer von InlB abhängigen Weise invadiert werden, hemmt das Humanserum nur die Invasion von *L. monocytogenes* in HBMEC. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, daß *L. monocytogenes* HUVEC auf eine andere Weise invadiert als HBMEC.

Wenn Anti-Listerien-Antikörper die Invasivität von *L. monocytogenes* in HBMEC vermindern können, wäre es vorstellbar, daß es bei Patienten mit einer durch Listerien verursachten Sepsis nur dann zu einer Infektion des ZNS kommen kann, wenn ihr Blut keine Anti-Listerien-Antikörper enthält. Obwohl sich Anti-Listerien-Antikörper im Mausmodell nicht protektiv auf eine *L. monocytogenes*-Infektion auswirken (Cerny *et al.*, 1988), könnten Anti-Listerien-Antikörper dennoch eine Schutzfunktion für das ZNS ausüben.

Da Humanserum offensichtlich die Invasion von *Listeria monocytogenes* EGD in HBMEC stark hemmt, ist es zweckmäßig zu untersuchen, ob Humanserum schon die Bindung der Listerien an HBMEC und damit auch eine Invasion verhindert. Wie in Abbildung 3.4 ersichtlich, verringert Humanserum die Adhäsion von *Listeria monocytogenes* EGD an HBMEC um den Faktor 7. Da Humanserum die Invasivität von *Listeria monocytogenes* EGD in HBMEC mehr als 400fach verringert, dieser Hemmung aber nur eine 7fach verringerte Adhäsion gegenübersteht, kann ausgeschlossen werden, daß der große inhibitorische Effekt von Humanserum auf die Invasion lediglich auf eine Verringerung der Adhäsion zurückzuführen ist. Anders wirkt sich Humanserum auf die Adhäsion von *L. innocua* und *L. monocytogenes* $\Delta prfA$ an HBMEC aus. Hier kommt es zu einer durch Humanserum bedingten 4fachen Erhöhung der Adhäsion an HBMEC.

Bei der Infektion von HBMEC mit *Listeria monocytogenes* EGD ist es unerheblich, ob die Bakterien auf die Zellen zentrifugiert werden oder nicht. Die Invasionsrate von *Listeria monocytogenes* EGD wird nicht wie bei HUVEC durch eine Zentrifugation erhöht. Diese Aussage ist aber nur für den invasiven Wildtyp gültig. Zentrifugiert man hingegen die unter Standardbedingungen in HBMEC nicht-invasive Art *L. innocua* oder *L. monocytogenes* $\Delta prfA$ auf HBMEC, so scheinen diese Bakterien infolge der Zentrifugation von HBMEC aufgenommen zu werden. *L. monocytogenes* $\Delta prfA$ erreicht dabei Invasionsraten, die etwa denen der Hälfte des Wildtyps entsprechen (s. Abb. 2.11). Ohne eine Zentrifugation beträgt die Invasionsrate von *L. monocytogenes* $\Delta prfA$ im Vergleich zum Wildtyp hingegen nur 2,5 % (s. Abb. 2.11). Dies ist ein weiteres Beispiel dafür, daß sich Infektionsbedingungen - hier die Zentrifugation - nicht auf alle Bakterienstämme gleichermaßen auswirken. Es ist anzunehmen, daß die Invasionsrate des Wildtyps auch ohne Zentrifugation der maximal möglichen Invasionsrate von *Listeria monocytogenes* EGD in HBMEC entspricht. Bei den sonst nicht oder nur wenig invasiven Listerien *L. innocua* oder *L. monocytogenes* $\Delta prfA$ kann hingegen die Aufnahme in HBMEC durch eine Zentrifugation verstärkt werden.

Würde man die Invasionsraten von *L. monocytogenes* EGD, *L. innocua* und *L. monocytogenes* $\Delta prfA$ in HBMEC in einem Invasionsexperiment miteinander vergleichen, in welchem die Bakterien in Medium mit Humanserum auf die Zellen zentrifugiert würden, so könnte man, bedingt durch die gegenläufigen Auswirkungen dieser Infektionsbedingungen,

vermutlich keine Invasionsunterschiede feststellen.

Neben der Zentrifugation und der Zusammensetzung des Infektionsmediums unterscheiden sich viele in der Literatur beschriebenen Infektionsbedingungen noch bezüglich der MOI und der Aufbereitung der in der Infektion verwendeten Bakterien. Was die Bakterien betrifft, so wurden in der vorliegenden Arbeit ausschließlich Glycerinkulturen (siehe 5.4) verwendet. Andere Arbeitsgruppen bevorzugen „frische“ Listerien, die kurz vor der Infektion die mittlere logarithmische Phase erreicht haben und dann mit PBS gewaschen wurden. Beide Ansätze führten in Kontrollexperimenten zu den gleichen Ergebnissen. Die Unterschiede wirken sich somit nicht auf die Invasivität von Listerien in HBMEC aus. Weder Glycerin (bis 10 % Vol.) noch die Lagerung der Glycerinkulturen bei -80 °C beeinträchtigen die Invasivität von *L. monocytogenes* in HBMEC.

Die hier problematisierten Infektionsbedingungen stellen nur einen kleinen Ausschnitt von in Invasionsexperimenten relevanten Faktoren dar. Infektionszeiten, Gentamycinkonzentrationen oder aber Probleme, die sich aus der Beschichtung von Zellkulturmaterial ergeben (unspezifische Adhäsion) können jedoch die Ergebnisse von Zellkulturexperimenten ebenso beeinflussen.

3.5.1 Zellbedingte Einflüsse

Wie bereits in 1.4 angedeutet, können sich Endothelzellen je nach Herkunft und Funktion morphologisch und in ihrer Genexpression voneinander unterscheiden. Es ist daher problematisch, Ergebnisse, die auf unterschiedlichen Endothelzell-Typen beruhen, miteinander zu vergleichen. Weiter komplizierend kann sich der Umstand auswirken, daß sich selbst Zellen eines Typs in ihrer Fähigkeit, *L. monocytogenes* zu internalisieren, unterscheiden können. Proliferierende Zellen werden von *L. monocytogenes* besser invadiert als nicht proliferierende Zellen (Velge *et al.*, 1997). Daher ist es nicht verwunderlich, daß die Invasionsraten von *L. monocytogenes* in immortalisierten Zell-Linien besonders hoch sind (Velge *et al.*, 1994). In den genannten Publikationen beschränkte man sich auf Epithelzellen, Nierenzellen und Fibroblasten, es ist aber auch denkbar, daß sich diese Ergebnisse auf Endothelzellen übertragen lassen. In Velge *et al.*, 1994 wurden die primären Ausgangszellen, ebenso wie die in der vorliegenden Arbeit verwendeten HBMEC, mit dem SV40 „large T“-Onkogen transfiziert und damit immortalisiert. Ein Vergleich erscheint daher nicht abwegig. Wodurch die Veränderung in den transformierten Zellen bewirkt wird, ist noch unbekannt. Unter vergleichbaren Infektionsbedingungen beträgt die Invasionsrate von *L. monocytogenes* in primären HUVEC 0,5 % und in immortalisierten HBMEC oft mehr als 5 %. Dies entspricht einer 10fach höheren Invasionsrate. Obwohl es sich dabei um verschiedene Zell-Typen handelt, könnte dies einen Hinweis darauf liefern, daß in HBMEC eine Immortalisierung ebenfalls eine Erhöhung der Invasionsrate von *L. monocytogenes* bewirkt. Ferner wurde in Velge *et al.*, 1994 beschrieben, daß immortalisierte Zellen ihre Fähigkeit verlieren, in Zellkultur hohe elektrische Widerstände aufzubauen. Auch dies wurde bei den von mir verwendeten konfluenten HBMEC beobachtet. Um den Einfluß der Immortalisierung auf die Invasivität von *L. monocytogenes* in HBMEC bestimmen zu können, wäre es daher zweckmäßig, auch Versuche mit primären HBMEC durchzuführen.

4 Material

Alle nicht näher aufgeführten Chemikalien und Antibiotika wurden von den Firmen Bio-Rad, Ferak, Gibco BRL, Merck, Roth, Serva, Sigma und USB bezogen. Nährmedien und Agarose stammen von Difco (Augsburg), Gibco-BRL (Berlin) oder Merck (Darmstadt). Die für die Zellkultur verwendeten Medien, Additive und Antibiotika stammen von Gibco-BRL. *Taq*- und *Pfu*-DNA-Polymerasen für die PCR stammen von Eurogentech (Seraing, Belgien), MWG (Ebersberg), Stratagene oder New England Biolabs. Der IL-8 ELISA stammte von R&D Systems (Minneapolis), der „Mycoplasma Detection Kit“ von Boehringer Mannheim.

4.1 Bakterienstämme

Stamm	Genotyp	Merkmale	Herkunft/Referenz
<i>L. monocytogenes</i>			
Sv 1/2a EGD *		Wildtyp	Stammsammlung
NCTC 7973		Hyperhämolytisches Isolat	Stammsammlung
LM-GFP	<i>PactA::gfp</i>	Exprimiert GFP unter der Kontrolle des <i>actA</i> Promotors	Dietrich <i>et al.</i> , 1998
10403S		Wildtyp	Portnoy <i>et al.</i> , 1988
DP-L2161	Δhly	„In-frame“-Deletion in <i>hly</i> Isogen zu 10403S	Jones und Portnoy, 1994
pkp-1	$\Delta(plcA-plcB)$	Verlust des vollständigen PrfA-abhängigen Genclusters (<i>plcA</i> - <i>plcB</i> dazwischen: Km ^R)	Engelbrecht <i>et al.</i> , 1996
P14A	P14A	hyperhämolytisches Isolat	Vega <i>et al.</i> , 1998
P14A $\Delta actA$	P14A $\Delta actA$	$\Delta actA$ -Mutante von P14A	J.A. Vásquez-Boland
M3	<i>hly</i> ⁻	Tn916-Insertionsmutante in SLCC 5764	Kathariou <i>et al.</i> , 1987
A42	$\Delta prfA$	„In-frame“-Deletion in <i>prfA</i>	Böckmann <i>et al.</i> , 1996
A49	$\Delta actA$	„In-frame“-Deletion in <i>actA</i>	Hauf <i>et al.</i> , 1997
A76	$\Delta inlA$	„In-frame“-Deletion in <i>inlA</i>	Greiffenberg <i>et al.</i> , 1997
WL-111	$\Delta inlB$	„In-frame“-Deletion in <i>inlB</i>	Greiffenberg <i>et al.</i> , 1997
$\Delta inlC$	$\Delta inlC$	„In-frame“-Deletion in <i>inlC</i>	Engelbrecht <i>et al.</i> , 1996
WL-112	$\Delta inlAB$	„In-frame“-Deletion in <i>inlAB</i>	Greiffenberg <i>et al.</i> , 1997

$\Delta inlGHE$	$\Delta inlGHE$	„In-frame“-Deletion in <i>inlGHE</i>	Raffelsbauer <i>et al.</i> , 1998
$\Delta inlG$	$\Delta inlG$	„In-frame“-Deletion in <i>inlG</i>	Raffelsbauer <i>et al.</i> , 1998
$\Delta inlABGHE$	$\Delta inlABGHE$	„In-frame“-Deletion in <i>inlABGHE</i>	Raffelsbauer <i>et al.</i> , 1998
<i>L. innocua Sv6a</i>		Wildtyp	Stammsammlung
<i>L. ivanovii</i>		Wildtyp	Stammsammlung

* Wird im Text als Wildtyp, *L. monocytogenes* oder *L. monocytogenes* EGD bezeichnet.

4.2 Zelllinien

4.2.1 Primäre Zellen

Nabelschnurendothelzellen (HUVEC)

HUVEC wurden von Herrn Prof. Dr. H. J. Schnittler (Anatomisches Institut, Würzburg) bezogen (Schnittler *et al.*, 1993). Für die Versuche wurden Zellen in der Passage 2-3 verwendet. Das Kulturmedium enthält Penicillin G (5 U/ml) und Streptomycin (50 μ g/ml). 12 Stunden vor der Infektion wurde das Antibiotika-haltige Medium gegen Antibiotika-freies Medium ausgetauscht.

4.2.2 Transformierte Zellen

Endothelfusionszelllinie EA.hy-926

Fusion aus HUVEC mit epithelialen Lungenkarzinomzellen A549 (ATCC: CCL-185) (Edgell *et al.*, 1983).

P388D₁-Makrophagen

(ATCC: TIB-63): Makrophagen-ähnliche Zell-Linie (Maus).

Vero-Zellen

(ATCC: CCL-81): Nierenzellen der afrikanischen grünen Meerkatze.

Caco-2-Zellen

(ATCC: HTB-37): Humane Colon-Darmepithelzellen (Adenocarcinom). In der vorliegenden Arbeit wurde ein auch als „subclone 1“ bezeichneter Klon verwendet, der sich durch die Bildung eines besonders dichten Bürstensaumes auszeichnet (Peterson und Mooseker, 1992).

Mikrovaskuläre Hirnendothelzellen (HBMEC)

HBMEC entstammen einer Biopsie aus dem Gehirn einer an Epilepsie erkrankten, erwachsenen Frau und wurden entsprechend der Anleitung kultiviert (Stins *et al.*, 1994). Die Zellen wurden mit dem SV40-Large-T-Antigen transfiziert. Die so immortalisierten Zellen exprimieren den Faktor VIII, die Karboanhydrase IV und *Ulex europaeus* Agglutinin I. Sie nehmen fluoreszenzmarkiertes acetyliertes „Low Density“ Lipoprotein (LDL) auf und exprimieren

den hirnendothelzell-spezifischen Marker Gamma-Glutamyl-Transpeptidase (Stins *et al.*, 1997). Die morphologischen und funktionalen Eigenschaften der Zellen konnten bis zur 30. Passage nachgewiesen werden. HBMEC sind polarisiert und weisen einen transendothelialen elektrischen Widerstand von 100-200 Ωcm^2 auf (Stins *et al.*, 1994; Ring *et al.*, 1998). HBMEC wurden in Antibiotika-freiem HBMEC-Medium in 75 ml Zellkulturflaschen, die zuvor mit Gelatine beschichtet wurden, kultiviert. Die Zellen wurden zweimal pro Woche mit unverdünnter Trypsin-EDTA-Lösung in einem Verhältnis von 1:4 passagiert. Für die Versuche in dieser Arbeit wurden Passagennummern zwischen 8 und 16 verwendet. Die Zellen wurde mit dem Mycoplasma Detection Kit (Boehringer Mannheim) negativ auf Mycoplasmen getestet.

4.3 Bakterien- und Zellkultur

Alle verwendeten Materialien sind vor Gebrauch autoklaviert steril verpackt geliefert oder autoklaviert worden. Die Trockensubstanzen für die Bakterienkultur wurden von Difco und Gibco BRL geliefert. Die Zellkulturreagenzien stammen von Gibco BRL.

Medien mit Agarzusatz und Flüssigmedien zur Bakterienkultur wurden 20 min bei 120 °C autoklaviert. Zur Herstellung der Agarplatten wurden ca. 25 ml der handwarmen Lösung in Petrischalen ($\emptyset = 10$ cm) gegossen. Nach dem Erstarren und dem Trocknen können diese für maximal zwei Monate im Kühlraum gelagert werden.

4.3.1 Verbrauchsmaterial

Einmalpipetten (10 ml)	Costar
Transwell ©	Costar
Filter- $\emptyset = 6,5$ mm	
Porendurchmesser: 3 μm	
Zellkulturplatten („Multi-Well“)	Costar (TC-behandelt)
Petrischalen	Costar
Kulturschalen ($\emptyset = 60-85$ mm)	Greiner (TC-behandelt)
Kulturflaschen (50 ml)	Costar (TC-bahandelt)
Kulturflaschen (250 ml)	Costar (TC-behandelt)

4.3.2 Medien für Eukaryontenzellen

Das HBMEC-Medium wurde vor dem Aliquotieren (in 250 ml Flaschen) sterilfiltriert. Das verwendete Humanserum entstammte einem Serumvorrat, der durch die Vereinigung vieler Seren von gesunden Spendern zustande kam. Für alle in dieser Arbeit mit Humanserum durchgeführten Experimente wurde Serum aus demselben Vorrat verwendet. P388D₁-Makrophagen und EA.hy-926-Zellen wurden in RPMI-Komplettmedium kultiviert.

RPMI-Komplettmedium:

FCS (hitzeinaktiviert)		50	ml
L-Glutamin	(200 mM Lsg.)	5	ml
RPMI 1640-Medium		ad 500	ml

HBMEC-Medium:

FCS (hitzeinaktiviert)		50	ml
L-Glutamin	(200 mM)	5	ml
NuSerum IV (hitzeinaktiviert)		50	ml
Non-Essential Amino Acids	100x	5	ml
MEM-Vitamins	100x	5	ml
Heparin	(5 U/ml)	0,5	ml
Pyruvat	(10 mM)	5	ml
ECGS*	(30 mg/ml)	5	ml
RPMI 1640-Medium		ad 500	ml

* Lyophilisiertes ECGS enthält herstellungsbedingt neben dem ECGS-Protein noch NaCl und Streptomycinsulfat
 → HBMEC-Medium ist somit ein Antibiotika-haltiges Medium.

HUVEC-Medium:

Humanserum (nicht-hitzeinaktiviert)		100	ml
L-Glutamin	(200 mM)	5	ml
Heparin	(5 U/ml)	5	ml
M199-Medium		ad 500	ml

Caco-2-Medium:

FCS (hitzeinaktiviert)		50	ml
L-Glutamin	(200 mM)	5	ml
Non-Essential Amino Acids	100x	5	ml
MEM-Vitamins	100x	5	ml
Transferrin (human)	4 mg/ml	1,5	ml
Dulbeccos Mod. Eagle Medium		ad 500	ml

4.3.3 Medien für die Listerienkultur

BHI (Brain Heart Infusion) als Ausgangssubstanz für Flüssigmedium wurde von Gibco-BRL (Berlin) bezogen. Zum Plattengießen hingegen wurde BHI von Merck (Darmstadt) verwendet. Die Lösung in H_2O_{dest} wurde autoklaviert. Sollten BHI-Platten gegossen werden, so wurde die Lösung zuvor auf ca. 55 °C abgekühlt.

BHI-Medium:

BHI		38	g
H_2O_{dest}		ad 1000	ml

BHI-Platten:

Agar	12	g
BHI-Medium	ad 1000	ml

4.3.4 Lösungen und Waschpuffer

Soweit nicht anders aufgeführt, wurden alle Puffer und Lösungen mit deionisiertem H₂O hergestellt, autoklaviert bzw. sterilfiltriert oder aus bereits sterilen Lösungen hergestellt. Sollte eine Beschreibung der Zusammensetzung nötig sein, so erfolgt sie an entsprechender Stelle im Methodenteil. Die verwendeten Chemikalien hatten den Reinheitsgrad „pro analysis“ (p. a.). Um die Sterilität bei den Einmalverdünnungen zu gewährleisten, wurde das H₂O_{dest} in 500 ml Duranflaschen vorgelegt und die sterilen 20x Lösungen unter der Reinraumbank hinzugegeben.

20x PBS (Phosphat-gepufferte-Saline):

NaCl	160	g
KCl	4	g
Na ₂ HPO ₄ (wasserfrei)	23	g
KH ₂ PO ₄ (wasserfrei)	4	g
H ₂ O _{dest}	ad 1000	ml

20x Ca²⁺/Mg²⁺:

MgCl ₂ x 6 H ₂ O	2	g
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	2	g
H ₂ O _{dest}	ad 1000	ml

1x PBS:

20x PBS _{steril}	25	ml
H ₂ O _{dest}	ad 500	ml

1x PBS /(Ca²⁺/Mg²⁺):

20x PBS _{steril}	25	ml
20x Ca ²⁺ /Mg ²⁺	25	ml
H ₂ O _{dest}	ad 500	ml

4.3.5 Inhibitoren

Für die einzelnen Inhibitoren sind die Konzentrationen der Stammlösungen angegeben. Die Stammlösungen wurden bei -20 °C gelagert.

Cytochalasin D	(Sigma)	1 mM in Dimethylsulfoxid
Nocodazol	(Fluka)	10 mg/ml in Dimethylsulfoxid
Wortmannin	(Fluka)	500 μ M in Dimethylsulfoxid

4.3.6 Antikörper und fluoreszierende Latex-Kügelchen

Bezeichnung	Bindung an	Organismus	Arbeitskonz.	Herkunft
TRITC-Phalloidin	F-Aktin	-	1:20	Sigma
FITC-Phalloidin	F-Aktin	-	1:20	Sigma
K317 (monokl.)	p60	Maus	1:200	A. Bubert
IgM- IgG- IgA- Anti-human (Peroxid.gek.)	Humane-Ak	Ziege	1:1000	Sigma
IgM- IgG- IgA- Anti-Maus (Peroxid.gek.)	Maus-Ak	Ziege	1:1000	Sigma

Größe \varnothing	Farbe	Ex/Em (nm)*	Kügelchen/ μ l	Herkunft
1,0 μ m	gelb/grün fluoreszierend	505/515	$3,64 \times 10^7$	Eugene
0,2 μ m	gelb/grün fluoreszierend	505/515	$4,55 \times 10^9$	Eugene

* Ex = Extinktion; Em = Emission

4.3.7 Gereinigte Proteine

Bis auf p60, welches in einem Westernblot Verwendung fand, wurden alle anderen Proteine als Mediumzusatz in der Zellkultur eingesetzt. Albumin wurde in unterschiedlichen Reinheitsgraden bestellt. Als hochreines wird solches Albumin bezeichnet, das ausgewiesenermaßen keine Antikörper enthält.

Bezeichnung	Zusatz	Organismus	Arbeitskonz.	Herkunft
C1Q	Komplementfaktor	Mensch	0,01-0,1 mg/ml	Sigma
p60	Listerielles Protein	<i>L. monocytogenes</i>	1-2 μ g/ml	A. Bubert
Albumin	Serumprot. Fraktion V	Mensch	20-40 mg/ml	Sigma
Albumin	Serumprot.	Rind	20-40 mg/ml	Sigma

4.4 Elektronenmikroskopie

Sämtliche Puffer bzw. Lösungen wurden von Herrn Prof. Dr. Krohne (Biozentrum, Elektronenmikroskopie, Würzburg) bezogen. Soweit nicht gesondert vermerkt, wurden die Lösungen jeweils frisch angesetzt.

Phosphat-Puffer nach Sørensen:

Stammlösung A	Kaliumhydrogenphosphat	9,078	g
Stammlösung B	Dinatriumhydrogenphosphat	11,876	g
jeweils für A + B	H ₂ O _{dest}	ad 1000	ml

Cacodylatpuffer (0,2 M):

Cacodylsäure	Natriumsalz Trihydrat	42,8	g
HCL	(1 N)	auf pH 7,2	
	H ₂ O _{dest}	ad 1000	ml

Karnovsky-Reagenz:

Formaldehyd	(4%ig)	5,4	ml
Glutardialdehyd	(25%ig)	10	ml
	Cacodylatpuffer	ad 50	ml

4.5 Oligonukleotide

4.5.1 Oligonukleotide für die cDNA-Synthese

Oligo-dT-Primer (100 ng/ μ l) von Boehringer

4.5.2 Oligonukleotide für die PCR

Da in dieser Arbeit Genexpressionsstudien ausschließlich mit humanen Zellen durchgeführt wurden, sind die verwendeten Primer ebenfalls von humanen, veröffentlichten cDNA-Sequenzen abgeleitet. Die von MWG synthetisierten Oligonukleotide sind entsalzt, geschützt, gereinigt und in bidest Wasser gelöst.

IL-6, β -aktin, IL-1 β , IL-1 α , TNF- α , IL-8, MCP-1:
VCAM-1, ICAM-1, ELAM-1 von Pharmacia oder MWG

Gen:	Orient.:	Produkt: (bp)	5'-	3'-
β -Actin	sense	661	TGACGGGGTCACCCACACTGTGCCCATCTA	- 3'
	antisense		CTAGAAGCATTTGCGGTGGACGATGGAGGG	- 3'
TNF- α	sense	325	CCTTGGTCTGGTAGGAGACG	- 3'
	antisense		CAGAGGGAAGAGTTCCCCAG	- 3'

IL-6	sense	628	5'-	ATGAACTCCTTCTCCACAAGCGC	- 3'
	antisense		5'-	GAAGAGCCCTCAGGCTGGACTG	- 3'
IL-1 β	sense	331	5'-	AATTTTTGGGATCTACACTCTCCAGCTGTA	- 3'
	antisense		5'-	CTTCATCTTTGAAGAAGAACCTATCTTCTT	- 3'
IL-8	sense	199	5'-	TTTGCCAAGGAGTGCTAAAG	- 3'
	antisense		5'-	CTCCACAACCCTCTGCACCC	- 3'
MCP-1	sense	479	5'-	CAATCAATGCCCCAGTCACC	- 3'
	antisense		5'-	AGACCCTCAAAACATCCCAG	- 3'
VCAM-1	sense	450	5'-	TGATGACAGTGTCTCCTTCTTTG	- 3'
	antisense		5'-	ATCCCTACCATTGAAGATACTGG	- 3'
ICAM-1	sense	446	5'-	CGTGCCGCACTGAACTGGAC	- 3'
	antisense		5'-	CCTCACACTTCACTGTCACCT	- 3'
ELAM-1	sense	1149	5'-	GTCTTACAACACCTCCACGG	- 3'
	antisense		5'-	TTCAACACAAAACCCTGCTC	- 3'

4.6 Molekulargewichtsstandards

kb-DNA-Ladder (Stratagene)

12000	bp
10000	bp
9000	bp
8000	bp
7000	bp
6000	bp
5000	bp
4000	bp
3000	bp
2000	bp
1500	bp
1000	bp
750	bp
500	bp
250	bp

4.7 Geräte

Autoklaven	Webeco
Begasungsbrutschrank	Nunc Cellstar
Brutschrank	Heraeus
Computer	586 PentiumPro 200 , 128 MB Hauptspe., 8 MB Millenium Grafikk., 2x 4,3 GB SCSI HDisk
Densitometer	Hirschmann elscript 400
Drucker	HP-4500 N, color laser 600 dpi
Elektrophoresekammern	Mechanikwerkstatt des Instituts
ELISA-Reader	Bio-Rad

Feinwaage	Sartorius
Filme	Agfa Ortho 25
Graphikprogramm	Corel Draw 8.0
Grobwaagen	Sartorius
Horizontal-Gelkammern	Hartenstein, bzw. Nachbauten
Inverses Mikroskop	Leitz Labovert, Olympus CK2
Konfokales „Laser Scanning Mikroskop“	CLSM von Leica Lasertechnik
Kühlzentrifugen	Beckmann J2-21 und JJ-21B mit JA10- und JA20-Festwinkelrotoren, Sorvall RT 6000
Kritisch-Punkt Trocknungsanlage	CPD 030; BAL-TEC
Magnetrührer	Heidolph MR 1000
Mikropipetten	Eppendorf, Gilson
Mikrowellengerät	Siemens Meisterkoch electronic
Minifuge	Heraeus Sepatech Minifuge RF
pH-Meter	WTW pH 523, Metrohm-Herisau
Photometer	Klett-Summerson Photoelectric Colorimeter, Zeiss-Spektralphotometer DM 4 und PM 6
Rasterelektronenmikroskop	Zeiss DSM 926
Transmissionselektronenmikroskop	Zeiss EM10 at 80 kV
Röntgenfilmentwickler	Kodak M 35 X-OMAT Processor
Röntgenkassetten	Dr. Goos-Suprema
Rüttler	IKA-VIBRAX-VXR
Scanner	HP ScanJet 4c
Schüttelinkubator	Clim-O-Shake Braun-Melsungen, Infors AG
Spannungsgeräte	Consort E445, Bio-Rad 1000/500
Speed-Vac	Savant
Sterilbank	NuAire II Type A/B3, Heraeus Lamin Air HBB2448, Flow Gelaire
Thermoblock	Liebisch
Tischzentrifuge	Eppendorf 5412 und 5412 C, Hettich Microliter
Ultraschaller	Branson Sonic Power Comp. Sonifier B12
Widerstandsmeßgerät	Millicell-ERS (Millipore)
Zellzählkammer	Fuchs-Rosenthal
Zellzählgerät	Boskamp
Zellkulturzentrifuge	Universal 16R

5 Methoden

5.1 Statistik

Die absoluten Zahlen detektierter Bakterien in Invasions-, Adhäsion- und Assoziationsversuchen können von Versuch zu Versuch stark schwanken und dies, obwohl die Infektionsbedingungen scheinbar identisch sind. Um Ergebnisse aus unterschiedlichen Versuchen miteinander vergleichen zu können, müssen auch kleine Abweichungen in der Durchführung in die Interpretation der Daten miteinbezogen werden. Ferner ist von Bedeutung, daß Ergebnisse aus Zellkulturexperimenten generell starken Schwankungen unterworfen sind. Werden mehrere Experimente in einer Darstellung zusammengefaßt, handelt es sich stets um relative, prozentuale Werte zur Referenz. Alle hier aufgenommenen Einzelexperimente wurden mindestens dreimal wiederholt. Soweit nicht anders beschrieben, wurden die Experimente in 24er Napfplatten durchgeführt. Statistische Auswertungen wurden wie unten erläutert durchgeführt und graphisch umgesetzt. Für die statistischen Auswertungen wurde das Programm Excel (Vers. 97) verwendet.

5.1.1 Signifikanztest

Aus der Differenz zwischen den Mittelwerten zweier Versuchsgruppen darf nicht auf einen echten Unterschied zwischen beiden Versuchsgruppen geschlossen werden. Für eine solche Annahme müßte diese Differenz außerhalb der Streubreite beider Mittelwerte liegen. Für diese Problematik ist ein Testverfahren entwickelt worden, welches als t-Test bezeichnet wird. Die Formel dieser Teststatistik ist in Excel als Funktion: **TTEST** verfügbar. Es handelt sich hierbei um den sog. Studentschen t-Test mit der Syntax: **Matrix1;Matrix2;Seiten;Typ**. Will man unter Excel einen solchen t-Test durchführen, fügt man in ein beliebiges Feld die Funktion **TTEST** ein. In dem sich nun öffnenden Dialogfeld müssen die Syntax-Parameter eingetragen werden. Als **Matrix** werden jeweils die Zahlenkolonnen ausgewählt, deren Mittelwerte miteinander verglichen werden sollen. In der vorliegenden Arbeit kommt der zweiseitige (**Seiten = 2**) und ungepaarte (**Typ = 2**) t-Test zum Einsatz. Als zweiseitig wird der Test dann angesehen, wenn dem Experimentator nicht bekannt ist, ob sich die Mittelwerte von **Matrix1** und **Matrix1** unterscheiden. Bei einem **Typ2-t-Test** handelt es sich um zwei Stichproben gleicher Varianz. Als signifikant werden nur die ausgegebenen p-Werte des Tests erachtet, die $\leq 0,01$ sind. Hier liegt die Wahrscheinlichkeit, daß sich die Versuchsgruppen (**Matrix1;Matrix2**) wirklich unterscheiden, bei $\geq 99\%$.

5.1.2 Standardabweichung

Die in den Graphen angegebenen Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung der Meßwerte. In Excel wird aus einem beliebigen Feld heraus die Funktion **STABW** eingefügt

und anschließend die in die Berechnung aufzunehmenden Werte bestimmt. Es handelt sich dabei um die Standardabweichung einer Stichprobe. Da der Betrag dieser Abweichung vom Mittelwert immer gleich groß ist, erscheint es gerechtfertigt in der graphischen Darstellung die Standardabweichung nur in eine Richtung darzustellen.

5.2 Zellkultur

Alle verwendeten Zelllinien wurden im begasteten Brutschrank mit 5 % CO₂ bei 37 °C in ihrem entsprechenden Medium kultiviert. Die Eukaryontenzellen adhäreren am Boden von Gewebekulturflaschen oder -schalen. Eine Versorgung der Zellen erfolgt in der Regel alle 2-3 Tage. Die Gründe hierfür liegen in der Entfernung von Stoffwechselprodukten, von abgestorbenen Zellen und Zelltrümmern sowie in der Versorgung der Zellen mit frischen Nährstoffen und Wachstumsfaktoren. Folgende Regeln sind bei der Arbeit mit Zellkulturen zu beachten:

- Auch immortalisierte Zelllinien altern trotz ihre potentiellen Unsterblichkeit in der Zellkultur. Vergleichbare Ergebnisse sind immer nur in nahe beieinanderliegenden Passagen möglich. Wird eine Zelllinie durch die An- oder Abwesenheit bestimmter Marker charakterisiert und wurden diese Eigenschaften nur bis zu einer bestimmten Passage dokumentiert, so darf die Zell-Linie nur bis zu dieser Passage verwendet werden.
- Alles, was mit den Zellen in Berührung kommt oder kommen kann, muß steril sein oder zuvor mit 70%igem Ethanol desinfiziert werden (Arbeitsflächen, Hände, Geräte, Puffer, Medien, etc.).
- Alle Arbeiten mit Zellkulturen sind unter der Sterilbank auszuführen.
- Medien und Puffer sind vor ihrer Verwendung im Wasserbad vorzuwärmen, wobei 15 min ausreichen; längere Zeiten sind aufgrund der kurzen Halbwertszeiten bestimmter Komponenten zu vermeiden.
- Die Zeit außerhalb des Brutschrankes ist wegen der Gefahr der Auskühlung der Zellen so kurz wie möglich zu halten.
- Die Schraubverschlüsse von Gewebekulturflaschen müssen im Brutschrank leicht geöffnet, außerhalb immer zugeschraubt sein.

5.2.1 Beschichten der Zellkulturgefäße mit Gelatine

Viele Zelltypen sind entweder nicht oder nur sehr begrenzt in der Lage an unbeschichteten Oberflächen zu adhäreren. Die in dieser Arbeit verwendeten HBMEC können zwar auf unbehandelten Oberflächen adhäreren, da aber nicht bekannt ist, ob hierdurch wichtige Zellmerkmale verloren gehen, wurde die Kultivierungsvorschrift von Frau Dr. M. Stins eingehalten. Die Oberflächen der Kulturgefäße wurden zur Beschichtung mit einer frisch autoklavierten, 0,2%igen Gelantinelösung (Typ B, Sigma) benetzt. Überschüssige Gelantinelösung wurde abgezogen und der Gefäßboden über dem Bunsenbrenner leicht erwärmt. Nun waren Newtonsche-Ringe zu sehen. Die Flaschen bzw. Napfplatten trockneten in der Reinraumbank über Nacht. Am nächsten Tag wurden sie verschlossen. In diesem Zustand können sie bis zu 3 Monaten bei 4 °C gelagert werden.

5.2.2 Passagieren von Zellen mit Trypsin/EDTA

Sind die Zellen zu einem konfluenten Monolayer herangewachsen, stellen sie ihr Wachstum ein. Dieses Phänomen wird als dichteabhängige Inhibition oder Kontaktinhibition der Zellteilung bezeichnet. In den Kulturgefäßen, in denen die Zellen dieses Stadium überschritten haben, beginnt ein Alterungsprozeß der Zellen, welcher vermutlich von Stoffwechselprodukten der Zellen ausgelöst wird. Um diese negativen Einflüsse zu umgehen, müssen die Zellen in geringerer Dichte auf neue Kulturgefäße aufgeteilt werden; sie werden passagiert. Der erste Schritt ist die Ablösung der adhärennten Zellen vom Untergrund des Kulturgefäßes. Alle in dieser Arbeit verwendeten Zellen oder Zell-Linien lassen sich mit einer Trypsin/EDTA-Lösung vom Boden des Kulturgefäßes lösen und auf diese Weise leicht auf neue Kulturflaschen verteilen. Das Passagieren findet wie folgt statt:

1. Das Medium wird aus der Kulturflasche abgesaugt.
2. Sodann wird zweimal mit 1x PBS ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ gewaschen (Trypsin wird von zweiwertigen Ionen gehemmt).
3. Es folgt die Zugabe von unverdünnter Trypsin/EDTA-Lösung. Die Flasche wird kurz geschwenkt; der Zellmonolayer muß mit der Lösung bedeckt sein. Ca. 20 Sekunden warten.
4. Die Trypsin/EDTA-Lösung wird abgesaugt, die Kulturflasche für ca. 3-5 Minuten zurück in den Brutschrank gestellt.
5. In frischem Medium werden die sich ablösenden Zellen durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren verteilt.
6. Ein Teil dieser Zellsuspension wird in ein neues Kulturgefäß mit bereits vorgelegtem Medium pipettiert. Wird die Zellsuspension mit Kulturmedium 1:4 verdünnt, sind die Zellen nach zwei Tagen erneut konfluent. Verdünnt man sie 1:5, muß erst nach drei Tagen erneut passagiert werden.
7. Durch vorsichtiges Schwenken des Kulturgefäßes wird eine gleichmäßige Verteilung der Zellen erreicht.

Die Zellen adhäreren im Verlauf der nächsten 4-6 Stunden und dürfen in dieser Zeit keinen Scherkräften ausgesetzt werden.

5.2.3 Lebendzellzahlbestimmung von Eukaryontenzellen mit Trypanblau

Trypanblau ist ein nützliches Hilfsmittel zur Differenzierung zwischen lebenden und toten Zellen. Der Farbstoff dringt in tote Zellen sehr schnell ein, wird von lebenden Zellen hingegen nur sehr langsam aufgenommen. Unter dem Lichtmikroskop erscheinen daher tote Zellen blau, wodurch sie sich nicht vom blauen Hintergrund abheben. Lebende Zellen treten in kugeliger Gestalt als helle, deutlich vom Hintergrund abgrenzbare Formen in Erscheinung. Zur Bestimmung der Lebendzellzahl werden 50 μl Zellsuspension mit 50 μl Trypanblau gut gemischt und ein Tropfen dieser Suspension in eine Fuchs-Rosenthal-Kammer gegeben. Unter dem Lichtmikroskop wird dann die Anzahl der lebenden Zellen und gegebenenfalls auch die der toten Zellen bestimmt. Für eine gute Näherung sind

mindestens drei Großquadrate (bestehend aus 16 Kleinquadraten) auszuzählen. Über den Mittelwert ergibt sich die Lebendzellzahl pro ml wie folgt:

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

Z = Lebende Zellen/Großquadrat
 F_f = Verdünnungsfaktor (2)
 F_k = Kammerfaktor (10000)

5.2.4 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Eukaryontenzellen können über mehrere Jahre in flüssigem Stickstoff aufbewahrt werden. Die schädigende intrazelluläre Eisbildung wird durch Zugabe eines geeigneten Gefrierschutzmittels wie beispielsweise DMSO verhindert. Der allgemeine Grundsatz lautet: Langsam einfrieren, schnell auftauen. Eine Verlangsamung des Stoffwechsels durch Kühlung *vor* und schnelle Verdünnung *nach* dem Auftauen reduzieren die zytotoxischen Eigenschaften von DMSO auf ein Minimum.

Ausgangsmaterial zum Einfrieren ist eine Zellsuspension in Kompletmedium. Die Zellen werden dazu in 2 ml Medium resuspendiert. Während der Bestimmung der Lebendzellzahl (s. 5.2.3) wird die Zellsuspension auf Eis langsam heruntergekühlt. Mit Kompletmedium, Zellsuspension und DMSO wird eine Zelldichte von $1-2 \times 10^6$ Zellen/ml in 12 % DMSO (Endkonzentration) eingestellt. Mit 1 bis 1,5 ml der gut gemischten Suspension werden Kryoröhrchen beschickt. Die Gefrieröhrchen werden durch die Aufbewahrung in einem Styroporständler langsam über Nacht auf eine Temperatur von -70 °C abgekühlt. Nach 24 Stunden erfolgt die endgültige Lagerung in flüssigem Stickstoff. Schnelles Arbeiten und permanente Kühlung der Zellen auf Eis sind die Grundvoraussetzungen für eine verlustarme Prozedur.

Zum Auftauen der Zellen wird die Zellsuspension im Kryoröhrchen im 37 °C -Wasserbad erwärmt. Um eine Kontamination auszuschließen, ist die Benetzung des Deckels mit Wasserbadflüssigkeit zu vermeiden. Der Inhalt des Kryoröhrchens wird in ein Röhrchen mit vorgelegten 9 ml RPMI überführt. Die Zellen werden 10 min bei 1000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Das RPMI-Medium wird abgesaugt, das Zellpellet in vorgewärmtem Kompletmedium resuspendiert und in ein Kulturgefäß überführt. Um auch die letzten Reste DMSO zu entfernen, wird das Medium am folgenden Tag gewechselt.

5.2.5 Infektion von Endothelzellen mit Listerien und Bestimmung der Invasionsrate

Die Infektionsbedingungen wurden während der Dauer dieser Arbeit ständig optimiert. Neben dem Ziel, möglichst aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten, wurde auch versucht, mit den Kulturmedien so sparsam wie möglich umzugehen. In der sich anschließenden Auflistung wird der Infektionsprozeß am Beispiel einer Infektion von HBMEC mit Listerien erläutert. Weichen die Bedingungen in den Einzelversuchen von der folgenden Beschreibung ab, so wird dies an entsprechender Stelle vermerkt. Als Richtwert für die Teilungsgeschwindigkeit und Zellzahl, bei denen ein konfluenter Monolayer erreicht wird, gelten folgende Richtwerte:

Zelltyp	Bei Konfluenz	Teilung alle
EA.hy-926	1×10^5 Zellen/cm ²	18 h
HBMEC	1×10^5 Zellen/cm ²	12 h
HUVEC	2×10^4 Zellen/cm ²	?

1. Lebendzellzahlbestimmung (s. 5.2.3) einer Zellsuspension.
2. Aussäen der Zellen in das Kulturgefäß in einer solchen Dichte, daß zum Zeitpunkt der Infektion eine konfluente Zellkultur erreicht wird. Die Zellen werden in Kulturmedium ausgesät.
3. Beim Einsatz von Inhibitoren, werden die Zellen vor der eigentlichen Infektion mit PBS gewaschen und in Kulturmedium plus Inhibitor präinkubiert.
4. Um störendes Serum zu entfernen, werden die Zellen vor der Infektion noch ein weiteres Mal mit PBS gewaschen.
5. Nun werden die Listerien direkt aus einer Glycerinkultur in serumfreiem RPMI, das als Infektionsmedium dient, pipettiert. Die Menge richtet sich nach der eingesetzten Multiplizität der Infektion (MOI). Bei einer MOI von 20 befinden sich im Infektionsvolumen 20x mehr Listerien als Zellen im Napf. Um eine gleichmäßige Infektion zu erreichen, erfolgt die Infektion aus einem Mastermix.
6. Das Infektionsvolumen sollte möglichst gering sein. Es reicht, wenn die Zellen während der Infektion gerade mit Medium bedeckt sind. Schließt sich eine Zentrifugation an, so ist zu bedenken, daß die Zellen auch noch bei halb ausgeschwenktem Rotor mit Medium bedeckt sein müssen.
7. Die Infektionszeit beträgt 60 min. Werden HUVEC infiziert, so müssen die Listerien 10 min bei 1000 rpm auf die Zellen zentrifugiert werden, um eine effiziente Infektion zu erreichen. Bei HBMEC reicht die reine Sedimentation vollkommen aus. Um eine unspezifische Aufnahme möglichst auszuschließen, sollte man, soweit dies möglich ist, auf die Zentrifugation verzichten.
8. Danach werden extrazelluläre Bakterien durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt. Adhärenente Bakterien werden durch die Zugabe von Gentamycin-haltigem Medium (100 µg/ml) abgetötet. Bei Inkubationen, die länger als 1 Stunde dauern, wird die Konzentration von Gentamycin auf 10 µg/ml verringert. Diese sogenannte Post-Infektionszeit findet immer in Kulturmedium mit Serum statt. Über längere Zeiträume und in hohen Konzentrationen kann Gentamycin in die Eukaryontenzellen eindringen und das intrazelluläre Überleben der Listerien beeinflussen (Drevets *et al.*, 1994).
9. Soll die Zahl der intrazellulären Listerien bestimmt werden, wird der Ansatz noch 2x mit PBS gewaschen, wodurch Gentamycinreste entfernt werden.
10. Zugabe von 1 ml H₂O_{dest} (eiskalt) pro Napf. Die Zellen schwellen 10 min bei 4 °C.
11. Um die intrazellulären Listerien freizusetzen, wird jeder Napf separat ultrabeschallt. Hierzu wird der Schallkopf in den Napf abgesenkt und die Zellen in H₂O_{dest} auf Stufe 3-4 ca. 1 sec lang beschallt.

12. Das Zell-Lysat eines Napfes wird in ein Röhrchen überführt. Der Napf wird mit 1 ml eiskaltem PBS gespült und das abgezogene PBS im entsprechenden Röhrchen mit dem Zell-Lysat vereint.
13. Das Zell-Lysat wird in 150 mM NaCl verdünnt und in entsprechenden Verdünnungen auf BHI-Platten ausplattiert.
14. Aus der Anzahl der über Nacht gewachsenen Kolonien kann auf die Anzahl der Bakterien im Lysat geschlossen werden. Die Invasionsrate errechnet sich aus der Zahl invadierter Bakterien (= Bakterienzahl im Lysat) in Prozent zur eingesetzten Bakterienzahl.

5.2.6 Bestimmung der Adhäsion von Listerien an bzw. der Assoziation mit Endothelzellen

Wird in dem oben beschriebenen Infektionsexperiment auf die Post-Infektionszeit in Gentamycin-haltigem Medium verzichtet und dadurch extrazelluläre Bakterien nicht abgetötet, befinden sich nach der Lyse der Zellen im Zell-Lysat sowohl an Endothelzellen gebundene als auch von Endothelzellen aufgenommene Listerien. Hierbei kann nicht zwischen intra- und extrazellulären Bakterien unterschieden werden. Verhindert man allerdings die Aufnahme der Bakterien in die Zellen mit dem Inhibitor Cytochalasin D, befinden sich anschließend im Zell-Lysat nur zuvor an Endothelzellen gebundene Listerien. Ein solcher Versuchsansatz wird als Adhäsionsexperiment bezeichnet. Um sicherzustellen, daß der Inhibitor die Aufnahme der Bakterien in die Endothelzellen schon zu Infektionsbeginn effektiv hemmt, wurden die Zellen für 45 min in Kulturmedium, welches den Inhibitor enthält, präinkubiert. Die sich anschließende Infektion fand ebenfalls in Anwesenheit von Cytochalasin D, diesmal in serumfreiem RPMI-Medium, statt. Nach der Infektion wurden die Zellen 5x mit PBS gewaschen, in H_2O_{dest} lysiert und das Lysat in unterschiedlichen Verdünnungsstufen auf BHI-Platten ausplattiert (s. 5.2.5). Eine unerwünschte Nebenwirkung des F-Aktin depolymerisierenden Cytochalasin D ist die starke Veränderung der Zellmorphologie. Gerade Endothelzellen, deren Phänotyp bei Konfluenz lang und ausgestreckt ist, kugeln sich stark ab und verlieren auf diese Weise leicht den Kontakt zur Zellkulturoberfläche. In einem alternativen Versuchsansatz wurde auf das Cytochalasin D im Medium verzichtet. Um die Anzahl intrazellulärer Bakterien bei Infektionsende möglichst gering zu halten, wurde die Infektionsdauer auf 30 min verkürzt. Es erfolgte keine Präinkubation. Diesen Versuchsansatz bezeichnet man als Assoziationsexperiment.

5.2.7 Intrazelluläre Vermehrung

Listerien sind in der Lage, sich in Eukaryontenzellen intrazellulär zu vermehren. Zur Untersuchung und Quantifizierung dieser Vermehrung wurden die Zellen nach der Infektion mit Listerien (s. 5.2.5) für weitere 1-18 Stunden in Kompletmedium inkubiert. Die extrazellulären Listerien wurden mittels Gentamycin abgetötet. Nach dieser Post-Infektionszeit wurden die Zellen zweimal mit 1x PBS gründlich gewaschen. Ohne diesen Waschschienevorgang wären die nach der Lyse freigesetzten Listerien noch einer hohen Dosis Gentamycin ausgesetzt. Im Anschluß daran wurden die Zellen lysiert und das Lysat in unterschiedlichen Verdünnungsstufen auf BHI-Platten ausplattiert. Mit dieser Methode wird die intrazelluläre Vermehrung und die Fähigkeit zur interzellulären Ausbreitung von Listerien in Wirtszellen erfaßt (s. Abb. 2.22).

5.2.8 Zwei-Zell-Modell mit Caco-2-Zellen und HBMEC auf Transwell-Filtern

Die Transwell-Zellkulturplatten bestehen aus einer 24er Napfplatte, in deren Nöpfen sich herausnehmbare Membraneinsätze befinden. Diese Einsätze teilen den Napf in zwei Kompartimente. Der Durchmesser der in dieser Arbeit verwendeten Membraneinsätze betrug 6,5 mm, der Porendurchmesser der Membran 3 μm . Die Membranen waren durch eine

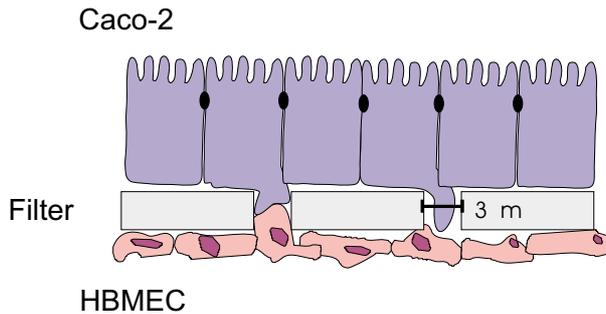


Abbildung 5.1:
Schematische Darstellung eines
Zwei-Zell-*in-vitro*-Modells mit Caco-
2-Epithelzellen und HBMEC auf
einem Transwell-Filter mit einem
Porendurchmesser von 3 μm .

spezielle Behandlung positiv geladen, aber nicht beschichtet. Die positive Ladung soll den negativ geladenen Zelloberflächen die Adhäsion an die Membran erleichtern. Das Volumen des unteren Kompartiments beträgt 600 μl , das des oberen nur 100 μl . Ein Zweizellsystem, in welchem Caco-2-Zellen und HBMEC durch die Membran voneinander getrennt kultiviert werden können (s. Schema in Abb. 5.1), wurde wie folgt etabliert:

1. Ziel der ersten Schrittes ist es, einen möglichst dichten Monolayer von Caco-2-Zellen zu erhalten. Da dies ca. 12-14 Tage dauern kann, müssen die Caco-2-Zellen zeitlich vor den HBMEC ausgesät werden. Hierzu werden die Membraneinsätze auf den Kopf gestellt. Eine Zellsuspension von Caco-2-Zellen wird so eingestellt, daß sich in 100 μl 3 x 10⁵ Zellen befinden. Diese 100 μl werden vorsichtig als Tropfen auf den Filter pipettiert. Die Zellen benötigen etwa 6 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂, um zu adhären. Nach dieser Zeit wird der Medientropfen abgeklopft, wobei die adhären Zellen auf dem Filter verbleiben. Der Membraneinsatz wird nun in normaler Orientierung in einen Napf abgesenkt, in dem 600 μl Caco-2-Medium vorgelegt wurde. Jetzt werden 100 μl Caco-2-Medium in das obere Kompartiment gegeben. Die Medien werden alle 2-3 Tage gewechselt.
2. Nachdem die Caco-2-Zellen ihre optimale Dichte erreicht haben, werden nun HBMEC auf die andere Seite gesät. Hierzu werden 0,5 x 10⁵ HBMEC in 100 μl HBMEC-Medium suspendiert und diese Zellsuspension in das obere Kompartiment pipettiert. Nach zwei Tagen werden die Medien gewechselt, wobei zu beachten ist, daß es sich um unterschiedliche Medien handelt.
3. Vier Tage nachdem die HBMEC ausgesät wurden, kann das Zellsystem auf Ionen-durchlässigkeit überprüft werden. Während der Widerstandsmessung dürfen die Elektroden die Zellen nicht berühren.
4. Soll eine Infektion folgen, so ist prinzipiell wie in 5.2.5 zu verfahren. Die Infektionsvolumina sind denen der Kompartimente anzupassen. In der Zeit nach der Infektion wird für jeden Zelltyp das entsprechende Kulturmedium verwendet.

5.2.9 Widerstandsmessungen

Da in der Zellkultur der elektrische Widerstand üblicherweise in Ωcm^2 angegeben wird, das Meßgerät aber nur den absoluten Widerstand anzeigt, ist dieser noch mit der Fläche in cm^2 zu multiplizieren.

5.2.10 Giemsa-Färbung

Der Giemsa-Farbstoff färbt sowohl eukaryontische Zellen als auch Bakterien. Unter dem Lichtmikroskop sind die Bakterien nach einer solchen Färbung dunkelblau bis schwarz gefärbt und somit deutlich von anderen angefärbten Strukturen zu unterscheiden. Es kann jedoch nicht zwischen intrazellulären und extrazellulären Bakterien unterschieden werden. Die Zellen können entweder auf Deckgläschen oder in ausreichend großen Schalen kultiviert werden. Sollen die infizierten Zellen direkt nach der Infektion Giemsa-gefärbt werden, müssen sie 5x mit 1x PBS gewaschen werden. Werden die Zellen nach der Infektion noch weiter in Medium inkubiert, müssen sie vor der Fixierung nur 2x mit 1x PBS gewaschen werden. Die Zellen werden 5 min bei RT in Methanol fixiert und danach vollständig an der Luft getrocknet. Es folgt eine 20minütige Färbung in frisch angesetzter Giemsa-Lösung (Giemsa/ H_2O_{dest} , 1:20). Das gefärbte Präparat wird solange vorsichtig mit H_2O_{dest} gewaschen, bis es kaum noch abfärbt. Nach der Lufttrocknung wird das Präparat unter dem Lichtmikroskop im Hellfeld bei 100facher Vergrößerung ausgewertet. Das Immersionsöl kann dabei direkt auf die Zellen getropft werden. Sollen die Präparate länger gelagert werden, empfiehlt es sich Deckgläschen zu verwenden. Diese werden nach der Lufttrocknung auf Objektträgern mit Nagellack eingedeckelt.

5.3 Zytokin-Transkriptionsuntersuchungen

Wie in 1.3 und 1.3.1 beschrieben, reagieren Endothelzellen auf eine Infektion mit der Produktion bestimmter, immunologisch relevanter Faktoren. Hierzu zählen u.a. Oberflächenmoleküle, Zytokine oder Zytokinrezeptoren. Zum Nachweis einer durch die Infektion bedingten, veränderten Genexpression unterscheidet man zwei Verfahren:

- Direkter Nachweis
- Indirekter Nachweis

Den Nachweis von Proteinen im Zellkulturüberstand bezeichnet man als direkten Nachweis (z.B. ELISA). Im indirekten Nachweis werden z.B. RNA-Transkripte von Zytokingenen im Zell-Lysat nachgewiesen. Da zwischen der Transkription und der Sekretion noch Regulationswege zwischengeschaltet sind, können über den indirekten Nachweis keine Aussagen darüber getroffen werden, ob die nachgewiesenen Transkripte auch zu Proteinen translatiert und diese später sezerniert werden. Zum Nachweis der Zytokin-mRNA wird diese mittels Reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Die Polymerase-Kettenreaktion ist die derzeit sensitivste Methode zur selektiven Amplifizierung bestimmter DNA-Abschnitte. Die zur Amplifikation benötigten Oligonukleotide wurden von bekannten Sequenzen abgeleitet. Zum Schluß können die PCR-Produkte in TBE-Agarosegelen aufgetrennt und mittels Ethidiumbromid sichtbar gemacht werden.

5.3.1 RNA-Isolation aus Endothelzellen

Die Methode wurde wie im Kapitel 4.2.4 in „Current Protocols in Molecular Biology“ beschrieben durchgeführt. Dabei handelt es sich um eine von RICHARD SELDEN veränderte Methode aus Chirgwin *et al.*, 1979.

Die Denaturierungslösung besteht aus 50 ml der Stocklösung, die mit 0,35 ml 2-Mercaptoethanol komplettiert wird. Die fertige Lösung ist einen Monat lang bei RT haltbar. Zur Herstellung der Stocklösung werden folgende Komponenten bei ca. 60 °C unter Rühren gelöst und können ca. drei Monate bei Raumtemperatur aufbewahrt werden:

Stocklösung	
H ₂ O	293,0 ml
0,75 M Natriumcitrat pH 7	17,6 ml
10 % Sarkosyl (N-lauroylsarcosine)	26,4 ml
Guanidiniumthiocyanat	250 g
Denaturierungslösung	
Stocklösung	50 ml
+ 2-Mercaptoethanol	0,35 ml

Ausgangsmaterial zur Isolation der Gesamt-RNA sind Zellen, die in 60 mm-Schalen mit *L. monocytogenes* infiziert wurden. Weiter wird wie unten beschrieben verfahren. Jeder Fällungsschritt mit eiskaltem Isopropanol kann bis auf unbestimmte Zeit unterbrochen werden:

1. Das Medium wird abgezogen und ohne Waschen werden 500 μ l der Denaturierungslösung auf die Zellen pipettiert. Mit der Pipette ist das Lysat vorsichtig auf und ab zu pipettieren.
2. Das Homogenat wird in ein 1,5 ml Mikroreaktionsgefäß überführt. Dazu kommen:
 - 50 μ l 2 M Natriumacetat, pH 4 - vortexen
 - 500 μ l wassergesättigtes Phenol - vortexen
 - 100 μ l 49:1 Chloroform/Isoamyl-Alkohol stark vortexen und 15 min auf Eis
3. Zentrifugieren: 20 min bei 10 000 x g und 4 °C. Die obere Phase wird in ein neues Mikroreaktionsgefäß überführt. Die obere wässrige Phase enthält die RNA. Die DNA sowie Proteine befinden sich in der Interphase und unteren Phenol/Chloroformphase.
4. Zugabe von 500 μ l 100 % Isopropanol und Fällung der RNA bei -20 °C für 30 min. Anschließend wird für 10 min bei 10 000 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen.
5. Lösen des RNA-Pellets in 150 μ l Denaturierungslösung. Es werden 150 μ l 100 % Isopropanol dazupipettiert und die RNA erneut für 30 min bei -20 °C gefällt. Es folgt die Zentrifugation für 10 min bei 10 000 x g und 4 °C. Der Überstand wird verworfen.

6. Das RNA-Pellet wird in 225 μl 75 % Ethanol resuspendiert, gevortext und für 10 min bei RT inkubiert. Bei diesem Schritt werden die Reste von Guanidiniumthiocyanat entfernt.
7. Nach Zentrifugation für 5 min bei 10 000 x g und RT wird der Überstand verworfen und das Pellet in der Speedvac für 5 min getrocknet. Das Pellet darf nicht zu trocken sein, da es sich sonst nur noch sehr schwer lösen läßt.
8. Die RNA wird in 15 μl mit Diethylpyrocarbonat(DEPC)-behandeltes Wasser aufgenommen. Dazu ist das Pellet mehrmals zu erhitzen, zu mischen, zu zentrifugieren und wieder auf Eis abzukühlen. Diese Prozedur muß solange wiederholt werden, bis sich das Pellet gelöst hat. Die wässrige RNA-Lösung wird bei -80 °C aufbewahrt. DEPC-Wasser ist ribonucleasenfrei. Zur Herstellung werden 0,1 % (v/v) DEPC in $\text{H}_2\text{O}_{dest}$ ÜN bei 37 °C inkubiert. Nach dem Autoklavieren kann es verwendet werden.

5.3.2 cDNA-Synthese

Mit dieser Technik wird mRNA mittels Reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben.

1. Quantitative Bestimmung der RNA-Konzentration (Photometer bei 260 nm - siehe 5.3.5).
2. 10 μg der Gesamt-RNA werden in 32 μl DEPC- H_2O aufgenommen.
3. 3 μl Oligo-dT-Primer (100 ng/ μl) hinzupipettieren.
4. Ansatz 5 min bei 65 °C zur Denaturierung der RNA inkubieren.
5. 10 min bei RT zur Hybridisierung der Oligonukleotide an die Poly(A)-Sequenzen.
6. Pro Ansatz werden hinzugefügt:

5 μl	10x 1 st Strand Buffer
5 μl	0,1 M DTT
0,5 μl	RNase Inhibitor (33,7 U/ml)
3,75 μl	dNTPs (je 20 mM)
1 μl	MMLV- Reverse Transkriptase (20 U/ μl)
15,25 μl	

7. Inkubation 1 Stunde bei 37 °C, danach auf Eis

5.3.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion ermöglicht die selektive DNA-Neusynthese von zwischen zwei synthetischen Oligonukleotiden gelegenen DNA-Sequenzen mittels DNA-Polymerase. DNA-Mengen von 10^{-9} - 10^{-15} g können durch diese exponentielle Anreicherung nachgewiesen werden. Voraussetzung dafür ist, daß etwa 20 bp aus den Endbereichen der zu amplifizierenden DNA bekannt sind. Nach Hitzedenaturierung (94 °C) der dsDNA können die Oligonukleotidprimer mit diesen Sequenzen hybridisieren und mit Hilfe von thermostabilen DNA-Polymerasen verlängert werden. Weitere Zyklen von Denaturierung,

Primer-Hybridisierung und Polymerisation führen zu einer exponentiellen Vermehrung der Zielsequenz.

Die Ausgangs-DNA zur Amplifikation ist die zuvor synthetisierte cDNA (s. 5.3.2). Für einen Standard-PCR-Ansatz pipettiert man in ein Mikroreaktionsgefäß mit Schraubdeckelverschluß:

1. Vorgelegt werden pro Ansatz:

76 μl	H ₂ O
2 μl	cDNA (1:50 verdünnt mit H ₂ O)
2 μl	je Primer (100 ng/ μl)
82 μl	

2. Pro Ansatz kommen hinzu:

10 μl	Goldstar-Puffer
6 μl	25 mM MgCl ₂
1 μl	dNTP's (20 mM)
1 μl	Goldstar-Polymerase (0,5 U/ μl)
18 μl	

3. PCR unter folgenden Bedingungen:

Schritt	T [°C]	Dauer [min]	Erläuterung	Zyklen
1.	94	1	Alle Stränge werden getrennt	1x
2.	91	1	Strangtrennung	30x
3.	60	1	Annealing der Primer	
4.	72	1	Elongation	
5.	72	1	Alle Elongationen abgeschlossen	1x

4. Ansätze nach Programmende auf Eis

5.3.4 Horizontale Agarose-Gelelektrophorese

Die horizontale Agarose-Gelelektrophorese eignet sich zum Auftrennen von DNA-Fragmenten, welche aus einer Spaltung oder einer PCR hervorgehen. Die Agarosekonzentration richtet sich nach der Fragmentgröße. In dieser Arbeit wurden ausschließlich PCR-Produkte zwischen ca. 150 und 1000 bp aufgetrennt, was eine Agarosekonzentration von 2 % erfordert. Das im Puffer enthaltene Ethidiumbromid (EtBr) lagert sich in die DNA-Doppelstränge ein, was die Fragmente unter dem UV-Licht sichtbar macht. Die fluoreszierenden Banden können mit einer Kamera aufgenommen und auf einem Thermoprinter ausgegeben werden.

10 x TBE	
Tris	216 g
Borsäure	110 g
0,5 M EDTA	80 ml
ad 2000 ml H ₂ O	

Durchführung:

1. 5 g Agarose werden in 250 ml 1x TBE in der Mikrowelle aufgekocht und nach dem Abkühlen auf ca. 50 °C in einen mit Agarose abgedichteten Schlitten gegossen, in den die Kämme eingesenkt werden. Das Gel polymerisiert je nach Raumtemperatur in ca. 30 min.
2. Nach der Polymerisation wird der Kamm entfernt und das Gel in eine horizontale Gelelektrophoresekammer eingesetzt, in der es mit 1x TBE als Laufpuffer bedeckt sein muß. Wahlweise werden 100 µl EtBr (10 mg/ml) zu den 2 l Puffer oder 15 µl in den Gelansatz nach dessen Abkühlung pipettiert.
3. 12 µl PCR-Produkt werden zusammen mit 4 µl Stoppuffer (25 mM EDTA, 50 % Saccharose, 0,1 % Bromphenolblau) in jeweils eine Geltasche pipettiert. Es wird einmalig 10 µl Marker aufgetragen. Das Gel läuft ca. 1,5 h bei 150 V. Danach kann es unter UV-Licht betrachtet und photographiert werden.

5.3.5 Spektrophotometrische Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA

Zur Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren wird eine wässrige Verdünnung (1:100 oder 1:500) in einer Quarzglasküvette bei 260 nm mit H₂O_{steril} als Referenz gemessen. Zur Berechnung:

$$\begin{aligned}
 C_{dsDNA} [\mu\text{g}/\mu\text{l}] &\hat{=} \text{OD}_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 50 \mu\text{g}/\mu\text{l} \\
 C_{ssDNA} [\mu\text{g}/\mu\text{l}] &\hat{=} \text{OD}_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 20 \mu\text{g}/\mu\text{l} \\
 C_{ssRNA} [\mu\text{g}/\mu\text{l}] &\hat{=} \text{OD}_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 30 \mu\text{g}/\mu\text{l}
 \end{aligned}$$

5.4 Bereitstellung der Listerien zu Infektion und Lebendzellzahlbestimmung

10 ml BHI-Medium werden mit *L. monocytogenes* angeimpft. Die Kultur schüttelt aerob über Nacht bei 37 °C im Schüttelinkubator. Die Übernachtskultur wird mit BHI-Medium 1:50 verdünnt, bei 37 °C geschüttelt und in der mittleren logarithmischen Phase bei 180 KE geerntet:

- 10 min zentrifugieren (Minifuge, 10 min, 6000 rpm, 4 °C).
- Der Überstand wird verworfen und das Pellet zweimal mit je 10 ml kaltem 1x PBS gewaschen (Minifuge, 10 min, 6000 rpm, 4 °C).
- Resuspendierung des Pellets in 5 ml kaltem 1x PBS + 20 % Glycerin (v/v).

- Aufteilung der Suspension in 500 μl -Portionen in Eppendorf-Mikroreaktionsgefäße.
- Lagerung bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ für maximal 3 Monate.

Zur Lebendzellzahlbestimmung wird ein 500 μl -Aliquot der Glycerinkultur auf Eis aufgetaut und in Zehnerschritten bis 10^{-9} , mit 150 mM NaCl verdünnt. Je 100 μl der Verdünnungsstufen 10^{-5} – 10^{-9} werden auf je zwei BHI-Platten ausplattiert. Das Zählen der Bakterienkolonien erfolgt nach einer Inkubationsdauer von 24 Stunden (bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ im Bakterienbrutschrank). Die Anzahl Listerien pro ml errechnet sich aus der Kolonienzahl und der Verdünnungsstufe.

5.5 Mikroskopie

Für alle Versuche, die nicht am Lehrstuhl für Mikrobiologie, Biozentrum, Würzburg durchgeführt werden konnten, wurden Mikroskope aus dem Lehrstuhl für Elektronenmikroskopie von Prof. Dr. G. Krohne, Biozentrum, Würzburg verwendet.

5.5.1 Raster-Elektronenmikroskopie

Die Infektionsversuche wurden wie in 5.2.5 beschrieben, durchgeführt mit dem Unterschied, daß sich in den Näpfen der 24er-Zellkulturplatten beim Aussäen runde Deckgläschen ($\varnothing = 1,2\text{ cm}$) befinden. Die Zellen adhäreren an die unbehandelte Glasoberfläche. Am Ende der Infektion werden die Deckgläser wie folgt für die Mikroskopie vorbereitet:

1. Waschen mit PBS (in den Näpfen) um evtl. störendes Medium zu entfernen.
2. Fixierung in 6,25 % Glutardialdehyd in Sörensen-Puffer pH 7,4. Die Fixierung findet in den Näpfen über Nacht bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ statt.
3. 5x waschen mit Sörensen-Puffer (pH 7,4)
4. Entwässerung in aufsteigender Acetonreihe. Hierzu Deckgläser in ein Glasgefäß überführen. Bei der Entwässerung dürfen die Präparate nicht austrocknen. Die Schritte in 100 % Aceton sollten in den Behältnissen erfolgen, in denen anschließend das sog. „Kritische Punkt Trocknen“ stattfindet.

1x	15 min	30	%	Aceton
1x	20 min	50	%	Aceton
1x	30 min	75	%	Aceton
1x	45 min	90	%	Aceton
5x	30 min	100	%	Aceton

5. Vollständiges Trocknen in der „Kritisch-Punkt Trocknungsanlage“.
6. Mit doppelseitig klebendem Klebeband werden die Deckgläser einzeln auf Objektische geklebt.
7. Bedampfung mit einer 30 nm dicken Goldschicht. Die fertigen Präparate müssen im Exsikkator gelagert werden.

5.5.2 Transmissions-Elektronenmikroskopie

Die Präparate für die Transmissions-Elektronenmikroskopie in dieser Arbeit waren Transwell-Filter, auf denen sich Caco-2-Zellen auf der einen und HBMEC auf der anderen Seiten befanden (s. 5.2.8).

1. Nach der Infektion: 2x waschen mit PBS (oben und unten).
2. Fixierung mit kaltem halbkonzentriertem Karnovsky-Reagenz (in Cacodylatpuffer) (s. 4.4) über Nacht bei 4 °C.
3. Karnovsky-Reagenz durch PBS ersetzen (jetzt mehrere Tage bei 4 °C haltbar).
4. Die Filter werden mit einem Skalpell ausgeschnitten (die Filter rollen sich zusammen) und in ein Schnappdeckelröhrchen mit PBS überführt. Alle weiteren Schritte finden in den Schnappdeckelröhrchen statt.
5. Das PBS wird abgesogen und durch 2%iges Osmiumtetroxid ersetzt (halbkonzentriert in Cacodylatpuffer). Inkubation für 2 Stunden bei 4 °C.
6. 2x waschen mit H_2O_{dest} (4 °C).
7. 0,5%ige Uranylazetat-Lösung (ÜN, 4 °C).
8. 2x waschen mit H_2O_{dest} .
9. Die Entwässerung erfolgt in aufsteigender Ethanolreihe mit einem Propylenoxidschritt.

1x	30 min	50	%	4 °C
1x	30 min	70	%	4 °C
1x	30 min	90	%	4 °C
1x	30 min	96	%	4 °C
3x	30 min	100	%	RT
1x	30 min	wasserfreies Propylenoxid		RT

10. Die Präparate werden in Epon (812, Serva, Heidelberg)/Propylenoxid (1:1) im offenen Gefäß ÜN bei 4 °C gelangert. Das Propylenoxid soll sich dabei verflüchtigen.
11. Präparate 2x jeweils 2 Stunden mit frischem Epon bedecken.
12. Die Präparate werden in Flach-Einbettungsformen aus Silikongummi gelegt, mit Epon bedeckt und so ausgerichtet, daß sie optimal quer zu schneiden sind. Die Einbettungsformen werden für 48 Stunden zur Polymerisierung bei 60 °C in den Wärmeschrank gestellt.
13. Die in Epon eingebackenen Präparate werden von Hand mit einem Skalpell freigelegt. Über Semidünnschnitte (1-2 μm) wird die gewünschte Stelle lokalisiert. Ultradünnschnitte (60-80 nm) werden auf Kupfernetze aufgezogen und nach [Reynolds, 1963](#) mit Uranylacetat in Alkohol kontrastiert.

5.5.3 Fluoreszenzmikroskopie

Zur Darstellung von Aktinschweiften intrazellulärer Listerien wurde das filamentöse Aktin von infizierten HBMEC angefärbt. Hierzu werden HBMEC auf Deckgläsern ($\varnothing = 1,2$ cm) in 24 Napfplatten ausgesät und anschließend wie in 5.2.5 beschrieben mit *L. monocytogenes* EGD infiziert. 20 Stunden nach der Infektion werden die HBMEC in Aceton fixiert und mit Tetramethyl Rhodamin Isothiocyanat (TRITC)-Phalloidin wie in Kuhn *et al.*, 1990 beschrieben gefärbt. Die Auswertung erfolgt mit dem Fluoreszenzmikroskop.

Soll der Infektionsverlauf von GFP-exprimierenden Listerien (LM-GFP) in HBMEC in Echtzeit verfolgt werden, werden HBMEC 24 Stunden vor der Infektion in 50 ml Kulturflaschen ausgesät. Der konfluente Monolayer wird wie in 5.2.5 beschrieben mit einer MOI von 5 mit LM-GFP infiziert, anschließend werden extrazelluläre Listerien abgetötet. Die infizierten HBMEC werden in Gentamycin-haltigem Medium ($10 \mu\text{g/ml}$) bei 37°C im Begasungsbrutschrank kultiviert und können nun jederzeit mit dem Fluoreszenzmikroskop auf leuchtende Bakterien hin untersucht werden. Da sich im Laufe der Infektion infizierte Zellen vom Untergrund ablösen und diese bei der Mikroskopie stören, sollte der infizierte Monolayer vor der mikroskopischen Betrachtung einmal mit PBS gewaschen werden.

6 Literatur

- ALLPORT, J. R., DING, H. T., AGER, A., STEEBER, D. A., TEDDER, T. F., AND LUSCINSKAS, F. W. 1997. L-selectin shedding does not regulate human neutrophil attachment, rolling, or transmigration across human vascular endothelium *in vitro*. *J Immunol*, **158**(9): 4365–72.
- ALVAREZ-DOMÍNGUEZ, C., VÁZQUEZ-BOLAND, J. A., CARRASCO-MARIN, E., LÓPEZ-MATO, P., AND LEYVA-COBIAN, F. 1997. Host cell heparan sulfate proteoglycans mediate attachment and entry of *Listeria monocytogenes*, and the listerial surface protein ActA is involved in heparan sulfate receptor recognition. *Infect Immun*, **65**(1): 78–88.
- ANDREWS, B. S., SHADFORTH, M., CUNNINGHAM, P., AND T. H. DAVIS JS, 4. 1981. Demonstration of a C1q receptor on the surface of human endothelial cells. *J Immunol*, **127**(3): 1075–80.
- ANTES, U., HEINZ, H. P., AND LOOS, M. 1984. Enzyme-linked immunosorbent assay for C1q in human serum by use of monoclonal antibodies. *J Immunol Methods*, **74**(2): 299–306.
- ARMSTRONG, R. W., AND FUNG, P. C. 1993. Brainstem encephalitis (rhombencephalitis) due to *Listeria monocytogenes*: case report and review. *Clin Infect Dis*, **16**(5): 689–702.
- ASAWAVICHENJINDA, T., SITHI-AMORN, C., AND TANYANONT, V. 1999. Serum cryptococcal antigen: diagnostic value in the diagnosis of AIDS- related cryptococcal meningitis. *J Med Assoc Thai*, **82**(1): 65–71.
- BACIU, P. C., SAONCELLA, S., LEE, S. H., DENHEZ, F., LEUTHARDT, D., AND GOETINCK, P. F. 2000. Syndesmos, a protein that interacts with the cytoplasmic domain of syndecan-4, mediates cell spreading and actin cytoskeletal organization. *J Cell Sci*, **113 Pt 2**: 315–24.
- BALDA, M. S., AND MATTER, K. 1998. Tight junctions. *J Cell Sci*, **111**(Pt 5): 541–7.
- BARAFF, L. J., OSLUND, S., AND PRATHER, M. 1993. Effect of antibiotic therapy and etiologic micro-organism on the risk of bacterial meningitis in children with occult bacteremia. *Pediatrics*, **92**(1): 140–3.
- BÖCKMANN, R., DICKNEITE, C., MIDDENDORF, B., GOEBEL, W., AND SOKOLOVIC, Z. 1996. Specific binding of the *Listeria monocytogenes* transcriptional regulator PrfA to target sequences requires additional factor(s) and is influenced by iron. *Mol Microbiol*, **22**(4): 643–53.
- BEEKHUIZEN, H., AND VAN FURTH, R. 1994. Growth characteristics of cultured human macrovascular venous and arterial and microvascular endothelial cells. *J Vasc Res*, **31**(4): 230–9.
- BENDER, J. R., SADEGHI, M. M., WATSON, C., PFAU, S., AND PARDI, R. 1994. Heterogeneous activation thresholds to cytokines in genetically distinct endothelial cells: evidence for diverse transcriptional responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**(9): 3994–8.
- BERCHE, P. 1995. Bacteremia is required for invasion of the murine central nervous system by *Listeria monocytogenes*. *Microb Pathog*, **18**(5): 323–36.
- BEVILACQUA, M. P. 1993. Endothelial-leukocyte adhesion molecules. *Annu Rev Immunol*, **11**: 767–804.
- BEVILACQUA, M. P., STENGELIN, S., GIMBRONE, M. A., AND SEED, B. 1989. Endothelial leukocyte adhesion molecule 1: an inducible receptor for neutrophils related to complement regulatory proteins and lectins. *Science*, **243**(4895): 1160–5.
- BHAKDI, S., KLONISCH, T., NUBER, P., AND FISCHER, W. 1991. Stimulation of monokine production by lipoteichoic acids. *Infect Immun*, **59**(12): 4614–20.
- BIELER-NIEDERER, E. 1979. Bacterial meningitis in newborn infants. A retrospective study from a pediatric clinic 1967-1978. *Helv Paediatr Acta*, **34**(6): 563–76.

- BIRKNESS, K. A., SWISHER, B. L., WHITE, E. H., LONG, E. G., R. EWING EP, J., AND QUINN, F. D. 1995. A tissue culture bilayer model to study the passage of *Neisseria meningitidis*. *Infect Immun*, **63**(2): 402–9.
- BOCHNER, B. S., LUSCINSKAS, F. W., GIMBRONE, M. A., NEWMAN, W., STERBINSKY, S. A., DERSE-ANTHONY, C. P., KLUNK, D., AND SCHLEIMER, R. P. 1991. Adhesion of human basophils, eosinophils, and neutrophils to interleukin 1-activated human vascular endothelial cells: contributions of endothelial cell adhesion molecules. *J Exp Med*, **173**(6): 1553–7.
- BOHNE, J., KESTLER, H., UEBELE, C., SOKOLOVIC, Z., AND GOEBEL, W. 1996. Differential regulation of the virulence genes of *Listeria monocytogenes* by the transcriptional activator PrfA. *Mol Microbiol*, **20**(6): 1189–98.
- BORDIN, S., SMITH, M., GHEBREHIWET, B., ODA, D., AND PAGE, R. C. 1992. Smooth muscle and epithelial cells express specific binding sites for the C1q component of complement. *Clin Immunol Immunopathol*, **63**(1): 51–7.
- BRADDING, P., FEATHER, I. H., HOWARTH, P. H., MÜLLER, R., ROBERTS, J. A., BRITTEN, K., BEWS, J. P., HUNT, T. C., OKAYAMA, Y., HEUSSER, C. H., AND A. L. ET. 1992. Interleukin 4 is localized to and released by human mast cells. *J Exp Med*, **176**(5): 1381–6.
- BRATLID, D., AND BOVRE, K. 1977. Bacteriolytic activity of normal and pathological cerebrospinal fluid. *Acta Pathol Microbiol Scand*, **85**(1): 21–5.
- BRAUN, L., DRAMSI, S., DEHOUX, P., BIERNE, H., LINDAHL, G., AND COSSART, P. 1997. InlB: an invasion protein of *Listeria monocytogenes* with a novel type of surface association. *Mol Microbiol*, **25**(2): 285–94.
- BRAUN, L., OHAYON, H., AND COSSART, P. 1998. The InlB protein of *Listeria monocytogenes* is sufficient to promote entry into mammalian cells. *Mol Microbiol*, **27**(5): 1077–87.
- BRAUN, L., NATO, F., PAYRASTRE, B., MAZIE, J. C., AND COSSART, P. 1999. The 213-amino-acid leucine-rich repeat region of the *Listeria monocytogenes* InlB protein is sufficient for entry into mammalian cells, stimulation of PI 3-kinase and membrane ruffling. *Mol Microbiol*, **34**(1): 10–23.
- BREHM, K., KREFT, J., RIPIO, M. T., AND VÁZQUEZ-BOLAND, J. A. 1996. Regulation of virulence gene expression in pathogenic *Listeria*. *Microbiologia*, **12**(2): 219–36.
- BUBERT, A., KUHN, M., GOEBEL, W., AND KOHLER, S. 1992. Structural and functional properties of the p60 proteins from different *Listeria* species. *J Bacteriol*, **174**(24): 8166–71.
- BUBERT, A., SOKOLOVIC, Z., CHUN, S. K., PAPATHEODOROU, L., SIMM, A., AND GOEBEL, W. 1999. Differential expression of *Listeria monocytogenes* virulence genes in mammalian host cells. *Mol Gen Genet*, **261**(2): 323–36.
- BURN, C. G. 1934. Unidentified Gram-positive bacillus associated with meningoencephalitis. *Proc Soc Exper Biol Med*, **31**: 1095–97.
- BURROUGHS, M., CABELLOS, C., PRASAD, S., AND TUOMANEN, E. 1992. Bacterial components and the pathophysiology of injury to the blood- brain barrier: does cell wall add to the effects of endotoxin in gram- negative meningitis? *J Infect Dis*, **165**: S82–5.
- CAI, J. P., HUDSON, S., YE, M. W., AND CHIN, Y. H. 1996. The intracellular signaling pathways involved in MCP-1-stimulated T cell migration across microvascular endothelium. *Cell Immunol*, **167**(2): 269–75.
- CAMILLI, A., TILNEY, L. G., AND PORTNOY, D. A. 1993. Dual roles of plcA in *Listeria monocytogenes* pathogenesis. *Mol Microbiol*, **8**(1): 143–57.
- CARPENTER, C. L., AND CANTLEY, L. C. 1996. Phosphoinositide kinases. *Curr Opin Cell Biol*, **8**(2): 153–8.
- CERNY, A., HUGIN, A. W., BAZIN, H., SUTTER, S., HENGARTNER, H., AND ZINKERNAGEL, R. M. 1988. Anti-*Listeria monocytogenes* immunity in mu-suppressed mice: a comparison of treatment with conventional hyperimmune rabbit anti-mouse IgM and affinity-purified, monoclonal rat anti-mouse IgM. *Med Microbiol Immunol (Berl)*, **177**(3): 123–31.
- CHALFIE, M., TU, Y., EUSKIRCHEN, G., WARD, W. W., AND PRASHER, D. C. 1994. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*, **263**(5148): 802–5.
- CHIRGWIN, J. M., PRZYBYLA, A. E., MACDONALD, R. J., AND RUTTER, W. J. 1979. Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry*, **18**(24): 5294–9.

- COHEN, M. C., AND COHEN, S. 1996. Cytokine function: a study in biologic diversity. *Am J Clin Pathol*, **105**(5): 589–98.
- CORNACCHIONE, P., SCARINGI, L., FETTUCCIARI, K., ROSATI, E., SABATINI, R., OREFICI, G., VON HUNOLSTEIN, C., MODESTI, A., MODICA, A., MINELLI, F., AND MARCONI, P. 1998. Group B streptococci persist inside macrophages. *Immunology*, **93**(1): 86–95.
- COSSART, P. 1998. Interactions of the bacterial pathogen *Listeria monocytogenes* with mammalian cells: bacterial factors, cellular ligands, and signaling. *Folia Microbiol (Praha)*, **43**(3): 291–303.
- COSSART, P., AND KOCKS, C. 1994. The actin-based motility of the facultative intracellular pathogen *Listeria monocytogenes*. *Mol Microbiol*, **13**(3): 395–402.
- COYLE, P. K. 1999. Glucocorticoids in central nervous system bacterial infection. *Arch Neurol*, **56**(7): 796–801.
- CUMMINS, A. J., FIELDING, A. K., AND MCCLAUCHLIN, J. 1994. *Listeria ivanovii* infection in a patient with AIDS. *J Infect*, **28**(1): 89–91.
- DEJANA, E., CORADA, M., AND LAMPUGNANI, M. G. 1995. Endothelial cell-to-cell junctions. *FASEB J*, **9**(10): 910–8.
- DEMUTH, A., CHAKRABORTY, T., KROHNE, G., AND GOEBEL, W. 1994. Mammalian cells transfected with the listeriolysin gene exhibit enhanced proliferation and focus formation. *Infect Immun*, **62**(11): 5102–11.
- DICKNEITE, C., BÖCKMANN, R., SPORY, A., GOEBEL, W., AND SOKOLOVIC, Z. 1998. Differential interaction of the transcription factor PrfA and the PrfA-activating factor (Paf) of *Listeria monocytogenes* with target sequences. *Mol Microbiol*, **27**(5): 915–28.
- DIETRICH, G., BUBERT, A., GENTSCHEV, I., SOKOLOVIC, Z., SIMM, A., CATIC, A., KAUFMANN, S. H., HESS, J., SZALAY, A. A., AND GOEBEL, W. 1998. Delivery of antigen-encoding plasmid DNA into the cytosol of macrophages by attenuated suicide *Listeria monocytogenes*. *Nat Biotechnol*, **16**(2): 181–5.
- DOMANN, E., WEHLAND, J., ROHDE, M., PISTOR, S., HARTL, M., GOEBEL, W., LEIMEISTER-WÄCHTER, M., WUENSCHER, M., AND CHAKRABORTY, T. 1992. A novel bacterial virulence gene in *Listeria monocytogenes* required for host cell microfilament interaction with homology to the proline-rich region of vinculin. *EMBO J*, **11**(5): 1981–90.
- DOMANN, E., WEHLAND, J., NIEBUHR, K., HAFFNER, C., LEIMEISTER-WÄCHTER, M., AND CHAKRABORTY, T. 1993. Detection of a prfA-independent promoter responsible for listeriolysin gene expression in mutant *Listeria monocytogenes* strains lacking the PrfA regulator. *Infect Immun*, **61**(7): 3073–5.
- DRAMSI, S., KOCKS, C., FORESTIER, C., AND COSSART, P. 1993. Internalin-mediated invasion of epithelial cells by *Listeria monocytogenes* is regulated by the bacterial growth state, temperature and the pleiotropic activator prfA. *Mol Microbiol*, **9**(5): 931–41.
- DRAMSI, S., BISWAS, I., MAGUIN, E., BRAUN, L., MASTROENI, P., AND COSSART, P. 1995. Entry of *Listeria monocytogenes* into hepatocytes requires expression of inIB, a surface protein of the internalin multigene family. *Mol Microbiol*, **16**(2): 251–61.
- DRAMSI, S., DEHOUX, P., LEBRUN, M., GOOSSENS, P. L., AND COSSART, P. 1997. Identification of four new members of the internalin multigene family of *Listeria monocytogenes* EGD. *Infect Immun*, **65**(5): 1615–25.
- DREVETS, D. A. 1997. *Listeria monocytogenes* infection of cultured endothelial cells stimulates neutrophil adhesion and adhesion molecule expression. *J Immunol*, **158**(11): 5305–13.
- DREVETS, D. A. 1998. *Listeria monocytogenes* virulence factors that stimulate endothelial cells. *Infect Immun*, **66**(1): 232–8.
- DREVETS, D. A. 1999. Dissemination of *Listeria monocytogenes* by infected phagocytes. *Infect Immun*, **67**(7): 3512–7.
- DREVETS, D. A., CANONO, B. P., LEENEN, P. J., AND CAMPBELL, P. A. 1994. Gentamicin kills intracellular *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun*, **62**(6): 2222–8.
- DREVETS, D. A., SAWYER, R. T., POTTER, T. A., AND CAMPBELL, P. A. 1995. *Listeria monocytogenes* infects human endothelial cells by two distinct mechanisms. *Infect Immun*, **63**(11): 4268–76.
- EDGEALL, C. J., McDONALD, C. C., AND GRAHAM, J. B. 1983. Permanent cell line expressing human factor VIII-related antigen established by hybridization. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **80**(12): 3734–7.

- ENGELBRECHT, F., CHUN, S. K., OCHS, C., HESS, J., LOTTSPEICH, F., GOEBEL, W., AND SOKOLOVIC, Z. 1996. A new PrfA-regulated gene of *Listeria monocytogenes* encoding a small, secreted protein which belongs to the family of internalins. *Mol Microbiol*, **21**(4): 823–37.
- ENGELBRECHT, F., DOMINGUEZ-BERNAL, G., HESS, J., DICKNEITE, C., GREIFFENBERG, L., LAMPIDIS, R., RAFFELSBAUER, D., DANIELS, J. J., KREFT, J., KAUFMANN, S. H., VÁZQUEZ-BOLAND, J. A., AND GOEBEL, W. 1998a. A novel PrfA-regulated chromosomal locus, which is specific for *Listeria ivanovii*, encodes two small, secreted internalins and contributes to virulence in mice. *Mol Microbiol*, **30**(2): 405–17.
- ENGELBRECHT, F., DICKNEITE, C., LAMPIDIS, R., GOTZ, M., DASGUPTA, U., AND GOEBEL, W. 1998b. Sequence comparison of the chromosomal regions encompassing the internalin C genes (inlC) of *Listeria monocytogenes* and *L. ivanovii*. *Mol Gen Genet*, **257**(2): 186–97.
- FANNING, A. S., JAMESON, B. J., JESAITIS, L. A., AND ANDERSON, J. M. 1998. The tight junction protein ZO-1 establishes a link between the transmembrane protein occludin and the actin cytoskeleton. *J Biol Chem*, **273**(45): 29745–53.
- FANNING, A. S., MITIC, L. L., AND ANDERSON, J. M. 1999. Transmembrane proteins in the tight junction barrier. *J Am Soc Nephrol*, **10**(6): 1337–45.
- FARBER, J. M., AND PETERKIN, P. I. 1991. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiol Rev*, **55**(3): 476–511.
- FIESSINGER, J. N., BRECY, H., CASTAIGNE, P., AND HARTMANN, L. 1973. Complement in the CSF. I. Preliminary results. *Rev Neurol (Paris)*, **128**(2): 117–24.
- FIGDOR, C. G., VAN KOOYK, Y., AND KEIZER, G. D. 1990. On the mode of action of LFA-1. *Immunol Today*, **11**(8): 277–80.
- FINLAY, B. B., RUSCHKOWSKI, S., AND DEDHAR, S. 1991. Cytoskeletal rearrangements accompanying *salmonella* entry into epithelial cells. *J Cell Sci*, **99**(Pt 2): 283–96.
- FRANCIS, C. L., RYAN, T. A., JONES, B. D., SMITH, S. J., AND FALKOW, S. 1993. Ruffles induced by *Salmonella* and other stimuli direct macropinocytosis of bacteria. *Nature*, **364**(6438): 639–42.
- FREI, K., PIANI, D., PFISTER, H. W., AND FONTANA, A. 1993. Immune-mediated injury in bacterial meningitis. *Int Rev Exp Pathol*, **34**: 183–92.
- FREITAG, N. E., RONG, L., AND PORTNOY, D. A. 1993. Regulation of the prfA transcriptional activator of *Listeria monocytogenes*: multiple promoter elements contribute to intracellular growth and cell-to-cell spread. *Infect Immun*, **61**(6): 2537–44.
- GAGLIARDI, M., GAGLIARDI, C., AND BARONTI, L. 1977. Presence of anti-*Listeria* antibodies in a population of the Province of Florence. *Ann Sclavo*, **19**(6): 1233–6.
- GAILLARD, J. L., BERCHE, P., AND SANSONETTI, P. 1986. Transposon mutagenesis as a tool to study the role of hemolysin in the virulence of *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun*, **52**(1): 50–5.
- GAILLARD, J. L., BERCHE, P., MOUNIER, J., RICHARD, S., AND SANSONETTI, P. 1987. In vitro model of penetration and intracellular growth of *Listeria monocytogenes* in the human enterocyte-like cell line Caco-2. *Infect Immun*, **55**(11): 2822–9.
- GAILLARD, J. L., BERCHE, P., FREHEL, C., GOUIN, E., AND COSSART, P. 1991. Entry of *L. monocytogenes* into cells is mediated by internalin, a repeat protein reminiscent of surface antigens from gram-positive cocci. *Cell*, **65**(7): 1127–41.
- GAILLARD, J. L., JAUBERT, F., AND BERCHE, P. 1996. The inlAB locus mediates the entry of *Listeria monocytogenes* into hepatocytes in vivo. *J Exp Med*, **183**(2): 359–69.
- GATH, U., HAKVOORT, A., WEGENER, J., DECKER, S., AND GALLA, H. J. 1997. Porcine choroid plexus cells in culture: expression of polarized phenotype, maintenance of barrier properties and apical secretion of CSF-components. *Eur J Cell Biol*, **74**(1): 68–78.
- GEDDE, M. M., HIGGINS, D. E., TILNEY, L. G., AND PORTNOY, D. A. 2000. Role of Listeriolysin O in Cell-to-Cell Spread of *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun*, **68**(2): 999–1003.
- GELLIN, B. G., BROOME, C. V., BIBB, W. F., WEAVER, R. E., GAVENTA, S., AND MASCOLA, L. 1991. The epidemiology of listeriosis in the United States–1986. Listeriosis Study Group. *Am J Epidemiol*, **133**(4): 392–401.

- GHANDOUR, M. S., LANGLEY, O. K., ZHU, X. L., WAHEED, A., AND SLY, W. S. 1992. Carbonic anhydrase IV on brain capillary endothelial cells: a marker associated with the blood-brain barrier. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**(15): 6823–7.
- GIMBRONE, M. A., OBIN, M. S., BROCK, A. F., LUIS, E. A., HASS, P. E., HEBERT, C. A., YIP, Y. K., LEUNG, D. W., LOWE, D. G., KOHR, W. J., AND A. L. ET. 1989. Endothelial interleukin-8: a novel inhibitor of leukocyte-endothelial interactions. *Science*, **246**(4937): 1601–3.
- GOLDBERG, M. B., AND SANSONETTI, P. J. 1993. *Shigella* subversion of the cellular cytoskeleton: a strategy for epithelial colonization. *Infect Immun*, **61**(12): 4941–6.
- GOLDMANN, E. E. 1913. Vitalfärbung am Zentralnervensystem. *Abhdl Preus Akad Wissensch Physikal Mathemat Klasse*, **1**: 1–60.
- GOLDSTEIN, G. W., AND BETZ, A. L. 1983. Recent advances in understanding brain capillary function. *Ann Neurol*, **14**(4): 389–95.
- GORE, I., AND TSUTSUMI, H. 1969. Isolation of living endothelial cells by gelatin-film stripping of vascular walls. *Stain Technol*, **44**(3): 139–42.
- GREGORY, S. H., SAGNIMENI, A. J., AND WING, E. J. 1996. Expression of the *inlAB* operon by *Listeria monocytogenes* is not required for entry into hepatic cells in vivo. *Infect Immun*, **64**(10): 3983–6.
- GREGORY, S. H., SAGNIMENI, A. J., AND WING, E. J. 1997. Internalin B promotes the replication of *Listeria monocytogenes* in mouse hepatocytes. *Infect Immun*, **65**(12): 5137–41.
- GREIFFENBERG, L., SOKOLOVIC, Z., SCHNITTLER, H. J., SPORY, A., BÖCKMANN, R., GOEBEL, W., AND KUHN, M. 1997. *Listeria monocytogenes*-infected human umbilical vein endothelial cells: internalin-independent invasion, intracellular growth, movement, and host cell responses. *FEMS Microbiol Lett*, **157**(1): 163–70.
- GREIFFENBERG, L., GOEBEL, W., KIM, K. S., WEIGLEIN, I., BUBERT, A., ENGELBRECHT, F., STINS, M., AND KUHN, M. 1998. Interaction of *Listeria monocytogenes* with human brain microvascular endothelial cells: InlB-dependent invasion, long-term intracellular growth, and spread from macrophages to endothelial cells. *Infect Immun*, **66**(11): 5260–7.
- GREIFFENBERG, L., GOEBEL, W., KIM, K. S., DANIELS, J. D., AND KUHN, M. 2000. Interaction of *Listeria monocytogenes* with human brain microvascular endothelial cells: an electron microscopic study. *Infect Immun*, **68**(6): im Druck.
- GRENNINGLOH, R., DARJI, A., WEHLAND, J., CHAKRABORTY, T., AND WEISS, S. 1997. Listeriolysin and IrpA are major protein targets of the human humoral response against *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun*, **65**(9): 3976–80.
- GUO, W. X., GHEBREHIWET, B., WEKSLER, B., SCHWEITZER, K., AND PEERSCHKE, E. I. 1999. Up-regulation of endothelial cell binding proteins/receptors for complement component C1q by inflammatory cytokines. *J Lab Clin Med*, **133**(6): 541–50.
- GUZMAN, C. A., ROHDE, M., CHAKRABORTY, T., DOMANN, E., HUDEL, M., WEHLAND, J., AND TIMMIS, K. N. 1995. Interaction of *Listeria monocytogenes* with mouse dendritic cells. *Infect Immun*, **63**(9): 3665–73.
- HAGEMAN, G. S., ZHU, X. L., WAHEED, A., AND SLY, W. S. 1991. Localization of carbonic anhydrase IV in a specific capillary bed of the human eye. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**(7): 2716–20.
- HAUF, N., GOEBEL, W., FIEDLER, F., SOKOLOVIC, Z., AND KUHN, M. 1997. *Listeria monocytogenes* infection of P388D₁ macrophages results in a biphasic NF- κ B (RelA/p50) activation induced by lipoteichoic acid and bacterial phospholipases and mediated by I κ B α and I κ B β degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**(17): 9394–9.
- HECHTMAN, D. H., CYBULSKY, M. I., FUCHS, H. J., BAKER, J. B., AND R. GIMBRONE MA, J. 1991. Intravascular IL-8. Inhibitor of polymorphonuclear leukocyte accumulation at sites of acute inflammation. *J Immunol*, **147**(3): 883–92.
- HESS, J., GENTSCHEV, I., SZALAY, G., LADEL, C., BUBERT, A., GOEBEL, W., AND KAUFMANN, S. H. 1995. *Listeria monocytogenes* p60 supports host cell invasion by and in vivo survival of attenuated *Salmonella typhimurium*. *Infect Immun*, **63**(5): 2047–53.
- HIRANO, T., AKIRA, S., TAGA, T., AND KISHIMOTO, T. 1990. Biological and clinical aspects of interleukin 6. *Immunol Today*, **11**(12): 443–9.
- HOF, H. 1990. Pathogenesis and therapy of listeriosis. *Dtsch Med Wochenschr*, **115**(43): 1639–46.

- HUBER, A. R., KUNKEL, S. L., TODD, R. F., AND WEISS, S. J. 1991. Regulation of transendothelial neutrophil migration by endogenous interleukin-8. *Science*, **254**(5028): 99–102.
- HUBER, P. 1999. Endothelial intercellular junctions: relationship between vascular adhesion and morphogenesis. *J Soc Biol*, **193**(2): 181–7.
- IGARASHI, Y., UTSUMI, H., CHIBA, H., YAMADA-SASAMORI, Y., TOBIOKA, H., KAMIMURA, Y., FURUUCHI, K., KOKAI, Y., NAKAGAWA, T., MORI, M., AND SAWADA, N. 1999. Glial cell line-derived neurotrophic factor induces barrier function of endothelial cells forming the blood-brain barrier. *Biochem Biophys Res Commun*, **261**(1): 108–12.
- IJICHI, A., SAKUMA, S., AND TOFILON, P. J. 1995. Hypoxia-induced vascular endothelial growth factor expression in normal rat astrocyte cultures. *Glia*, **14**(2): 87–93.
- IRETON, K., AND COSSART, P. 1997. Host-pathogen interactions during entry and actin-based movement of *Listeria monocytogenes*. *Annu Rev Genet*, **31**: 113–38.
- IRETON, K., PAYRASTRE, B., CHAP, H., OGAWA, W., SAKAUE, H., KASUGA, M., AND COSSART, P. 1996. A role for phosphoinositide 3-kinase in bacterial invasion. *Science*, **274**(5288): 780–2.
- IRETON, K., PAYRASTRE, B., AND COSSART, P. 1999. The *Listeria monocytogenes* protein InlB is an agonist of mammalian phosphoinositide 3-kinase. *J Biol Chem*, **274**(24): 17025–32.
- ISBERG, R. R., AND NHIEU, G. TRAN VAN. 1994. Binding and internalization of microorganisms by integrin receptors. *Trends Microbiol*, **2**(1): 10–4.
- ITOH, M., NAGAFUCHI, A., MOROI, S., AND TSUKITA, S. 1997. Involvement of ZO-1 in cadherin-based cell adhesion through its direct binding to alpha catenin and actin filaments. *J Cell Biol*, **138**(1): 181–92.
- JONES, S., AND PORTNOY, D. A. 1994. Characterization of *Listeria monocytogenes* pathogenesis in a strain expressing perfringolysin O in place of listeriolysin O. *Infect Immun*, **62**(12): 5608–13.
- JONQUIERES, R., BIERNE, H., FIEDLER, F., GOUNON, P., AND COSSART, P. 1999. Interaction between the protein InlB of *Listeria monocytogenes* and lipoteichoic acid: a novel mechanism of protein association at the surface of Gram-positive bacteria. *Mol Microbiol*, **34**(5): 902–914.
- KARUNASAGAR, I., KROHNE, G., AND GOEBEL, W. 1993. *Listeria ivanovii* is capable of cell-to-cell spread involving actin polymerization. *Infect Immun*, **61**(1): 162–9.
- KATHARIOU, S., METZ, P., HOF, H., AND GOEBEL, W. 1987. Tn916-induced mutations in the hemolysin determinant affecting virulence of *Listeria monocytogenes*. *J Bacteriol*, **169**(3): 1291–7.
- KAUFMANN, S. H. 1993. Immunity to intracellular bacteria. *Annu Rev Immunol*, **11**: 129–63.
- KAYAL, S., LILLENBAUM, A., POYART, C., MEMET, S., ISRAEL, A., AND BERCHE, P. 1999. Listeriolysin O-dependent activation of endothelial cells during infection with *Listeria monocytogenes*: activation of NF- κ B and upregulation of adhesion molecules and chemokines. *Mol Microbiol*, **31**(6): 1709–22.
- KOCKS, C., GOUIN, E., TABOURET, M., BERCHE, P., OHAYON, H., AND COSSART, P. 1992. *L. monocytogenes*-induced actin assembly requires the *actA* gene product, a surface protein. *Cell*, **68**(3): 521–31.
- KOEDER, U., BERNATOWICZ, A., FREI, K., FONTANA, A., AND PFISTER, H. W. 1996. Systemically (but not intrathecally) administered IL-10 attenuates pathophysiologic alterations in experimental pneumococcal meningitis. *J Immunol*, **157**(11): 5185–91.
- KOHLER, S., BUBERT, A., VOGEL, M., AND GOEBEL, W. 1991. Expression of the *iap* gene coding for protein p60 of *Listeria monocytogenes* is controlled on the posttranscriptional level. *J Bacteriol*, **173**(15): 4668–74.
- KORTHUIS, R. J., ANDERSON, D. C., AND GRANGER, D. N. 1994. Role of neutrophil-endothelial cell adhesion in inflammatory disorders. *J Crit Care*, **9**(1): 47–71.
- KOWALCZYK, A. P., NAVARRO, P., DEJANA, E., BORNSLAEGER, E. A., GREEN, K. J., KOPP, D. S., AND BORGWARDT, J. E. 1998. VE-cadherin and desmoplakin are assembled into dermal microvascular endothelial intercellular junctions: a pivotal role for plakoglobin in the recruitment of desmoplakin to intercellular junctions. *J Cell Sci*, **111**(Pt 20): 3045–57.
- KREFT, J., FUNKE, D., HAAS, A., LOTTSPPEICH, F., AND GOEBEL, W. 1989. Production, purification and characterization of hemolysins from *Listeria ivanovii* and *Listeria monocytogenes* Sv4b. *FEMS Microbiol Lett*, **48**(2): 197–202.

- KRULL, M., NOST, R., HIPPENSTIEL, S., DOMANN, E., CHAKRABORTY, T., AND SUTTORP, N. 1997. *Listeria monocytogenes* potently induces up-regulation of endothelial adhesion molecules and neutrophil adhesion to cultured human endothelial cells. *J Immunol*, **159**(4): 1970–6.
- KUHN, M. 1998. The microtubule depolymerizing drugs nocodazole and colchicine inhibit the uptake of *Listeria monocytogenes* by P388D₁ macrophages. *FEMS Microbiol Lett*, **160**(1): 87–90.
- KUHN, M., AND GOEBEL, W. 1989. Identification of an extracellular protein of *Listeria monocytogenes* possibly involved in intracellular uptake by mammalian cells. *Infect Immun*, **57**(1): 55–61.
- KUHN, M., AND GOEBEL, W. 1994. Induction of cytokines in phagocytic mammalian cells infected with virulent and avirulent *Listeria* strains. *Infect Immun*, **62**(2): 348–56.
- KUHN, M., AND GOEBEL, W. 1997. Responses by murine macrophages infected with *Listeria monocytogenes* crucial for the development of immunity to this pathogen. *Immunol Rev*, **158**: 57–67.
- KUHN, M., KATHARIOU, S., AND GOEBEL, W. 1988. Hemolysin supports survival but not entry of the intracellular bacterium *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun*, **56**(1): 79–82.
- KUHN, M., PREVOST, M. C., MOUNIER, J., AND SANSONETTI, P. J. 1990. A nonvirulent mutant of *Listeria monocytogenes* does not move intracellularly but still induces polymerization of actin. *Infect Immun*, **58**(11): 3477–86.
- LAEMMLI, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**(259): 680–5.
- LAMPIDIS, R., GROSS, R., SOKOLOVIC, Z., GOEBEL, W., AND KREFT, J. 1994. The virulence regulator protein of *Listeria ivanovii* is highly homologous to PrfA from *Listeria monocytogenes* and both belong to the Crp-Fnr family of transcription regulators. *Mol Microbiol*, **13**(1): 141–51.
- LEBRUN, M., MENGAUD, J., OHAYON, H., NATO, F., AND COSSART, P. 1996. Internalin must be on the bacterial surface to mediate entry of *Listeria monocytogenes* into epithelial cells. *Mol Microbiol*, **21**(3): 579–92.
- LECHARDEUR, D., SCHWARTZ, B., PAULIN, D., AND SCHERMAN, D. 1995. Induction of blood-brain barrier differentiation in a rat brain-derived endothelial cell line. *Exp Cell Res*, **220**(1): 161–70.
- LECUIT, M., DRAMSI, S., GOTTARDI, C., FEDOR-CHAIKEN, M., GUMBINER, B., AND COSSART, P. 1999. A single amino acid in E-cadherin responsible for host specificity towards the human pathogen *Listeria monocytogenes*. *EMBO J*, **18**(14): 3956–63.
- LEIB, S. L., AND TAUBER, M. G. 1999. Pathogenesis of bacterial meningitis. *Infect Dis Clin North Am*, **13**(3): 527–48, v–vi.
- LEIMEISTER-WACHTER, M., HAFNER, C., DOMANN, E., GOEBEL, W., AND CHAKRABORTY, T. 1990. Identification of a gene that positively regulates expression of listeriolysin, the major virulence factor of *Listeria monocytogenes*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **87**(21): 8336–40.
- LENNON, D., LEWIS, B., MANTELL, C., BECROFT, D., DOVE, B., FARMER, K., TONKIN, S., YEATES, N., STAMP, R., AND MICKLESON, K. 1984. Epidemic perinatal listeriosis. *Pediatr Infect Dis*, **3**(1): 30–4.
- LEONARD, E. J., AND YOSHIMURA, T. 1990. Human monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1). *Immunol Today*, **11**(3): 97–101.
- LEPAY, D. A., STEINMAN, R. M., NATHAN, C. F., MURRAY, H. W., AND COHN, Z. A. 1985. Liver macrophages in murine listeriosis. Cell-mediated immunity is correlated with an influx of macrophages capable of generating reactive oxygen intermediates. *J Exp Med*, **161**(6): 1503–12.
- LEVENE, C. I., BARTLET, C. P., AND HEALE, G. 1988. Identification of the connective tissues synthesized by the venous and arterial endothelia of the human umbilical cord: a comparative study. *Br J Exp Pathol*, **69**(2): 177–88.
- LEWANDOWSKY, M. 1900. Zur Lehre von der Cerebrospinalflüssigkeit. *Klin Med*, **40**: 480–94.
- LINGNAU, A., DOMANN, E., HUDEL, M., BOCK, M., NICHTERLEIN, T., WEHLAND, J., AND CHAKRABORTY, T. 1995. Expression of the *Listeria monocytogenes* EGD *inlA* and *inlB* genes, whose products mediate bacterial entry into tissue culture cell lines, by PrfA-dependent and -independent mechanisms. *Infect Immun*, **63**(10): 3896–903.
- LINGNAU, A., CHAKRABORTY, T., NIEBUHR, K., DOMANN, E., AND WEHLAND, J. 1996. Identification and purification of novel internalin-related proteins in *Listeria monocytogenes* and *Listeria ivanovii*. *Infect Immun*, **64**(3): 1002–6.

- LÓPEZ, S., PRATS, N., AND MARCO, A. J. 1999. Expression of E-selectin, P-selectin, and intercellular adhesion molecule-1 during experimental murine listeriosis. *Am J Pathol*, **155**(4): 1391–7.
- LOZADA, C., LEVIN, R. I., HUIE, M., HIRSCHHORN, R., NAIME, D., WHITLOW, M., RECHT, P. A., GOLDEN, B., AND CRONSTEIN, B. N. 1995. Identification of C1q as the heat-labile serum cofactor required for immune complexes to stimulate endothelial expression of the adhesion molecules E-selectin and intercellular and vascular cell adhesion molecules 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**(18): 8378–82.
- MACKANESS, G. B. 1971. Resistance to intracellular infection. *J Infect Dis*, **123**(4): 439–45.
- MARTIN-PADURA, I., LOSTAGLIO, S., SCHNEEMANN, M., WILLIAMS, L., ROMANO, M., FRUSCELLA, P., PANZERI, C., STOPPACCIARO, A., RUCO, L., VILLA, A., SIMMONS, D., AND DEJANA, E. 1998. Junctional adhesion molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily that distributes at intercellular junctions and modulates monocyte transmigration. *J Cell Biol*, **142**(1): 117–27.
- MCLAUCHLIN, J. 1990. Human listeriosis in Britain, 1967–85, a summary of 722 cases. 2. Listeriosis in non-pregnant individuals, a changing pattern of infection and seasonal incidence. *Epidemiol Infect*, **104**(2): 191–201.
- MENGAUD, J., LECUIT, M., LEBRUN, M., NATO, F., MAZIE, J. C., AND COSSART, P. 1996a. Antibodies to the leucine-rich repeat region of internalin block entry of *Listeria monocytogenes* into cells expressing E-cadherin. *Infect Immun*, **64**(12): 5430–3.
- MENGAUD, J., OHAYON, H., GOUNON, P., MEGE, R. M., AND COSSART, P. 1996b. E-cadherin is the receptor for internalin, a surface protein required for entry of *L. monocytogenes* into epithelial cells. *Cell*, **84**(6): 923–32.
- MIETTINEN, M., HOLTHOFER, H., LEHTO, V. P., MIETTINEN, A., AND VIRTANEN, I. 1983. Ulex europaeus I lectin as a marker for tumors derived from endothelial cells. *Am J Clin Pathol*, **79**(1): 32–6.
- MILOHANIC, E., PRON, B., THE EUROPEAN *Listeria* GENOME CONSORTIUM, BERCHE, P., AND GAILLARD, J. L. 2000. Identification of new loci involved in adhesion of *Listeria monocytogenes* to eukaryotic cells. *Microbiol*, **146**(3): 731–39.
- MÜLLER, W. A., RATTI, C. M., MCDONNELL, S. L., AND COHN, Z. A. 1989. A human endothelial cell-restricted, externally disposed plasmalemmal protein enriched in intercellular junctions. *J Exp Med*, **170**(2): 399–414.
- MONTGOMERY, K. F., OSBORN, L., HESSION, C., TIZARD, R., GOFF, D., VASSALLO, C., TARR, P. I., BOMSZTYK, K., LOBB, R., AND HARLAN, J. M. 1991. Activation of endothelial-leukocyte adhesion molecule 1 (ELAM-1) gene transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**(15): 6523–7.
- MOURAD, G., CRISTOL, J. P., CANAUD, B., JANBON, F., AND MION, C. 1986. *Listeria monocytogenes* encephalitis without meningitis. Value of monitoring by cerebral x-ray computed tomography. *Presse Med*, **15**(1): 31–2.
- MUSTAFA, M. M., RAMILO, O., SAEZ-LLORENS, X., OLSEN, K. D., MAGNESS, R. R., AND MCCRACKEN, G. H. 1990. Cerebrospinal fluid prostaglandins, interleukin 1 beta, and tumor necrosis factor in bacterial meningitis. Clinical and laboratory correlations in placebo-treated and dexamethasone-treated patients. *Am J Dis Child*, **144**(8): 883–7.
- MYLONAKIS, E., HOHMANN, E. L., AND CALDERWOOD, S. B. 1998. Central nervous system infection with *Listeria monocytogenes*. 33 years' experience at a general hospital and review of 776 episodes from the literature. *Medicine (Baltimore)*, **77**(5): 313–36.
- NABESHIMA, S., REESE, T. S., LANDIS, D. M., AND BRIGHTMAN, M. W. 1975. Junctions in the meninges and marginal glia. *J Comp Neurol*, **164**(2): 127–69.
- NIZET, V., KIM, K. S., STINS, M., JONAS, M., CHI, E. Y., NGUYEN, D., AND RUBENS, C. E. 1997. Invasion of brain microvascular endothelial cells by group B streptococci. *Infect Immun*, **65**(12): 5074–81.
- NYFEDT, A. A. 1929. Etiologie de la mononucleose infectieuse. *C R Soc Biol (Paris)*, **101**: 590–92.
- PAMER, E. G. 1993. Cellular immunity to intracellular bacteria. *Curr Opin Immunol*, **5**(4): 492–6.
- PARDRIDGE, W. M. 1993. Transport of insulin-related peptides and glucose across the blood-brain barrier. *Ann N Y Acad Sci*, **692**: 126–37.
- PARENT, C., AND EICHACKER, P. Q. 1999. Neutrophil and endothelial cell interactions in sepsis. The role of adhesion molecules. *Infect Dis Clin North Am*, **13**(2): 427–47, x.

- PARIDA, S. K., DOMANN, E., ROHDE, M., MÜLLER, S., DARJI, A., HAIN, T., WEHLAND, J., AND CHAKRABORTY, T. 1998. Internalin B is essential for adhesion and mediates the invasion of *Listeria monocytogenes* into human endothelial cells. *Mol Microbiol*, **28**(1): 81–93.
- PETERSON, M. D., AND MOOSEKER, M. S. 1992. Characterization of the enterocyte-like brush border cytoskeleton of the C2BBE clones of the human intestinal cell line, Caco-2. *J Cell Sci*, **102**(Pt 3): 581–600.
- PFADENHAUER, K., AND ROSSMANITH, T. 1995. Spinal manifestation of neurolisteriosis. *J Neurol*, **242**(3): 153–6.
- PORTNOY, D. A., JACKS, P. S., AND HINRICHS, D. J. 1988. Role of hemolysin for the intracellular growth of *Listeria monocytogenes*. *J Exp Med*, **167**(4): 1459–71.
- PORTNOY, D. A., CHAKRABORTY, T., GOEBEL, W., AND COSSART, P. 1992. Molecular determinants of *Listeria monocytogenes* pathogenesis. *Infect Immun*, **60**(4): 1263–7.
- PRATS, N., BRIONES, V., BLANCO, M. M., ALTIMIRA, J., RAMOS, J. A., DOMINGUEZ, L., AND MARCO, A. 1992. Choroiditis and meningitis in experimental murine infection with *Listeria monocytogenes*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, **11**(8): 744–7.
- PRON, B., BOUMAILA, C., JAUBERT, F., SARNACKI, S., MONNET, J. P., BERCHE, P., AND GAILLARD, J. L. 1998. Comprehensive study of the intestinal stage of listeriosis in a rat ligated ileal loop system. *Infect Immun*, **66**(2): 747–55.
- QUAGLIARELLO, V. J., MA, A., STUKENBROK, H., AND PALADE, G. E. 1991. Ultrastructural localization of albumin transport across the cerebral microvasculature during experimental meningitis in the rat. *J Exp Med*, **174**(3): 657–72.
- RACZ, P., TENNER, K., AND MERO, E. 1972. Experimental *Listeria* enteritis. I. An electron microscopic study of the epithelial phase in experimental *listeria* infection. *Lab Invest*, **26**(6): 694–700.
- RAFFELSBAUER, D., BUBERT, A., ENGELBRECHT, F., SCHEINPFLUG, J., SIMM, A., HESS, J., KAUFMANN, S. H., AND GOEBEL, W. 1998. The gene cluster *inlC2DE* of *Listeria monocytogenes* contains additional new internalin genes and is important for virulence in mice. *Mol Gen Genet*, **260**(2-3): 144–58.
- RAINER, G. E., FISHER, A. C., AND NASH, G. B. 1997. Endothelial-borne platelet-activating factor and interleukin-8 rapidly immobilize rolling neutrophils. *Am J Physiol*, **272**(1 Pt 2): H114–22.
- REYNOLDS, E. S. 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J Cell Biol*, **17**(208): 694–700.
- RING, A., WEISER, J. N., AND TUOMANEN, E. I. 1998. Pneumococcal trafficking across the blood-brain barrier. Molecular analysis of a novel bidirectional pathway. *J Clin Invest*, **102**(2): 347–60.
- RUHLAND, G. J., HELLWIG, M., WANNER, G., AND FIEDLER, F. 1993. Cell-surface location of *Listeria*-specific protein p60—detection of *Listeria* cells by indirect immunofluorescence. *J Gen Microbiol*, **139**(Pt 3): 609–16.
- SAUNDERS, N. R., HABGOOD, M. D., AND DZIEGIELEWSKA, K. M. 1999. Barrier mechanisms in the brain, II. Immature brain. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, **26**(2): 85–91.
- SCHLEIMER, R. P., STERBINSKY, S. A., KAISER, J., BICKEL, C. A., KLUNK, D. A., TOMIOKA, K., NEWMAN, W., LUSCINSKAS, F. W., GIMBRONE, M. A., MCINTYRE, B. W., AND A. L. ET. 1992. IL-4 induces adherence of human eosinophils and basophils but not neutrophils to endothelium. Association with expression of VCAM-1. *J Immunol*, **148**(4): 1086–92.
- SCHLOSSHAUER, B., AND HERZOG, K. H. 1990. Neurothelin: an inducible cell surface glycoprotein of blood-brain barrier-specific endothelial cells and distinct neurons. *J Cell Biol*, **110**(4): 1261–74.
- SCHLÜTER, D., BUCK, C., REITER, S., MEYER, T., HOF, H., AND DECKERT-SCHLÜTER, M. 1999. Immune reactions to *Listeria monocytogenes* in the brain. *Immunobiology*, **201**(2): 188–95.
- SCHMIDLEY, J. W., AND WISSIG, S. L. 1986. Anionic sites on the luminal surface of fenestrated and continuous capillaries of the CNS. *Brain Res*, **363**(2): 265–71.
- SCHNEEWIND, O., FOWLER, A., AND FAULL, K. F. 1995. Structure of the cell wall anchor of surface proteins in *Staphylococcus aureus*. *Science*, **268**(5207): 103–6.
- SCHNITTLER, H. J., MAHNER, F., DRENCKHAHN, D., KLENK, H. D., AND FELDMANN, H. 1993. Replication of Marburg virus in human endothelial cells. A possible mechanism for the development of viral hemorrhagic disease. *J Clin Invest*, **91**(4): 1301–9.

- SCHUCHAT, A., ROBINSON, K., WENGER, J. D., HARRISON, L. H., FARLEY, M., REINGOLD, A. L., LEFKOWITZ, L., AND PERKINS, B. A. 1997. Bacterial meningitis in the United States in 1995. Active Surveillance Team. *N Engl J Med*, **337**(14): 970–6.
- SEEBACH, J., BARTHOLDI, D., FREI, K., SPANAUS, K. S., FERRERO, E., WIDMER, U., ISENMANN, S., STRIETER, R. M., SCHWAB, M., PFISTER, H., AND A. L. ET. 1995. Experimental *Listeria* meningoencephalitis. Macrophage inflammatory protein-1 alpha and -2 are produced intrathecally and mediate chemotactic activity in cerebrospinal fluid of infected mice. *J Immunol*, **155**(9): 4367–75.
- SEELIGER, H. P. 1984. Modern taxonomy of the *Listeria* group relationship to its pathogenicity. *Clin Invest Med*, **7**(4): 217–21.
- SIBELIUS, U., CHAKRABORTY, T., KROGEL, B., WOLF, J., ROSE, F., SCHMIDT, R., WEHLAND, J., SEEGER, W., AND GRIMMINGER, F. 1996. The listerial exotoxins listeriolysin and phosphatidylinositol-specific phospholipase C synergize to elicit endothelial cell phosphoinositide metabolism. *J Immunol*, **157**(9): 4055–60.
- SIRONI, M., SCIACCA, F. L., MATTEUCCI, C., CONNI, M., VECCHI, A., BERNASCONI, S., MINTY, A., CAPUT, D., FERRARA, P., COLOTTA, F., AND A. L. ET. 1994. Regulation of endothelial and mesothelial cell function by interleukin-13: selective induction of vascular cell adhesion molecule-1 and amplification of interleukin-6 production. *Blood*, **84**(6): 1913–21.
- SMALL, P. M., TAUBER, M. G., HACKBARTH, C. J., AND SANDE, M. A. 1986. Influence of body temperature on bacterial growth rates in experimental pneumococcal meningitis in rabbits. *Infect Immun*, **52**(2): 484–7.
- SMITH, C. W. 1993. Leukocyte-endothelial cell interactions. *Semin Hematol*, **30**(4 Suppl 4): 45–53; discussion 54–5.
- SOEDA, S., FUJII, N., SHIMENO, H., AND NAGAMATSU, A. 1995. Oversulfated fucoidan and heparin suppress endotoxin induction of plasminogen activator inhibitor-1 in cultured human endothelial cells: their possible mechanism of action. *Biochim Biophys Acta*, **1269**(1): 85–90.
- SPRENGER, H., ROSLER, A., TONN, P., BRAUNE, H. J., HUFFMANN, G., AND GEMSA, D. 1996. Chemokines in the cerebrospinal fluid of patients with meningitis. *Clin Immunol Immunopathol*, **80**(2): 155–61.
- STANIMIROVIC, D., AND SATOH, K. 2000. Inflammatory mediators of cerebral endothelium: a role in ischemic brain inflammation. *Brain Pathol*, **10**(1): 113–26.
- STINS, M. F., PRASADARAO, N. V., IBRIC, L., WASS, C. A., LUCKETT, P., AND KIM, K. S. 1994. Binding characteristics of S fimbriated *Escherichia coli* to isolated brain microvascular endothelial cells. *Am J Pathol*, **145**(5): 1228–36.
- STINS, M. F., GILLES, F., AND KIM, K. S. 1997. Selective expression of adhesion molecules on human brain microvascular endothelial cells. *J Neuroimmunol*, **76**(1-2): 81–90.
- SWERLICK, R. A., LEE, K. H., LI, L. J., SEPP, N. T., CAUGHMAN, S. W., AND LAWLEY, T. J. 1992. Regulation of vascular cell adhesion molecule 1 on human dermal microvascular endothelial cells. *J Immunol*, **149**(2): 698–705.
- TANAKA, Y., ALBELDA, S. M., HORGAN, K. J., VAN SEVENTER, G. A., SHIMIZU, Y., NEWMAN, W., HALLAM, J., NEWMAN, P. J., BUCK, C. A., AND SHAW, S. 1992. CD31 expressed on distinctive T cell subsets is a preferential amplifier of beta 1 integrin-mediated adhesion. *J Exp Med*, **176**(1): 245–53.
- TANG, P., ROSENSHINE, I., AND FINLAY, B. B. 1994. *Listeria monocytogenes*, an invasive bacterium, stimulates MAP kinase upon attachment to epithelial cells. *Mol Biol Cell*, **5**(4): 455–64.
- TANG, P., SUTHERLAND, C. L., GOLD, M. R., AND FINLAY, B. B. 1998. *Listeria monocytogenes* invasion of epithelial cells requires the MEK-1/ERK-2 mitogen-activated protein kinase pathway. *Infect Immun*, **66**(3): 1106–12.
- TAUB, D. D., PROOST, P., MURPHY, W. J., ANVER, M., LONGO, D. L., VAN DAMME, J., AND OPPENHEIM, J. J. 1995. Monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1), -2, and -3 are chemotactic for human T lymphocytes. *J Clin Invest*, **95**(3): 1370–6.
- TAUBER, M. G., AND SANDE, M. A. 1990. Pharmacodynamics of antibiotics in experimental bacterial meningitis—two sides to rapid bacterial killing in the cerebrospinal fluid. *Scand J Infect Dis Suppl*, **74**: 173–8.

- TILNEY, L. G., AND PORTNOY, D. A. 1989. Actin filaments and the growth, movement, and spread of the intracellular bacterial parasite, *Listeria monocytogenes*. *J Cell Biol*, **109**(4 Pt 1): 1597–608.
- TILNEY, L. G., CONNELLY, P. S., AND PORTNOY, D. A. 1990. Actin filament nucleation by the bacterial pathogen, *Listeria monocytogenes*. *J Cell Biol*, **111**(6 Pt 2): 2979–88.
- TOWBIN, H., STAHELIN, T., AND GORDON, J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **76**(9): 4350–4.
- TUNKEL, A. R., AND SCHELD, W. M. 1993. Pathogenesis and pathophysiology of bacterial meningitis. *Annu Rev Med*, **44**: 103–20.
- TUOMANEN, E. 1996. Entry of pathogens into the central nervous system. *FEMS Microbiol Rev*, **18**(4): 289–99.
- UTGAARD, J. O., JAHNSEN, F. L., BAKKA, A., BRANDTZAEG, P., AND HARALDSEN, G. 1998. Rapid secretion of prestored interleukin 8 from Weibel-Palade bodies of microvascular endothelial cells. *J Exp Med*, **188**(9): 1751–6.
- VAN DEN BERG, R. H., FABER-KROL, M. C., SIM, R. B., AND DAHA, M. R. 1998. The first subcomponent of complement, C1q, triggers the production of IL-8, IL-6, and monocyte chemoattractant peptide-1 by human umbilical vein endothelial cells. *J Immunol*, **161**(12): 6924–30.
- VÁZQUEZ-BOLAND, J. A., KOCKS, C., DRAMSI, S., OHAYON, H., GEOFFROY, C., MENGAUD, J., AND COSSART, P. 1992. Nucleotide sequence of the lecithinase operon of *Listeria monocytogenes* and possible role of lecithinase in cell-to-cell spread. *Infect Immun*, **60**(1): 219–30.
- VEGA, Y., DICKNEITE, C., RIPIO, M. T., BÖCKMANN, R., GONZALEZ-ZORN, B., NOVELLA, S., DOMINGUEZ-BERNAL, G., GOEBEL, W., AND VÁZQUEZ-BOLAND, J. A. 1998. Functional similarities between the *Listeria monocytogenes* virulence regulator PrfA and cyclic AMP receptor protein: the PrfA* (Gly145Ser) mutation increases binding affinity for target DNA. *J Bacteriol*, **180**(24): 6655–60.
- VELGE, P., BOTTREAU, E., KAEFFER, B., AND PARDON, P. 1994. Cell immortalization enhances *Listeria monocytogenes* invasion. *Med Microbiol Immunol (Berl)*, **183**(3): 145–58.
- VELGE, P., BOTTREAU, E., VAN-LANGENDONCK, N., AND KAEFFER, B. 1997. Cell proliferation enhances entry of *Listeria monocytogenes* into intestinal epithelial cells by two proliferation-dependent entry pathways. *J Med Microbiol*, **46**(8): 681–92.
- WAGNER, D. D. 1993. The Weibel-Palade body: the storage granule for von Willebrand factor and P-selectin. *Thromb Haemost*, **70**(1): 105–10.
- WAKELIN, M. W., SANZ, M. J., DEWAR, A., ALBELDA, S. M., LARKIN, S. W., BOUGHTON-SMITH, N., WILLIAMS, T. J., AND NOURSHARGH, S. 1996. An anti-platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 antibody inhibits leukocyte extravasation from mesenteric microvessels in vivo by blocking the passage through the basement membrane. *J Exp Med*, **184**(1): 229–39.
- WANG, J., AND SPRINGER, T. A. 1998. Structural specializations of immunoglobulin superfamily members for adhesion to integrins and viruses. *Immunol Rev*, **163**: 197–215.
- WANI, J. H., GILBERT, J. V., PLAUT, A. G., AND WEISER, J. N. 1996. Identification, cloning, and sequencing of the immunoglobulin A1 protease gene of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun*, **64**(10): 3967–74.
- WAWRYK, S. O., NOVOTNY, J. R., WICKS, I. P., WILKINSON, D., MAHER, D., SALVARIS, E., WELCH, K., FECONDO, J., AND BOYD, A. W. 1989. The role of the LFA-1/ICAM-1 interaction in human leukocyte homing and adhesion. *Immunol Rev*, **108**: 135–61.
- WEBER, C., AND SPRINGER, T. A. 1998. Interaction of very late antigen-4 with VCAM-1 supports transendothelial chemotaxis of monocytes by facilitating lateral migration. *J Immunol*, **161**(12): 6825–34.
- WEHN, S. M., HEINZ, E. R., BURGER, P. C., AND BOYKO, O. B. 1989. Dilated Virchow-Robin spaces in cryptococcal meningitis associated with AIDS: CT and MR findings. *J Comput Assist Tomogr*, **13**(5): 756–62.
- WHITLEY, R. J. 1990. Viral encephalitis. *N Engl J Med*, **323**(4): 242–50.
- WILLIAMS, A. E., AND BLAKEMORE, W. F. 1990. Pathogenesis of meningitis caused by *Streptococcus suis* type 2. *J Infect Dis*, **162**(2): 474–81.

- WILSON, S. L., AND DREVETS, D. A. 1998. *Listeria monocytogenes* infection and activation of human brain microvascular endothelial cells. *J Infect Dis*, **178**(6): 1658–66.
- WOLFF, B., BURNS, A. R., MIDDLETON, J., AND ROT, A. 1998. Endothelial cell 'memory' of inflammatory stimulation: human venular endothelial cells store interleukin 8 in Weibel-Palade bodies. *J Exp Med*, **188**(9): 1757–62.
- ZHENG, W., ZHAO, Q., AND GRAZIANO, J. H. 1998. Primary culture of choroidal epithelial cells: characterization of an *in vitro* model of blood-CSF barrier. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, **34**(1): 40–5.
- ZINKE, H., MOCKEL, B., FREY, A., WEILER-GUTTLER, H., MECKELEIN, B., AND GASSEN, H. G. 1992. Blood-brain barrier: a molecular approach to its structural and functional characterization. *Prog Brain Res*, **91**: 103–16.

A Anhang

A.1 Abkürzungen

A	Adenin/Adenosin
Abb.	Abbildung
ATP	Adenosintriphosphat
BHI	Brain-Heart-Infusion
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin/Cytidin
ca.	circa
Ca ²⁺	Calciumionen
°C	Grad Celsius
cm	Zentimeter
C-terminal	Carboxyl-terminal
CTP	Cytidintriphosphat
Cyt.D	Cytochalasin D
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
ds	doppelsträngig
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
ECGS	Endothelial cell growth supplement
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FCS	fetal calf serum (Fötale Kälberserum)
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
G	Guanin/Guanosin
GTP	Guanosintriphosphat
HBMEC	„human brain microvascular endothelial cells“
HS	Humanserum
IL	Interleukin
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
KE	Kletteinheiten
Konz.	Konzentration
LD ₅₀	Letale Dosis für 50 % der Versuchstiere

L. m	<i>Listeria monocytogenes</i>
LLO	Listeriolysin O
LPS	Lipopolysaccharid
M	Molar
MAP	„mitogen-activated protein“
MEM	„minimal essential medium“
Mg ²⁺	Magnesiumionen
mM	millimolar
MOI	Multiplizität der Infektion
mRNA	Messenger-RNA
μl	Mikroliter
OD	optische Dichte
orient.	Orientierung
p. a.	zur Analyse
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PCR	polymerase chain reaction
PHA	Phytohämagglutinin
PIP ₂	Phosphatidyl-Inositol 4,5-bis-Phosphat
PIP ₃	Phosphatidyl-Inositol 3,4,5-tris-Phosphat
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde(n)
Sm	Streptomycin
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
T	Thymin/Thymidin
TAE	Tris/Essigsäure/EDTA
TBE	Tris/Borsäure/EDTA
Tc	Tetracyclin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TRITC	Tetramethylrhodamine Isothiocyanat
U	Unit (Einheit)
u. a.	unter anderem
ÜN	über Nacht
ÜNK	Übernachtkultur
V	Volt
v/v	„volume to volume“
w/v	„weight to volume“

A.2 Publikationsliste

A.2.1 Publikationen

KUHN, M., ENGELBRECHT, F., SOKOLOVIC, Z., KÜGLER, S., SCHÜLLER, S., BUBERT, A., KARUNASAGAR, I., BÖCKMANN, R., HAUF, N., DEMUTH, A., GREIFFENBERG, L., KREFT, J., AND GOEBEL, W. 1997. Interaction of Intracellular Bacteria with Mammalian Host Cells and Host Cell Responses. *Nova Acta Leopoldina*, **301**: 207-221.

GREIFFENBERG, L., SOKOLOVIC, Z., SCHNITTLER, H. J., SPORY, A., BÖCKMANN, R., GOEBEL, W., AND KUHN, M. 1997. *Listeria monocytogenes*-infected human umbilical vein endothelial cells: internalin-independent invasion, intracellular growth, movement, and host cell responses. *FEMS Microbiol Lett*, **157**(1): 163–70.

GREIFFENBERG, L., GOEBEL, W., KIM, K. S., WEIGLEIN, I., BUBERT, A., ENGELBRECHT, F., STINS, M., AND KUHN, M. 1998. Interaction of *Listeria monocytogenes* with human brain microvascular endothelial cells: InlB-dependent invasion, long-term intracellular growth, and spread from macrophages to endothelial cells. *Infect Immun*, **66**(11): 5260–7.

ENGELBRECHT, F., DOMINGUEZ-BERNAL, G., HESS, J., DICKNEITE, C., GREIFFENBERG, L., LAMPIDIS, R., RAFFELSBauer, D., DANIELS, J. J., KREFT, J., KAUFMANN, S. H., VÁZQUEZ-BOLAND, J. A., AND GOEBEL, W. 1998. A novel PrfA-regulated chromosomal locus, which is specific for *Listeria ivanovii*, encodes two small, secreted internalins and contributes to virulence in mice. *Mol Microbiol*, **30**(2): 405–17.

KUHN, M., PFEUFFER, T., GREIFFENBERG, L., AND GOEBEL, W. 1999. Host cell signal transduction during *Listeria monocytogenes* infection. *Arch Biochem Biophys*, **372**(1): 166–72.

ENGELBRECHT, F., GREIFFENBERG, L., DANIELS, J. D., UND PFEUFFER, T. 2000. Wie fakultativ intrazelluläre Bakterien Krankheit auslösen - Eine Darstellung aus zellulärer und molekularer Sicht. *Biologie in unserer Zeit*. Zur Veröffentlichung angenommen.

GREIFFENBERG, L., GOEBEL, W., KIM, K. S., DANIELS, J. D., AND KUHN, M. 2000. Interaction of *Listeria monocytogenes* with human brain microvascular endothelial cells: an electron microscopic study. *Infect Immun*, **68**(6): im Druck.

VÁZQUEZ-BOLAND, J. A., SUAREZ, M., GREIFFENBERG, L., KUHN, M., BERNAL, G. D., VEGA, M., RIPIO, M. T. PrfA* mutants of *Listeria monocytogenes* are hyperinvasive. In Vorbereitung.

A.2.2 Vorträge

GREIFFENBERG, L. 1996. Interaction of *Listeria monocytogenes* with endothelial cells. 2nd meeting of the *Listeria* Eurolab BIOMED 2 BMH4-CT96-0659 project. Institut Pasteur, Paris.

GREIFFENBERG, L. 1997. Interaction of *Listeria monocytogenes* with endothelial cells. 3rd meeting of the *Listeria* Eurolab BIOMED 2 BMH4-CT96-0659 project. Residencia de Estudiantes (CSIC), Madrid.

GREIFFENBERG, L. 1998. Interaction of *Listeria monocytogenes* with human brain microvascular endothelial cells. 4th meeting of the *Listeria* Eurolab BIOMED 2 BMH4-CT96-0659 project. Institut Pasteur, Paris.

GREIFFENBERG, L. 1999. Interaction of *Listeria monocytogenes* with endothelial cells. 5th meeting of the *Listeria* Eurolab BIOMED 2 BMH4-CT96-0659 project. Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, Madrid.

A.2.3 Abstracts

BUBERT, A., GÖTZ, M., SLAGHUIS, J., WANG, G., GREIFFENBERG, L., SZALAY, A. A., AND GOEBEL, W. 1999. Applications of GFP- Expressing *Listeria monocytogenes* in infection studies. The second international symposium on GFP. San Diego, USA. May 22-27, 1999.

KUHN, M., GREIFFENBERG, L., AND GOEBEL, W. 2000. Interaction of *Listeria monocytogenes* with human microvascular endothelial cells. *BIOspektrum*, **S2000**: 108.

A.2.4 Poster

KUHN, M., Greiffenberg, L., Kim, K. S., Sokolovic, Z., Schnittler, H. J., Weiglein, I., Bubert, A., Spory, A., Boeckmann, R., and Goebel, W. 1998. Interaction of *Listeria monocytogenes* with Human Endothelial Cells. ISOPOL XIII. Halifax, 28.06.–02.07. 1998.

GREIFFENBERG, L. Interaction of *Listeria monocytogenes* with Human Endothelial cells. 1999. EMBO-EBNIC Workshop on Cellular Microbiology. Siena 28.01.–02.02. 1999.

KUHN, M., Greiffenberg, L., Kim, K. S., Bubert, A., and Goebel, W. 1999. Interaction of *Listeria monocytogenes* with Endothelial Cells. A Cell Biology Approach to Microbial Pathogenesis. Portland, 25.–28.05. 1999.

A.3 Curriculum Vitae

Persönliche Daten:	Lars Greiffenberg geb. 27.04.1969 in Gehrden (bei Hannover) ledig deutsch evangelisch-lutherisch
Schulbildung:	1976 - 1980 Grundschule in Bückeberg 1980 - 1982 Orientierungsstufe in Bückeberg 1982 - 1985 Realschule in Bückeberg 1985 - 1988 Gymnasium Ernestinum in Rinteln
Wehrdienst:	1989 - 1991 Ausbildung zum Reserveoffizier 2./Panzerbataillon 31, Nienburg 1992 Beförderung zum Leutnant der Reserve
Hochschulstudium:	1991 - 1996 Studium der Biologie an der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg
- Examen:	06.12.1993 Diplomvorprüfung, Note: gut 27.10.1995 Diplomprüfung, Note: sehr gut
- Diplomarbeit:	1995-1996 Lehrstuhl für Mikrobiologie, Würzburg Thema: Die Bedeutung von NF- κ B bei der Infektion von Makrophagen mit <i>L. monocytogenes</i>
Promotion:	1996-2000 Lehrstuhl für Mikrobiologie, Würzburg bei Herrn PD Dr. M. Kuhn, im Rahmen des „ <i>Listeria</i> Eurolab BIOMED 2 EC“- Projektes

A.4 Summary

Listeria monocytogenes cross endothelial barriers to cause meningitis or encephalitis. Passage through the barrier may be achieved by invasion of endothelial cells by *Listeria* from the blood stream followed by release of the bacteria into the brain.

Internalization of *L. monocytogenes* by endothelial cells has been previously demonstrated using macrovascular human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) as a model system. However, brain microvascular endothelial cells (BMEC) which form the blood brain barrier, are strikingly different from the macrovascular HUVEC. Therefore, in this investigation, the interaction of *L. monocytogenes* with HUVEC and human BMEC (HBMEC) was studied.

It was found that *L. monocytogenes* efficiently invades HBMEC. After invasion and escape from the phagosome the bacteria induce the formation of actin tails which allows them to move intracellularly. Once within the HBMEC, *L. monocytogenes* are able to multiply over a period of at least 20 hours and enter neighbouring cells by cell-to-cell spread.

Using a green fluorescent protein-expressing *L. monocytogenes* strain, this process of infection was followed in real time. It was shown that heavily infected HBMEC do not detach from the tissue culture dish and do not lyse, indicating that they are highly resistant to intracellular *L. monocytogenes*.

Scanning electron microscopy studies of infected HBMEC-monolayers showed adherent *Listeria* in close contact with surface microvilli. *Listeria*-infected HBMEC shows bacteria-containing membrane protrusions within a few hours after infection. These protrusions are connected with the cell surface via thin stalk-shaped membrane connections.

To determine which listerial proteins are responsible for the uptake of *L. monocytogenes* in HUVEC and HBMEC, different deletion mutants of *L. monocytogenes* were tested with respect to their effect on the efficiency of invasion.

It was found that *L. monocytogenes* invades HUVEC in the presence of 20 % human serum independently of InlA, InlB, and ActA. However, deletion of the gene encoding the positive virulence regulatory factor PrfA results in a strong inhibition of invasion.

Listeria-strains with a deletion in the InlB encoding gene are unable to invade HBMEC. Moreover, InlG, ActA, and also PrfA play important roles in invasion of HBMEC by *L. monocytogenes*. Adherence of *L. monocytogenes* to HBMEC is independent of InlB. Even the nonpathogenic and noninvasive species *L. innocua* adheres to HBMEC.

Human serum was shown to inhibit the uptake of *L. monocytogenes* by HBMEC but not by HUVEC. Centrifugation of *Listeria* onto the cells enhanced the invasion of HUVEC, but had no effect on invasion of HBMEC. In addition to these differences, other parameters were identified which have different effects on the invasiveness of *L. monocytogenes* for HUVEC and HBMEC.

High amounts of IL-8 could be detected in the supernatants of *Listeria*-infected HUVEC within 6 hours. Additionally, a weak induction of IL-6 specific mRNA could be detected during infection of HUVEC, but mRNA-expression specific for MCP-1 and VCAM-1 was not altered.

Using HBMEC and Caco-2 cells, an *in-vitro*-model of the *choroid plexus* was developed by growing each cell type on either side of porous membrane filters. A few hours after infection of HBMEC with *L. monocytogenes*, bacteria were found in the underlying Caco-2 cells. In transmission electron microscopic studies it could be shown that *Listeria* reached the epithelial cells via the filter pores. The mechanism for this spreading is so far unknown.

Die vorliegende Dissertation wurde unter Windows 9x und Windows NT mit dem Textsatzprogramm \LaTeX^a ($\text{\LaTeX}2\epsilon$) angefertigt. Als \LaTeX -Distribution kam \MiKTeX 1.20d^b und als Editor $\text{\winedt32 (v.19-8)}^c$ zum Einsatz. Sämtliche Bilder wurden als “Encapsulated PostScript File” mit dem Ergänzungspaket \graphicx^d in das Dokument eingefügt. Die in Excel '97 erstellten Diagramme konnten ohne Qualitätsverlust über die Zwischenablage in Corel8.0 eingefügt und von dort als EPS exportiert werden. Die fertiggestellte dvi-Datei wurde mit \dvips^e (v.5.66a) in Postscript konvertiert und mit einem HP4500 N Drucker ausgedruckt. Soweit zuvor das \hyperref -Paket^f mit der Option [dvips] eingebunden wurde, konnte die so präparierte Postscriptdatei mit dem Acrobat[®]-Distiller (4.0) in das PDF-Format umgeschrieben werden. Eine Online-Version, sowie eine ausführliche Beschreibung zur DVI-PDF-Konvertierung befindet sich unter: <http://www.bibliothek.uni-wuerzburg.de/DISS/liste.html>.

^avon Leslie Lamport

^b<http://ftp.dante.de/tex-archive/systems/win32/miktex>

^c<http://www.winedt.com/>

^dDavid Carlisle

^eTomas Rokicki

^fSebastian Rahtz